

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06547

研究課題名(和文) 肝癌の発生・進展における多機能分子p62の役割

研究課題名(英文) The role of p62 in the HCC initiation and progression

研究代表者

榎村 敦詩 (Umemura, Atsushi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30759585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：化学発癌物質DENを用いたモデル、およびTSC1欠損による自然発癌モデルの2つのマウスモデルを用い、p62を直接欠損させることにより肝癌の発生・進展を検討することができた。DENモデルではp62欠損により肝癌発生が抑制され、TSC1欠損モデルでは驚くべきことに、p62欠損により肝癌を全く発症しなかった。上記結果より、肝癌の発生・進展にp62が重要な役割を果たしている事、また癌部・非癌部の解析結果により、抗酸化ストレス反応を担うNRF2シグナルおよびmTORシグナルが関わっている事が判明した。これらの知見により肝癌発症の重要なメカニズムの一端を明らかにしたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：p62 is a autophagy receptor and signaling protein that accumulates in premalignant liver diseases such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and most hepatocellular carcinomas (HCCs). Although p62 has been shown to participate in cancer progression, its role in HCC development was not explored. Here we show that p62 is necessary and sufficient for HCC induction in mice and that its high expression in non-tumor human liver predicts rapid HCC recurrence after curative treatment. High p62 expression is needed for activation of NRF2 and mTORC1, and protection of HCC-initiating cells from oxidative stress-induced death in chronic liver diseases.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肝癌 p62 NRF2 mTOR

### 1. 研究開始当初の背景

Mallory Denk Body(MDB) は肝細胞癌(HCC)症例の多くで見られる細胞質凝集体で、アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)、ウィルソン病など幅広い慢性肝疾患で確認される。オートファジー関連タンパク p62 は MDB の中心的な構成成分として知られている。

一方、p62 はシグナルアダプター分子として TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)を介した NF- $\kappa$ B の活性化や、Keap1 を介して抗酸化反応を担う Nrf2 を活性化すること、mTOR 複合体 1 (mTORC1)シグナルの活性化に関わることなどが知られる多機能分子である。

### 2. 研究の目的

これまでの研究から、p62 は膵癌・腎癌・子宮内膜癌など多くの癌の進展に関与することが報告されている。そこで今回我々は HCC モデルを用いて肝発癌・進展における p62 の役割を検討した。

### 3. 研究の方法

p62 flox/flox (p62F/F)マウスに Alb-Cre トランスジェニックマウスを交配し、肝臓特異的な p62 knock-out(p62 hep)マウスを作成した。このマウス肝臓では異常なフェノタイプや肝障害はなく、発育・体重等にも異常は認めなかった。次に p62 hep マウスと対照マウス (p62F/F) に化学発癌物質 diethylnitrosamine(DEN)を投与し肝臓を発症させ、比較検討した。

また、p62 は mTORC1 を活性化すると報告されている。mTORC1 は主に Raptor や mTOR から構成される巨大なキナーゼ複合体で、酸素・栄養・増殖因子・エネルギーの利用状況を反映する多くのシグナルを統合し、下流では S6 キナーゼなどの各種キナーゼを活性化することで、蛋白・核酸・脂質の合成や、グルタミン・糖の代謝、オートフ

アジーの抑制に関わり、anabolic cell growth に代表される生命活動の中枢を担っている。mTORC1 の活性化には様々なプロセスがあるが、注目すべきは TSC 複合体による抑制である。TSC 複合体は TSC1 と TSC2 からなる癌抑制遺伝子産物で、TSC1/2 のいずれかを knock-out するとこの抑制が外れ mTORC1 が恒常的に過剰に活性化すること、マウス肝臓特異的な TSC1 の knock-out により HCC を自然発症することが明らかになっている。我々はこの肝臓特異的な TSC1 knock-out(TSC1 hep)マウスを作成し、オートファジーが抑制され p62 が蓄積することを確認した。さらに p62 を追加で knock-out した double knock-out マウス (TSC1/p62 hep マウス)を作成し、比較検討した。

### 4. 研究成果

< p62 欠損は肝臓発症を有意に抑制する >  
p62 hep マウスでは対照マウス(p62F/F) に比べて腫瘍数が有意に減少した。腫瘍最大径は両群間で差はなかった。p62 hep マウスでは p62 の発現はなく、Nrf2 およびその標的遺伝子である Nqo1 の発現が低下していた。p62 は Nrf2 を活性化することが知られているため、Nrf2 の標的遺伝子の発現をリアルタイム qPCR で検討したところ、Nqo1 に加えて Hmox1、Gstm1 の発現が特に p62 hep マウスの癌部で低下していることが分かった。

