

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006 年 ～ 2008 年
 課題番号：18590744
 研究課題名（和文） 新規癌関連遺伝子 FIP200 の肝細胞癌増殖における分子機構解析
 研究課題名（英文） Investigation of a new tumor suppression gene, FIP200, protein function in human hepatocellular carcinoma
 研究代表者 上田 弘樹
 和歌山県立医科大学・医学部・講師
 40347604

研究成果の概要:新規がん抑制遺伝子 FIP200 は培養肝がん細胞およびヒト組織において発現していることが確認された。in vitro の実験において肝がん細胞のアポトーシスを誘導することが判明し、また、ヒト肝癌組織においてその発現レベルは、非癌部組織と比較して減弱しており、肝発癌と密接に関連していると考えられた。これらにより肝がん治療における新たな分子標的のひとつとなる可能性が示唆され、また、文化度判定にも有用であることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18 年度	1,100,000 円	0 円	1,100,000 円
19 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
20 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	660,000 円	3,960,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 消化器内科学

キーワード：癌、シグナル伝達、FIP200、肝臓

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、本邦ではそのほとんどが 300 万人ともいわれる B 型、C 型肝炎ウイルスの持続的感染による慢性進行性肝疾患、特に肝硬変を背景に発症する。近年の新しい治療法の開発、進歩

にもかかわらず年間 3 万人以上が肝細胞癌を発症し、死亡者数は増加の一途をたどり、男性癌死亡の第 3 位、女性では第 4 位を占めるにまで至っており、肝細胞癌の増殖のメカニズムを解明し、従来の治療法では治療効果は期待できない症例に対する新たな治

療法の確立が求められている。

肝炎ウイルス関連慢性肝疾患に関連する肝細胞癌の発生と進展は、多段階的に達成されると考えられており、各々の過程で複数の遺伝子異常と機能分子の発現異常が明らかになりつつある。それらには肝での慢性炎症と肝細胞の破壊、再生、増殖に関連する現象と、感染したHBV、HCVウイルスそのものに関連する病的現象が背景にある。前者においては、癌遺伝子、癌抑制遺伝子、ミスマッチ修復遺伝子、等の変異が蓄積し癌化すると考えられており、これらの中で最も重要で研究されているものに「ゲノムの守護神」と呼ばれるp53癌抑制遺伝子がある。これは細胞周期のG1期/S期境界での停止、アポトーシス誘導、DNA修復促進や血管新生抑制に関与している蛋白で、肝細胞癌においてもp53の変異あるいはフィードバック調節因子(MDM2等)の発現亢進に伴う機能減弱や発現減弱などが報告されている。

HBV、HCVウイルスに関連する病的現象としては、HBx蛋白(HBVのX遺伝子産物)がp53と細胞質内で結合して、核内への移行を阻害して、p53を不活化しアポトーシス誘導を低下させていること、HCVのコア蛋白が肝細胞内においてMAPKカスケードを活性化し、肝細胞の増殖亢進に関連していることや、HCVの非構造蛋白がp53を不活化しアポトーシス誘導を低下させていることが最近、明らかとなってきている。これらの報告より肝細胞癌においてはp53癌抑制遺伝子を軸とした経路が障害されており、このp53経路の安定化や再活性化は肝癌治療に非常に有用であると考えられる。

一方、近年、我々は接着因子の一つであるインテグリンのシグナル伝達

に必須であるFocal Adhesion Kinase (FAK)のキナーゼ領域に結合し活性を阻害する分子量200kDaの蛋白「FIP200」を発見し、報告したが(Ueda H et al. J Cell Biol. 2000 Apr 17;149(2):423-30.)、最近このFIP200がp53と結合し、p53の安定化、活性化を促進する機能を有し、その結果アポトーシスを誘導するなど新たな癌関連遺伝子であることが見出された。(Melkounian ZK et al. Cancer Res. 2005 Aug 1;65 (15): 6676- 84.) FIP200は正常肝細胞で発現していることは確認されているが肝細胞癌での発現の亢進や減弱、また細胞増殖に対する機能はまったく不明である。従って本研究の目的は、肝癌の進展増殖に対するFIP200の役割を明らかにし、肝癌増殖抑制のための新たな分子標的を確立することであり、将来的には肝癌を抑制しうる新たな治療法の開発を目指した。

2. 研究の目的

我々の発見したFIP200蛋白はFocal Adhesion Kinase (FAK)のキナーゼ領域に結合し活性を阻害することでインテグリンのシグナル伝達を阻害するinhibitorとして考えられてきた。しかし近年、FIP200がp53と結合し、p53の安定化および活性化を促進する機能を有し、新たな癌関連遺伝子であることが見出された。p53はDNA傷害、低酸素などの細胞ストレスやがん遺伝子などにより活性化され、細胞周期のG1期/S期境界での停止、アポトーシス誘導、DNA修復促進や血管新生抑制など発癌抑制に深く関与している。

