

令和元年6月10日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10565

研究課題名(和文) 肝細胞癌発癌過程におけるオートファジーを介した分子制御機構の解明および臨床的意義

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism through autophagy in carcinogenesis of hepatocellular carcinoma

研究代表者

坂田 純 (Sakata, Jun)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：70447605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌でのNrf2の恒常的活性化は、グルコースからのUDP-グルクロン酸合成、グルタミンからのグルタチオン合成を促進させることが明らかになった。また、UDP-グルクロン酸およびグルタチオンの産生亢進によりリン酸化p62をもつ肝細胞癌細胞は抗癌剤に対する薬剤耐性を獲得し、グルタチオンの産生亢進により腫瘍の増殖が促進されることが明らかになった。さらに、ヒトの肝細胞癌の腫瘍サンプルでp62、リン酸化p62、KEAP1特異的抗体を用いた免疫組織染色および二重免疫蛍光染色を実施したところ、HCV陽性肝細胞癌でこれらのタンパク質が共局在して発現していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、オートファジーやNRF2の研究の中でも、肝細胞癌(HCC)に焦点を当ててp62-KEAP1-NRF2経路活性化の意義を明らかにした点である。また、本研究の結果は、リン酸化p62およびKEAP1の相互作用を標的としたHCC、特にHCV陽性HCCに対する創薬事業にもフィードバックできる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：p62/Sqstm1 is a multifunctional protein involved in cell survival, growth and death, that is degraded by autophagy. Amplification of the p62/Sqstm1 gene, and aberrant accumulation and phosphorylation of p62/Sqstm1, have been implicated in tumour development. We revealed the molecular mechanism of p62/Sqstm1-dependent malignant progression in carcinogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC), and suggest that molecular targeting of p62/Sqstm1 represents a potential chemotherapeutic approach against HCC. Phosphorylation of p62/Sqstm1 at Ser349 directs glucose to the glucuronate pathway, and glutamine towards glutathione synthesis through activation of the transcription factor Nrf2. These changes provide HCC cells with tolerance to anti-cancer drugs and proliferation potency. Phosphorylated p62/Sqstm1 accumulates in tumour regions positive for hepatitis C virus.

研究分野：外科腫瘍学、消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 オートファジー p62 KEAP1 Nrf2

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内の分解オルガネラであるリソソームにより細胞内成分を分解する機構である。恒常的に起こっているオートファジーはミトコンドリア等のオルガネラホメオスタシスやシグナル伝達を担う分子の量的調整を行うことにより細胞恒常性維持、ひいては個体としての健康維持に貢献するとされる。

一方、KEAP1-NRF2 システムにおいて、KEAP1 はセンサーとして働き、NRF2 は転写因子として生体防御酵素群の遺伝子発現を活性化するとされる。細胞が活性酸素や親電子性物質などのストレスに曝されると、KEAP1 による NRF2 の分解が停止して、NRF2 が活性化し、NRF2 は核内へ移行して、抗酸化タンパク質や抗炎症性酵素の遺伝子発現を活性化し細胞を保護すると報告されている。

オートファジーは一般に基質選択性の低い分解経路と今まで定義されてきたが、近年、ユビキチンシグナルを介した選択的なオートファジーが注目を集めている。選択的オートファジーと KEAP1-NRF2 経路が p62 のリン酸化を介して連動していることが報告されている。p62 のリン酸化は選択的オートファジー発動時に起こるが、肝細胞癌 (HCC) 患者組織においては恒常的に p62 が蓄積・リン酸化され、NRF2 が活性化されており、この NRF2 の恒常的活性化が、HCC の微小環境下での生存を可能にすることが報告された。

2. 研究の目的

HCC 患者の病変部において確認されるマロリー体ないしは球状硝子体の主要構成成分である p62 タンパク質のリン酸化が転写因子 NRF2 を活性化し、それが HCC の増悪に関与することが明らかになってきた。しかしながら、HCC における p62 タンパク質の蓄積やリン酸化修飾とウイルス感染、腫瘍ステージ、予後等の臨床情報との関連は、これまでに全く解析されておらず、臨床情報を持つ HCC 患者検体を用いてこれらの解析を行う必要がある。

本研究課題の目的は、申請者が所属する研究室において集積してきた臨床情報を有する HCC 患者組織標本、RNA、タンパク質を用いて p62 および NRF2 の動態解析を実施することにより、HCC における p62 の蓄積・翻訳後修飾と臨床病理学的因子や予後との関連を解明し、HCC 発症の予防や治療法開発の足がかりすることである。

