

令和元年6月19日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15937

研究課題名(和文) レチノイド核内受容体RXR 遺伝子改変マウスを用いた新規NASH肝癌治療法の開発

研究課題名(英文) The development of novel therapy for NASH-related hepatocellular carcinoma using RXR-alpha genetically modified mice

研究代表者

境 浩康 (SAKAI, HIROYASU)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40738259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸化RXR が肝発癌に及ぼす影響についてRXR 遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。この遺伝子改変マウスは肝発癌剤であるDiethylnitrosamine投与に対して、対象マウスと比較して有意な肝腫瘍形成を認めた。また、この肝腫瘍ではPCNA陽性細胞が有意に増加し、細胞周期調節因子であるcyclin D1遺伝子/蛋白発現の増加も認めた。さらに、cyclin D1の発現調節に関わる b-catenin蛋白の増加も確認された。以上の結果から、リン酸化RXR は b-catenin/cyclin D1を介した増殖シグナルを亢進させることでin vivoの肝化学発癌に関与する事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌は本邦において癌死亡率の上位を占める悪性疾患であり、早期診断・治療のみならず、積極的な介入による発癌予防を含めた包括的な対策が求められている。特に、近年では肥満や脂肪肝を背景としたNASH肝癌が増加しており、その詳細な病態解明と有効な肝癌治療法(薬)の開発、及び、臨床への応用は緊急の課題となっている。

現時点でNASH肝発癌モデルの確立には至っていないが、本研究を通して、リン酸化RXR 受容体がin vivoの病態(DEN肝発癌・耐糖能異常)に関与することが明らかになった。今回、in vivoでのエビデンスが示せたことは、「ヒト創薬への応用」を目指す上での大きな一歩となる成果であった。

研究成果の概要(英文)：The role of phosphorylated-RXRα (p-RXRα) on the development of liver tumorigenesis was investigated by using RXRα genetically modified mice. The transgenic mice were more susceptible to the treatment of diethylnitrosamine (DEN), and developed more liver tumors compared to the control mice. In addition, liver tumors observed in the transgenic mice had more PCNA positive cells, indicating that those tumors had high proliferative capacity. Besides, increased mRNA and protein expressions of cyclin D1 were observed in transgenic liver tumors, and the protein expressions of either p-Rb or PCNA, both of which are the downstream targets of cyclin D1, were also increased in those liver tumors. Interestingly, the transgenic liver tumors had more b-catenin protein expression, which regulates the expression of cyclin D1. Thus, these results indicate that the p-RXRα is associated with the development of DEN-induced liver tumorigenesis by promoting b-catenin/cyclin D1 signaling pathway.

研究分野：消化器内科

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 NASH 肝細胞癌 レチノイド 核内受容体 RXR 肝化学発癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ビタミンAの誘導体であるレチノイドは、肝細胞の恒常性(分化・増殖・死)維持において重要な働きをしている。これまでに我々の教室では、レチノイド核内受容体の1つである、Retinoid X Receptor- (RXR) がヒト肝癌においてリン酸化修飾を受け、機能不全に陥っていることを明らかにした。具体的には、リン酸化修飾を受けたRXR受容体は、正常なRXR受容体の機能を阻害することでレチノイドシグナル伝達を妨げ、肝発癌に関与することが肝癌細胞株を用いた研究で明らかになった。これらの事実は、リン酸化修飾を受けたRXR受容体(以下、リン酸化RXR)がヒト肝癌治療の分子標的となり得ることを示唆するものであった。

(2) 近年、肥満に代表されるメタボリック症候群患者の増加に伴い、その肝臓における表現形としての脂肪肝や非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)患者が増加している。特に、NASHから肝硬変への進展や、NASHを背景とした肝癌(NASH肝癌)の増加が臨床問題となっているが、その病態については不明な点が多く、現時点で有効な予防法や治療法は確立されていない。

(3) NASHの病態形成にはインスリン抵抗性が重要な役割を果たしており、高インスリン状態によるRaf/MAPK/Erkシグナルの活性化が報告されている(*Hepatology*, 2011)。さらに、“RXR受容体はRaf/MAPK/Erkシグナルによって恒常的なリン酸化修飾を受け、機能不全状態に陥る”という我々の既報(*Hepatology* 2002, *Cancer Research* 2002, *Carcinogenesis* 2003)をふまえると、NASHにおいてもRXR受容体のリン酸化修飾と、その機能不全(NASH肝癌への関与)が予想された。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、細胞の「分化・増殖・死」といった幅広い領域に影響を及ぼすレチノイド核内受容体RXRの機能異常(リン酸化型RXR)が、肝発癌機構において重要な働きをしていることをin vivoにおいて明らかにし、その詳細なメカニズムを解明することで、臨床の場において有用な新規肝癌治療薬を開発することを目的とする。

