

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09018

研究課題名(和文) 熱ショック蛋白Apg-2の肝脂肪化と肝発癌誘導機序の解析

研究課題名(英文) The role of Apg-2 in liver steatosis and carcinogenesis

研究代表者

伊藤 義人 (Itoh, Yoshito)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70244613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の恒常性維持を担う分子シャペロンの異常は、細胞の機能不全から、代謝異常、発癌、神経変性疾患の要因となる。我々は、ヒト肝がんで高発現しているHSP110ファミリーに属するApg-2に注目し、Apg-2^{-/-}マウスが肝発癌や高脂肪食負荷による脂肪肝形成に抵抗性を示すことを見出した。Apg-2^{-/-}マウス由来の肝癌をRNA sequenceで遺伝子発現解析したところ、細胞周期G2/Mに重要なCDK1/CyclinB1が低下しており、肝癌細胞株の検討でも同様であった。分子シャペロンが糖脂質代謝を介して、肝癌のアポトーシス抑制や細胞周期を制御することが判明し、癌治療の標的と成り得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Heat shock proteins (HSPs) not only protect cells from the toxic effects of heat and other stresses but also have multiple housekeeping functions, such as folding and protein degradation. Apg-2 is a subfamily of Hsp110 and has been reported to be overexpressed in human hepatocellular carcinomas (HCCs). To study the role of Apg-2 in liver steatosis and carcinogenesis, we generated Apg-2 deficient mice and examined high fat diet-induced liver steatosis and diethylnitrosamine (DEN)-induced hepatocellular carcinomas (HCCs). We found that Apg-2 deficient mice exhibited less liver steatosis and DEN-induced hepatocellular carcinomas (HCCs) compared to wild-types. RNA sequence from Apg-2 deficient HCCs and in vitro study of hepatoma cell lines revealed that Apg-2 regulated cell cycle G2/M pathway-related molecules, such as CDK1/CyclinB1, and promoted HCCs proliferations. These findings indicated that Apg-2 is a potential target for the therapy of HCCs.

研究分野：肝臓病学

キーワード：Apg-2 分子シャペロン 肝癌 細胞周期 ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

Heat shock protein 110 ファミリーの1つである Apg-2 は tight junction 蛋白 ZO-1(zonula occludens-1) と ZONAB(ZO-1-associated nuclear acid binding protein)の結合を競合的に阻害することで ZONAB の核移行を促進する。この競合的阻害は ZO-1 の発現量の少ない細胞で強く、ZONAB に結合する CyclinD1 や CDK4 の核移行により細胞増殖は促進する (Tsapara A et al. MBC 2006, BMC cell biology 2007)。この現象は癌の増殖や転移に重要な上皮間葉移行 (EMT: epithelial mesenchymal transition) による癌の悪性化と関連する可能性が示唆されている。我々は Apg-2 ノックアウトマウスを作成し肝発癌モデル、脂肪肝炎モデルで Apg-2 の役割を検討してきた。ジエチルニトロサミンによるマウス肝発癌モデルの検討では、Apg-2 ノックアウトマウスでは投与後 40 週で 32%に発癌を認めるのみで、wild type の 74%と比較して 50%以下に減少していた。発癌率だけでなく腫瘍個数、腫瘍サイズも減少していたことから、Apg-2 の肝発癌におけるプロモーション効果が確認された。さらに、ヒト肝癌細胞株を用いた検討では、Apg-2 を siRNA によりサイレンシングすると caspase-3 の断片化・活性化が確認され、Apg-2 の抗アポトーシス作用が示唆された。他の研究グループから、既に、肝細胞癌で高発現している Heat shock 蛋白の報告があり、特に HSP70 は抗アポトーシス作用を介した発癌作用が証明されており、分子マーカーとして使用されている (Hepatology. 5:725, 2007)。