3. 研究の方法

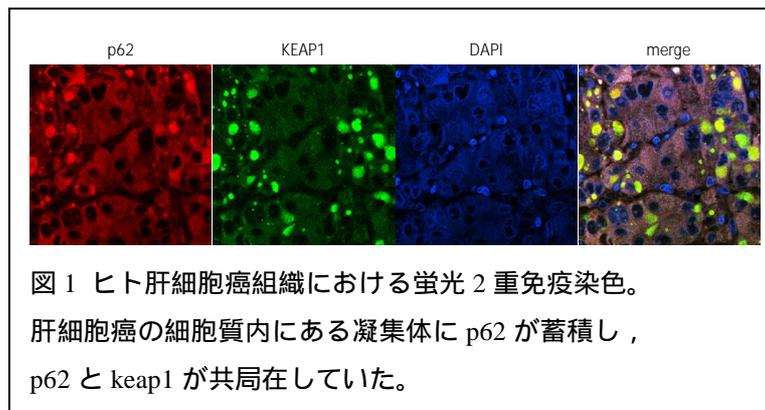
後ろ向きサンプルを用いた免疫組織学的解析

申請者が所属する研究室において 1990 年以降に収集してきた HCC 患者のホルマリン固定標本計 275 検体 (HB 陽性: 61 検体、HC 陽性: 147 検体、nonBnonC: 64 検体、HB 陽性+HC 陽性: 3 検体) を対象として薄切切片を作成し、p62、リン酸化 p62、KEAP1 そして NRF2 の標的である NQO1 の特異的抗体による免疫組織染色および二重免疫蛍光染色を行った (図 1)。

対象患者の臨床病理学的事項 (性別、年齢、ウイルス感染、腫瘍径、腫瘍個数、腫瘍マーカー、組織分化度、脈管侵襲等) 予後 (生死、再発の有無、再発部位等) を病歴または患者・家族へのアンケートによって調査した。それぞれの免疫組織化学の反応性と上述の臨床病理学的因子との関連を Mann-Whitney U test および Kruskal-Wallis test にて、予後との関連を単変量解析 (log rank test)、多変量解析 (Cox 比例ハザード回帰モデル) にて評価した。

前向きサンプルを用いた分子生物学的解析

申請者の所属する研究室において 2013 年より前向きに収集してきた HCC 患者のホルマリン固定標本 (HB: 12 検体、HC: 13 検体、nonBnonC: 15 検体の計 40 検体) の組織切片とそれに対応した RNA を用いた解析を行った。具体的には、RNA 試料を用い real-time PCR 法により NRF2 の標的遺伝子の発現、特に NRF2 依存的ながん代謝に関与することが明らかになったペントースリン酸経路やグルタミンオリシスに関与する酵素群の遺伝子発現を検証した。



4. 研究成果

ヒトの HCC の腫瘍サンプルで p62、リン酸化 p62、KEAP1 特異的抗体を用いた免疫組織染色および二重免疫蛍光染色を実施したところ、HCV 陽性 HCC でこれらのタンパク質が共局在して発現していることが示された (図 2)。

HCC での Nrf2 の恒常的活性化は、グルコースからの UDP-グルクロン酸合成、グルタミンからのグルタチオン合成を促進させることが明らかになった。また、UDP-グルクロン酸およびグルタチオンの産生亢進によりリン酸化 p62 をもつ HCC 細胞は抗癌剤に対する薬剤耐性を獲得し、グルタチオンの産生亢進により腫瘍の増殖が促進されることが明らかになった (図 3)。

本研究の学術的意義は、オートファジーや NRF2 の研究の中でも、

HCC に焦点を当てて p62-KEAP1-NRF2 経路活性化の意義を明らかにした点である。また、本研究の結果は、リン酸化 p62 および KEAP1 の相互作用を標的とした HCC、特に HCV 陽性 HCC に対する創薬事業にもフィードバックできる可能性があると考えている。現在、オートファジー-リソソーム系を標的にした治療薬の治験が進められている。その多くはリソソームの酸化を阻害するクロロキン類であり、今後はオートファジーに特異的な薬剤の開発が期待される。しかしながら、オートファジー、p62、Nrf2、mTORC1 のいずれに関しても、悪性腫瘍だけではなく正常細胞の恒常性維持に必要不可欠であるため、正常細胞に影響を与えない程度のオートファジー調整薬が望まれている。