(2) その上で、近年社会問題となっている非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病態形成におけるリン酸化型RXRの関与について検討を行う。また、NASH肝発癌におけるリン酸化型RXRの役割について検討を行い、その詳細な分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

以下(1)(2)の方法を用いてリン酸化型RXRと肝発癌の関与について検討を行った。

(1) 肝化学発癌の背景にある分子メカニズムの同定: 予備実験において、RXR遺伝子改変マウスはDENに対して高感受性を示し、対照群と比較して有意な肝腫瘍数・腫瘍体積の増加を認めた。RXR受容体は細胞増殖・アポトーシスの制御に関与することから、DENによって誘発された肝腫瘍における細胞周期・アポトーシス制御分子の発現をウエスタンブロットティングやリアルタイムPCR法を用いて定量的に評価する。

(2) 非アルコール性肝癌モデル(NASH肝癌モデル)の確立: RXR遺伝子改変マウスに高脂肪食やコリン欠乏食といった特別餌を投与することによってインスリン抵抗性を誘導し、脂肪肝やNASHの病態を確立する。肝腫瘍確認の際には、DENモデル同様に肝腫瘍の分子生物学的・組織学的な評価を行いNASH肝癌において重要な分子異常を同定する。

4. 研究成果

(1) 肝化学発癌モデルにおける成果: リン酸化型RXRが肝化学発癌に及ぼす影響について、肝化学発癌モデルとして一般的なDiethylnitrosamine(DEN)モデルを用いて検討を行った。RXR遺伝子改変マウスをリン酸化型RXR発現群と非発現群(対照群)の2群に分け、DEN(25mg/kg)を生後15日で腹腔内投与した後、月齢6ヶ月で屠殺・解剖し、DENに対する発癌感受性を検討した。リン酸化RXR発現群では、対照群と比較して肝腫瘍の総数や腫瘍最大径が有意に増加し、総腫瘍に占める肝細胞癌の割合も有意に増加した。また、遺伝子改変マウスの肝腫瘍では細胞周期に関与するCyclin D1、リン酸化Rb、PCNA蛋白発現の増加を認めた。さらに、Cyclin D1の発現調節に関わる-catenin蛋白の増加も確認した。このように、リン酸化型RXRは-catenin/Cyclin D1を介した増殖シグナルを亢進させることによってDEN肝発癌に関与することが明らかになった。

(2)非アルコール性肝癌モデル (NASH 肝癌モデル) における成果：遺伝子改変マウス・対照マウスを6ヶ月間自然観察したが脂肪肝・脂肪肝炎の程度に差を認めなかった。しかし、高脂肪食を4週間投与したところ、遺伝子改変マウスは対照マウスと比較して明らかな耐糖能異常を示した。また、遺伝子改変マウスの肝臓では、脂肪酸代謝に関与する Peroxisome Proliferator Response Element (PPRE)の転写活性が対照マウスと比較して有意に低下した。これらの結果は、リン酸化型 RXR の糖脂質代謝への関与を示唆するものと考えられた。現在、観察期間を延長し、脂肪肝やNASH、肝腫瘍形成が誘導されるか確認を行っている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Shirakami Y, Kochi T, Kubota M, Sakai H, Ibuka T, Yoshimi K, Kuramoto T, Tanaka T, Shimizu M, Seishima M. Inhibitory effects of pentoxifyline on inflammation-related tumorigenesis in rat colon. *Oncotarget*. 2018 Sep21;9(74):33972-33981. doi: 10.18632/oncotarget.26119. 査読有

Ideta T, Shirakami Y, Ohnishi M, Maruta A, Obara K, Miyazaki T, Kochi T, Sakai H, Tomita H, Tanaka T, Blaner WS, Shimizu M. Non-alcoholic steatohepatitis-related liver tumorigenesis is suppressed in mice lacking hepatic retinoid storage. *Oncotarget*. 2017 Aug 7;8(41):70695-70706. doi:10.18632/oncotarget.19978. 査読有

Shirakami Y, Ohnishi M, Sakai H, Tanaka T, Shimizu M. Prevention of Colorectal Cancer by Targeting Obesity-Related Disorders and Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 26;18(5):pill:E908. doi: 10.3390/ijms18050908. 査読有

Obara K, Shirakami Y, Maruta A, Ideta T, Miyazaki T, Kochi T, Sakai H, Tanaka T, Seishima M, Shimizu M. Preventive effects of the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic mice. *Oncotarget*. 2017 Apr 6;8(35):58353-58363. doi: 10.18632/oncotarget.16874. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

境 浩康、白上洋平、清水雅仁：マウス肝再生における Retinoid X Receptor- α の役割に関する研究, 日本レチノイド研究会 第29回学術集会, 2018年10月27日 熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：<https://hosp.gifu-u.ac.jp/1naika/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者：該当なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者：該当なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。