・臨床においては、B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルス感染に起因した肝癌が全体の約 85%を占めるが、非 B 非 C 型肝炎が急速に増加してきており、脂肪肝炎・肝硬変に起因する肝癌の増加が問題となっている。

すなわち、その肝発癌機序を解明し対策を立てることは急務と考えられる。

・我々は、Apg-2 の脂肪肝炎における役割を検討するために、Apg-2 ノックアウトマウスに高脂肪食及び高脂肪高コレステロール食を 12 週間投与した。結果、Apg-2 ノックアウトマウスは肝脂肪化に抵抗性を示すことが確認された。以上より、Apg-2 ノックアウトによる肝発癌抑制作用、抗肝脂肪化作用が示唆されたが、その詳細な機序は不明であり、Apg-2 の脂肪肝炎から肝発癌に至る過程で果たす役割に関する検討が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

申請者らは、肝癌組織由来の subtracted cDNA library から同定された肝細胞癌に高頻度の高発現する Apg-2 に関して脂肪肝炎由来の肝発癌における役割に焦点をあてて解析する。外科的に切除された肝癌組織での Apg-2 の発現を免疫組織化学的に検討し、腫瘍径・分化度・病期などの臨床パラメーター、生命予後との関連性を検討する。特に、肝再生が不良であるとされる非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の肝組織及び肝癌組織で Apg-2 の発現と生命予後・臨床パラメーターとの関連を検討する。また、Apg-2 ノックアウトマウスを用いて肝発癌モデル、脂肪肝炎モデル、脂肪肝炎 + 肝発癌モデルを作成し、それぞれの肝病態における、細胞周期関連遺伝子、細胞接着関連遺伝子、脂質代謝関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子の発現解析を行い、Apg-2 の脂肪肝炎から肝発癌における作用機序を解明する。また、肝細胞における Apg-2 発現の重要性を考慮し、Apg-2 ノックアウトマウスの肝細胞において肝細胞特異的に Apg-2 を発現させ、ノックアウトマウスの形質の可逆性を検証する。

高分化から未分化までの種々のヒト肝癌細胞株を用い、Apg-2 の発現を siRNA により

サイレンシングし、アポトーシス、細胞周期、cancer EMT 関連分子の動態を検討する。また、分子シャペロンとして Apg-2 は抗アポトーシス遺伝子の修復に関与している可能性があり、そのターゲット分子を同定する。

3. 研究の方法

1). Apg-2 ノックアウトマウスでの検討

高脂肪食による脂肪肝、脂肪肝炎モデル、肝発癌モデルを作成し、それぞれの肝病態またはその組み合わせにおける Z0-1、ZONAB、CyclinD1 や CDK4 などの動態を検討する。

a) 脂肪肝炎モデル: 高脂肪食または高脂肪高コレステロール食を 12 週間、または、24 週間投与することで作成する。肝細胞に発現する Apg-2 の重要性を評価するため、Apg-2 ノックアウトマウスで肝細胞特異的に Apg-2 を発現させ、ノックアウトマウスの形質の可逆性を検証する。

b) 発癌モデル: 生後 2 週間の雄性 Apg-2^{-/-}マウス (対照: 雄性 Apg-2^{+/+}マウス) に 25mg/kg の Den を腹腔内投与し、40 週間後に肝発癌の状況を確認する。

c) マウス脂肪肝炎 + 発癌モデル: 生後 2 週間の雄性 Apg-2^{-/-}マウス (対照: 雄性 Apg-2^{+/+}マウス) に 25mg/kg の Den を腹腔内投与する。Apg-2^{-/-}マウスでは wild type マウスに比べて肝発癌が 70% から 34% に低下すること、および、高脂肪食 (脂肪 60%) 12 週では脂肪肝が著明に抑制されることから、生後 2 週間で Den を投与済みの Apg-2^{-/-}マウスが体重 20g 前後になった時点で高脂肪高コレステロール食 (脂肪 60%, コレステロール 1.25%) を投与し、40 週間後の時点で発癌に対する脂肪肝炎の影響を検討する。採取された肝組織から HE 染色標本を作製し、血清から ALT/AST、血糖、インスリン、脂質の値を測定、real-time PCR や Western blotting で Apg-2, Z0-1, SONAB,