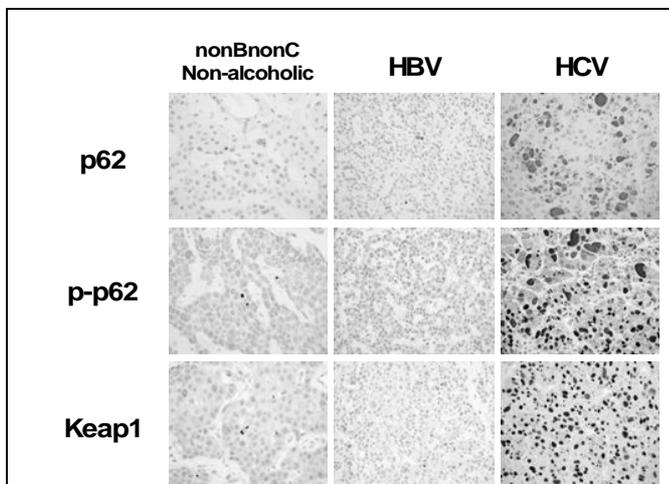


図 2 ヒト HCC の癌部における免疫組織化学。HCV 関連 HCC の細胞質内に p62, リン酸化 p62, Keap1 の集積を認めた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Saito T, Ichimura Y, Taguchi K, Suzuki T, Mizushima T, Takagi K, Hirose Y, Nagahashi M, Iso T, Fukutomi T, Ohishi M, Endo K, Uemura T, Nishito Y, Okuda S, Obata M, Kouno T, Imamura R, Tada Y, Obata R, Yasuda D, Takahashi K, Fujimura T, Pi J, Lee MS, Ueno T, Ohe T, Mashino T, Wakai T, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Motohashi H, Waguri S, Soga T, Yamamoto M, Tanaka K, Komatsu M.

p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. Nat Commun. 査読有;7:12030,2016. doi: 10.1038/ncomms12030.

2. 坂田 純, 廣瀬雄己, 齊藤哲也, 小松雅明, 若井俊文. 肝細胞癌発癌過程におけるオートファジーを介した分子制御機構の解明. Medical Science Digest. 査読無;43:331-333,2017.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：若井 俊文
ローマ字氏名：WAKAI Toshifumi
所属研究機関名：新潟大学
部局名：医歯学系
職名：教授

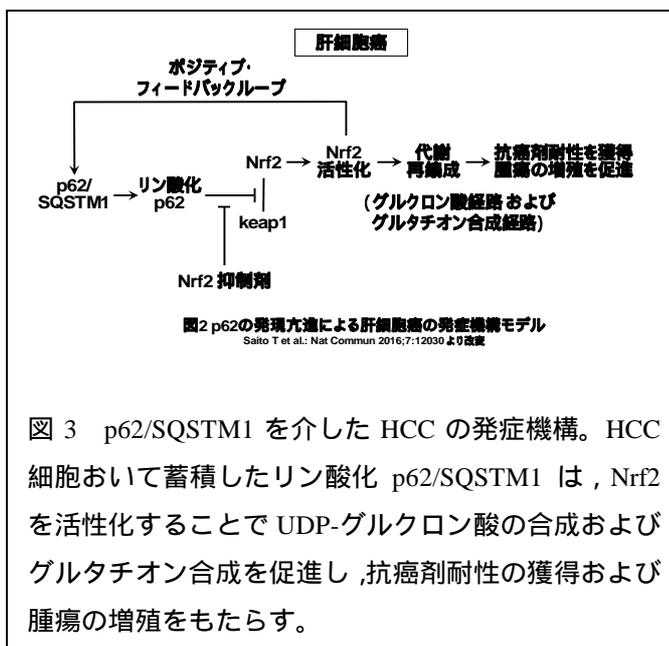


図 3 p62/SQSTM1 を介した HCC の発症機構。HCC 細胞において蓄積したリン酸化 p62/SQSTM1 は、Nrf2 を活性化することで UDP-グルクロン酸の合成およびグルタチオン合成を促進し、抗癌剤耐性の獲得および腫瘍の増殖をもたらす。

研究者番号：50372470

研究分担者氏名：小林 隆
ローマ字氏名：KOBAYASHI Takashi
所属研究機関名：新潟大学
部局名：医歯学総合病院
職名：講師
研究者番号：40464010

(2)研究協力者

研究協力者氏名：廣瀬 雄己
ローマ字氏名：HIROSE Yuki

研究協力者氏名：三浦 宏平
ローマ字氏名：MIURA Kohei

研究協力者氏名：石川 博補
ローマ字氏名：ISHIKAWA Hirotsuke

研究協力者氏名：須藤 翔
ローマ字氏名：SUDO Natsuru

研究協力者氏名：安藤 拓也
ローマ字氏名：ANDO Takuya