肝細胞癌においてはそのp53の機能や発現が低下していることが多数報告されており、その原因のひとつとして、肝癌細胞内でのFIP200の発現が正

常肝と比し、低下もしくは消失していることが十分に予想される。本研究ではそのFIP200の発現の程度を直接検証するものであり、肝細胞癌増殖のメカニズム解明の一端として学術的意義は高いと考える。また、FIP200の発現亢進はp53を介して強力な細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導能を有することが予想され、この仮説を本研究課題の基礎的検討により検証する。

将来的には肝細胞癌の発症・進展におけるFIP200/p53に関連するメカニズムを解明し、ひいては新たな治療のターゲットを見出すことができるかと推定され、臨床的意義は高いと考える。また、p53がん抑制遺伝子の異常はヒトがんの中で最も高頻度に見られる遺伝子異常であり、肝細胞癌のみならず他の領域の癌の増殖進展阻止の新たな治療法についても開発できることが期待できる。

3. 研究の方法

基礎的実験として、肝癌培養細胞として p53 が野生型、変異型(Y220C)、変異型(R249S)、失欠型である HepG2, HuH7, PLC/PRF/5, Hep3B の4種類を用いた。内因性 FIP200 の発現は、各培養細胞を培養後、蛋白質を回収し抗 FIP200 抗体を用いた western blotting 法で検討した。FIP200 の肝癌細胞増殖への関与を検討するためブロモデオキシウリジン(BrdU)法を用いた。HA-tagged FIP200 cDNA をエンコードするベクターを各培養細胞にトランスフェクションし、FIP200 の発現の検出に抗 HA 抗体を、生細胞の検出に anti-BrdU 標識抗体を用いて蛍光染色し、陽性細胞をカウントして増殖率を計算した。これと対照群と比較し細胞増殖がどう変化するかを検討した。アポトーシス誘導の同定

には BrdU 法のかわりに TUNEL 法を用い同様に検討した。

臨床的検討として外科的切除で得られた肝細胞癌組織を用いて FIP200 蛋白の発現を検討している。また同時に組織学的悪性度との関連性も検討した。IRB の承認後、当院消化器外科において切除術を施行された肝細胞癌患者のうちインフォームドコンセントを行い文書にて同意が得られた 14 例の癌部及び非癌部の組織を用いた。組織の一部をホルマリン固定し切片を作製し、抗 FIP200 抗体を用いて免疫染色を行い発現度を検討した。発現の度合いは癌部、非癌部で差があるか比較検討し、さらに、分化度との関連性も検討した。

4. 研究成果

培養細胞の検討では、内因性の FIP200 は各肝癌細胞にわずかながら発現されており、細胞群間ではわずかに発現度合いに差が認められた。細胞増殖率の検討においては、HepG2, HuH7, PLC/PRF/5 では増殖が抑制されており、特に HepG2 で著明であった。一方、p53 が失欠している Hep3B では増殖は抑制されていなかった。アポトーシスの検討では、HepG2 で FIP200 の過剰発現が認められる細胞に高率にアポトーシスが認められた。Hep3B においては過剰発現細胞と対照と比較して有意な差は認められなかった。結果、内因性 FIP200 蛋白はいずれの細胞にも微量ながら発現していた。FIP200 は肝細胞癌に対して増殖抑制作用、アポトーシス誘導能を有していた。その作用は主に p53 を介していると考えられた。

臨床検討では、内因性 FIP200 は免疫染色および Western blotting において全肝癌細胞組織および非癌部組

織に発現されているのが確認された。免疫染色においてFIP200は主として細胞質に顆粒状に発現していた。また、全症例においてFIP200は癌部において非癌部より発現の減弱が認められた。さらに、同一組織において分化度が異なる領域を比較した際、高分化、中分化、低分化と分化度が低くなるにつれ発現レベルが減弱している傾向が強く認められた。結論として、FIP200蛋白質は実際のヒト組織においても発現していることが確認された。その発現レベルは、癌組織は非癌部組織と比較して減弱しており、肝発癌と密接に関連していると考えられた。

また、分化度と発現レベルが相関しており、FIP200は肝癌において悪性度に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

- ① 上田弘樹、田中寛人、一ノ瀬正和、上野昌樹、内山和久、山上裕機：肝細胞癌における癌関連遺伝子FIP200蛋白質の発現と分化度との関連。第44回日本肝臓学会総会，松山市，2008.06.05
- ② HIROKI UEDA，HIROTO TANAKA，MASAKAZU ICHINOSE：FIP200, a novel tumor suppressor protein, suppresses cell cycle progression through P53 in Hepatocellular carcinoma. Digestive Disease Week (DDW) 2008, 2008.05.21, San Diego, U.S.A
- ③ 上田弘樹、田中寛人、喜田洋平、福地寛子、一ノ瀬正和：肝細胞癌における新規癌関連遺伝子FIP200

蛋白質の発現と癌増殖抑制作用の検討。第43回日本肝臓学会総会，東京，2007.05.31

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 弘樹
和歌山県立医科大学・医学部・講師
40347604

(2) 研究分担者

一ノ瀬 正和
和歌山県立医科大学・医学部・教授
80223105

(3) 連携研究者

なし