HSP70, CyclinD1 や CDK4、脂質関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子の発現を定量的に、免疫組織化学的に Apg-2, Z0-1, SONAB の肝細胞内での局在を検討する。先の検討から Apg-2 の欠損は ATP 欠乏に関連している可能性があり、AMPK、PPARα、PGC-1α、HSP70 との interaction に注目して上記実験を行う。

d) RNA シークエンス: Apg-2^{+/+}マウスと Apg-2^{-/-}マウスの背景肝と肝癌の各 3 個体から RNA を抽出し、RNA シークエンスを行い、網羅的に Apg-2 に関係するがん関連遺伝子の発現動態の解析を行う。

2) 肝癌細胞株での検討

ヒト肝癌細胞株で Apg-2 の作用機序を検討するため、siRNA を用いたサイレンシングを行いアポトーシス関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、cancer EMT 関連遺伝子の動態を検討する。また、分子シャペロンとしてのターゲット蛋白の同定を行う。

a) ヒト肝癌細胞株を用いた、Apg-2 の細胞増殖、抗アポトーシス、cancer EMT に関する検討: ヒト肝癌細胞株の中で比較的分化度の高い Huh-7、PLC/PR5 と分化度の低い HLE、P53 wild type の HepG2 及び Hep3B 細胞を用いて以下の実験を行う。Apg-2 のサイレンシングは siRNA のトランスフェクションによる方法と、トランスフェクションによるアポトーシスの誘導を無視できるテトラサイクリン on のシステムを用いた方法で行う。Apg-2 のサイレンシングが in vitro で細胞数を減少させた結果より Apg-2 が癌細胞の増殖に重要であると考え、Apg-2 の抗アポトーシス作用、細胞増殖作用を検討する方法として、BrdU の取り込みを ELISA 法で測定、アポトーシスを TUNEL 染色で測定、Western blotting で PCNA や cyclin D1, caspase3, caspase9, BAX, Bcl-x, Bcl-2, Mcl-1, pRB を検討する。また、Apg-2 は分子シャペロンに属することから、スト

レス環境での細胞増殖に関与している可能性があり、過酸化水素負荷、脂肪酸負荷、低酸素負荷（インキュベーターO₂濃度1%）の影響も検討する。特に、これまでの検討で24時間の低酸素状態がApg-2のmRNA発現を数倍に増加させることを確認しており、低酸素状態でApg-2をサイレンシングすることがEMT関連遺伝子であるHIF-1、VEGF、snail、ZEB、twist、E-cadherin、vimentin、Zo-1、n-cadherinの発現動態に与える影響も検討する。

b)テトラサイクリン onのシステムを用いたヒト肝癌細胞株におけるApg-2のin vivo腫瘍形成に関する検討：テトラサイクリンonによりApg-2がサイレンシングされる機能を導入したHuh7細胞やHLE細胞を作成し、これまでの細胞増殖、アポトーシス、cancer EMTに関する検討の再現性を確認する。さらに、得られたcloneをヌードマウスの皮下に接種し、テトラサイクリン含有飲料水を投与する。この実験系でヒト肝癌細胞株を用いたin vivoの腫瘍形成におけるApg-2の役割について検討できる。Cloneは肝癌細胞株ごとに3種類作成し、ヌードマウスを各5匹ずつ、コントロール水とテトラサイクリン含有水の2群に分け、合計30匹用いて行う。腫瘍サイズだけでなく、腫瘍組織における血管新生についても免疫組織学的手法などを用いて検討する。