< p62 は Nrf2 と mTORC1 の活性化に関する >

Nrf2 は非ストレス下では抑制因子である Keap1 によって細胞質に留められ核移行が阻害されている。しかし酸化ストレスを受けると Keap1 から遊離して核内に移行し、抗酸化剤応答配列 (Antioxidant Response Element: ARE) に結合することで種々の遺伝子群を発現誘導する。Nrf2 は抗酸化・解毒に関わる遺伝子の発現を誘導

するマスターレギュレーターと考えられており、p62がKeap1と結合することでNrf2はフリーとなり核内に移行し、抗酸化ストレス反応が活性化される。

< TSC1 knock-out マウスでの肝発癌は p62 依存的である >

TSC1/p62 hep マウスでは、TSC1 hep マウスで認められた p62 の蓄積や、mTORC1 の活性化指標のひとつであるリン酸化 S6 キナーゼ (phospho-S6 kinase: p-S6K) も低下していることが確認された。また、TSC1 マウスでは Nrf2 の標的遺伝子の発現が亢進していたが、TSC1/p62 hep マウスでは低下していた。その上、TSC1 マウスで認められた多発 HCC の発症が、TSC1/p62 hep マウスでは完全に抑制された。これら HCC は p62 のシグナル依存的に発症していると考えられた。

< Nrf2 シグナルと mTORC1 シグナルは p62 依存的に変動する >

続いて p62 hep マウスと対照マウス (p62F/F) の肝臓を用いて、RNA シークエンス解析を行った。その結果、p62 hep マウスの肝臓では、Nrf2-mediated Oxidative Stress Response や Nqo1 などの Nrf2 の標的遺伝子の発現が低下していた。また、TSC1 hep マウスと TSC1/p62 hep マウスを比較したところ、TSC1/p62 hep マウスでは Nrf2 の標的遺伝子の発現が低下しており、p62 依存的に Nrf2 が活性化していることが示唆された。

一方、mTORC1 シグナルに関しては、TSC1/p62 hep マウスでは TSC1 hep マウスに比べて mTORC1 シグナルの活性が低下しており、こちらも p62 依存的に変動することが示唆された。以上より、mTORC1 の活性も p62 依存的に変動することが示された。

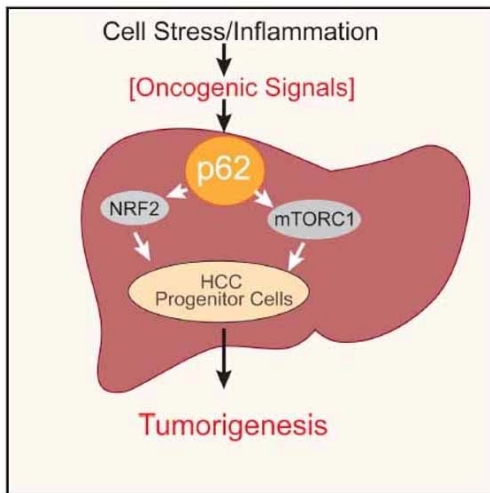
< p62 の過剰発現により肝癌を発症する >  
次にアデノ随伴ウイルスを用いて p62 を、マウス肝臓に感染・発現させたところ肝癌を発症した。Keap1 結合領域を欠損した p62 では見られなかったが、C 末端のコピキチン結合ドメインを削除した p62 は HCC を発症させたことから、p62 過剰発現による HCC 発癌には主に Nrf2 シグナルが関わっていることが示唆された。これら HCC では、p62 や Nrf2 に加えて p-S6K も発現が増加しており、mTORC1 シグナルの関与も考えられる。

< p62 が高発現したヒト HCC 群は低発現群に比べ予後不良である >

最後に TCGA および GSE10141 のデータベースを用いてヒト HCC 症例での検討を行った。p62 高発現群は低発現群に比べて予後が悪いとの結果が示された。また、根治的ラジオ波焼灼術を施行した初発 HCC 症例から採取した背景肝において、p62 発現を 4 段階 (G0-G3) に評価したところ、高度発現群 (G3) は低 ~ 中度発現群 (G0-G2) に比べ、無再発生存期間が有意に短いことが判明した。また、同検体の線維化進展度は p62 の発現強度と正の相関を示した。