3) ヒト検体での検討

脂肪肝、特に脂肪肝肝炎組織、脂肪肝由来の肝硬変・肝癌組織を用いて免疫組織化学的にApg-2の発現を検討し、臨床パラメーターとの関連を解析する。診断目的に生検を行った脂肪肝、特に、脂肪肝患者肝組織、および、外科的に切除された脂肪肝由来の肝硬変・肝癌組織を用いてApg-2の発現を検討する。検体は平成24年度～26年度にかけて採取したものおよび保存していたものを使用する。

4. 研究成果

1) Apg-2^{-/-}マウスがメンデルの法則に従って産まれることを確認した。しかしApg-2^{-/-}マウスの体重はApg-2^{+/-}およびApg-2^{+/+}マウスの70%前後にとどまることが分かった。また、主要臓器のHE標本では明らかな病変を認めなかった。

2) Apg-2^{-/-}マウスにおけるDEN誘発肝癌モデル作成前に、WtマウスにおけるDEN誘発肝癌についての検討を行った。Wtでは投与後40週で発生する肝癌において、背景肝と比べて腫瘍部で明らかにApg-2発現が亢進している腫瘍とそれほど亢進していない腫瘍が散在していた。Apg-2の発現が亢進している腫瘍部ではki-67の発現が免疫組織学上増加しており細胞増殖活性が高いと判断した。アポトーシスに関してはTUNEL染色ではApg-2発現の高い腫瘍とそうでない腫瘍に統計学的な差は見られなかった。次に、Apg-2^{-/-}マウスにおけるDEN投与40週後の解析では、明らかに肝癌腫瘍個数の減少、腫瘍径の減少が確認された。この傾向はDEN投与後40週で高脂肪食を約30週間投与したマウスでさらに明らかであった。以上の検討からApg-2蛋白の肝発がんの促進効果が示唆された。次にIn Vitroの系で、ヒト肝癌細胞株を用いてApg-2の発現に及ぼす影響を検討した。Huh7、PLC/PR5、HLE、HepG2、Hep3B細胞株においてApg-2蛋白をSiRNAによりRNAレベルでサイレンシングを行ったところ、細胞数の低下、BrdU取り込み能を始めとする細胞増殖の低下、カスパーゼ3/7の活性化を伴うアポトーシスの亢進がPLC/PR5及びHep3B細胞株において確認された。

3) 高脂肪食による脂肪肝モデルを作成したところApg-2^{-/-}マウスでは著明に脂肪肝化が抑制されただけでなく、体重増加、全身の脂肪組織の肥大化が抑制された。高脂肪食投与前の6週令マウスの肝臓から

RNAを抽出しcDNAアレイを施行したところ、Apg-2^{-/-}マウスではWtに比べカタラーゼの発現が約3倍上昇しておりペロキシゾームの活性化が示唆された。また、高脂肪食2週投与と24週投与のいずれにおいてもAMP-activated protein kinase (AMPK)のリン酸化、peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)

の発現が亢進していた。以上より、Apg-2がないことでペロキシゾームにおける脂肪酸の酸化の亢進がみられ脂肪肝の抑制に寄与したと考えられた。さらに高脂肪食高コレステロール食による脂肪肝モデルを作製したところ、脂肪化の抑制と線維化の改善効果が見られた。

4) Apg-2に関連した肝発がん機序を検討するために、Apg-2^{+/+}マウスとApg-2^{-/-}マウスの背景肝と肝癌の各3個体からRNAを抽出し、RNAシーケンスを行い、網羅的にApg-2に関係するがん関連遺伝子の発現動態の解析を行った。Apg-2^{+/+}マウスとApg-2^{-/-}マウス由来の肝癌の比較を行い、Apg-2^{+/+}マウスに有意に高発現している遺伝子群のなかで、背景肝では高発現していない遺伝子群を抽出した。候補遺伝子を別に作製したDEN誘発肝癌を用いてreal-time PCRでvalidationを行った。結果として選定された遺伝子のなかから、細胞周期のG2-M期に関わる遺伝子群が候補として残った。これらの遺伝子は特定のkinaseでリン酸化されるkinaseであり、CDK1/CyclinB1などであった。分子シャペロンApg-2がこれらのkinaseの分解に関わる可能性が文献的に報告されている。我々は、その中でユビキチン化-プロテアソーム系に注目して、Apg-2との結合能、シャペロン依存性のE3であるThe carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP/stub1)によるユビキチン化について検討を進めている。

以上の結果から、Apg-2は肝脂肪化、肝発がん重要な役割を果たしていると考えられ、その機能の制御が治療対象と成り得ると考えられた。

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)

Matsumoto M, Yamaguchi K, Itoh Y, Torok NJ, Yabe-Nishimura C, et al. The NOX1 isoform of NADPH oxidase is involved in dysfunction of liver sinusoids in nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2018 Feb 1;115:412-420.

(査読有)

Moriguchi M, Yamaguchi K, Itoh Y et al. Sorafenib versus Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy as Initial Treatment for Hepatocellular Carcinoma with Advanced Portal Vein Tumor Thrombosis. *Liver Cancer.* 2017 Nov;6(4):275-286. (査読有)

Seko Y, Yamaguchi K, Itoh Y et al. Combination of PNPLA3 and TLL1 polymorphism can predict advanced fibrosis in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2018 Mar;53(3):438-448.

(査読有)

Gen Y, Yamaguchi K, Itoh Y et al. ASPP2 suppresses invasion and TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting Smad7 degradation mediated by E3 ubiquitin ligase ITCH in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2017 Jul 10;398:52-61. (査読有)

Okajima A, Yamaguchi K, Itoh Y et al. Liver stiffness measurement to platelet ratio index predicts the stage of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 2017 Jul;47(8):721-730. (査読有)

Umemura A, Yamaguchi K, Itoh Y, Karin M, et al. p62, Upregulated during Preneoplasia, Induces Hepatocellular Carcinogenesis by Maintaining Survival of Stressed HCC-Initiating Cells. Cancer Cell. 2016 Jun 13;29(6):935-948. (査読有)

[学会発表](計6件)

2016/5/19 第52回日本肝臓学会総会(幕張)、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

2016/5/19 第52回日本肝臓学会総会(幕張)、山口寛二、石破博、伊藤義人 一般演題 1、0-78、Heat shock protein 110 ファミリー・Apg-2 の脂肪肝形成における役割

2016/11/13 AASLD 2016 第67回米国肝臓学会議(ボストン)、ポスター、Ishiba Hiroshi, Yamaguchi Kanji, Itoh Yoshito et al (他8名). P-1573 Apg2 is a key determinant of hepatic steatosis by regulating AMPK activity.

2017/6/2 第1回 ICFL The 1st International Conference on Fatty Liver Seville Spain. BEST POSTER PRESENTATIONS SESSION 2 Screen 2 Yamaguchi Kanji, Ishiba Hiroshi, Seko Yuya, Umemura Atsushi, Itoh Yoshito

Apg-2 plays an important role in hepatic steatosis

2017/6/8 第53回日本肝臓学会総会(広島)、PD2-14(追加発言) 山口寛二、石破博、伊藤義人 パネルディスカッション 2「NASH 発症の分子機構と治療戦略」分子シャペロン Apg-2 をターゲットにした肝脂肪化治療戦略

2017/11/30 第42回日本肝臓学会西部会(福岡)、SY2、瀬古裕也、田中靖人、伊藤義人、シンポジウム 2-6 NAFLD における PNPLA3, TLL1 遺伝子多型を用いた線維化リスク分類

[図書](計0件)

[産業財産権](計0件)

出願状況(計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 義人 (Itoh Yoshito) 京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：70244613

(2) 研究分担者

山口 寛二 (Yamaguchi Kanji) 京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50381950

(3) 連携研究者

藤田 潤 (Fujita Jun) 京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50173430

伊藤 克彦 (Itoh Katsuhiko) 京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80725812