< 考察 >

マウス肝癌モデルおよびヒト検体の解析により、p62 は肝癌の発生・進展に重要な働きをしていることが示された。特に p62-Nrf2 シグナルが主体的に関わること、併せて mTORC1 シグナルが関与することが示唆された(図)。



( 出典 : **Cancer Cell**. 2016 Jun 13; 29(6): 935-48. )

以上より、高ストレス下の慢性肝疾患で蓄積した p62 は肝癌発症の重要な因子と考えられる。一方、ヒト検体を用いた検討では、背景肝における p62 の発現強度が、線維化や HCC 根治治療後の再発リスクと正の相関を示した。

p62 は様々な慢性肝疾患で蓄積し、特に進行した病態において MDB などの凝集体を形成することから、肝癌の早期発見に寄与するマーカーや治療ターゲットになりうると考えられた。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 6 件 )

1. Umemura A, He F, Taniguchi K, Nakagawa H, Yamachika S, Font-Burgada J, Zhong Z, Subramaniam S, Raghunandan S, Duran A, Linares JF, Reina-Campos M, Umemura S, Valasek MA, Seki E, Yamaguchi K, Koike K, Itoh Y, Diaz-Meco MT, Moscat J, Karin M. [p62, Upregulated during Preneoplasia, Induces Hepatocellular Carcinogenesis by Maintaining Survival of Stressed](#)

[HCC-Initiating Cells](#). **Cancer Cell**. 2016 Jun 13;29(6):935-48. 査読あり

2. Zhong Z\*, Umemura A\* (\*; Co-first author), Sanchez-Lopez E, Liang S, Shalpour S, Wong J, He F, Boassa D, Perkins G, Ali SR, McGeough MD, Ellisman MH, Seki E, Gustafsson AB, Hoffman HM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Karin M. [NF-κB Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria](#). **Cell**. 2016 Feb 25;164(5):896-910. 査読あり

3. Yamada N, Yasui K, Dohi O, Gen Y, Tomie A, Kitaichi T, Iwai N, Mitsuyoshi H, Sumida Y, Moriguchi M, Yamaguchi K, Nishikawa T, Umemura A, Naito Y, Tanaka S, Arii S, Itoh Y. [Genome-wide DNA methylation analysis in hepatocellular carcinoma](#). **Oncol Rep**. 2016 Apr;35(4):2228-36. 査読あり

4. Moriguchi M, Umemura A, Itoh Y. [Current status and future prospects of chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma](#). **Clin J Gastroenterol**. 2016 Aug;9(4):184-90. 査読なし

5. Fujii H, Nishimura T, Umemura A, Nishikawa T, Yamaguchi K, Moriguchi M, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Yokomizo C, Tanaka S, Ishikawa H, Nishioji K, Kimura H, Takami S, Nagao Y, Takeuchi T, Shima T, Sawa Y, Minami M, Yasui K, Itoh Y. [Comparison of peg-interferon, ribavirin plus telaprevir vs simeprevir by propensity](#)

[score matching](#). *World J Hepatol*. 2015

Dec 8;7(28):2841-8. 査読あり

6. 榎村敦詩, 山口寛二, Michael Karin, 伊藤義人

特集 / 肝胆膵疾患とオートファジー . オートファジー異常と肝胆膵疾患

10. 肝細胞癌とオートファジー

肝胆膵 73 巻 2 号 (2016 年 8 月号) 235 ~ 242 ページ 査読なし

[学会発表](計 2 件)

1. 2016/4/15

Atsushi Umemura, Yoshito Itoh, Michael Karin

Fatty Liver Disease: Experimental Oral  
“The Effect of mTORC1 Inhibition on  
NAFLD and subsequent HCC  
Development.”

The international congress 2016,  
European Association for the Study of  
the Liver (EASL)、スペイン、バルセロナ

2. 2016/5/19

、榎村敦詩、山口寛二、伊藤義人

シンポジウム 2-10

肝発癌・進展における, mTORC1 および  
p62-Nrf2 シグナルの役割

第 52 回日本肝臓学会総会 (千葉県幕張市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

榎村 敦詩 (UMEMURA, Atsushi)

京都府立医科大学大学院消化器内科学  
助教

研究者番号 : 30759585