

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07915

研究課題名(和文) 肝線維化および肝発がんにおけるTLL1-TGF 相互活性化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of TLL1-TGF-beta interaction in the development of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma

研究代表者

堤 進(浜田進)(Hamada-Tsutsumi, Susumu)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：30367693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎治療後の発がんリスクを高めるTLL1遺伝子多型(リスクアレル)を持つ患者では、短いTLL1 mRNAが増加していることを我々は突き止めた。メタロプロテアーゼであるTLL1は発がんプロモーターであるANGPTL2を切断することから発がんに抑制的に働くことが予想される。短いTLL1 mRNAがコードするTLL1はC末端を欠損しておりメタロプロテアーゼ活性を示さない。したがって、リスクアレル保因者では機能を失ったTLL1が増加し発がんリスクが高まる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C型肝炎は強力な抗ウイルス薬の登場により完全治癒が可能となったが、その後の肝発がんリスクは依然として高い。発がんリスク上昇に関与する TLL1 遺伝子多型を持つ患者の肝臓内では短いTLL1 mRNAの比率が上昇しているが、本研究ではそのmRNAがコードするTLL1は機能欠損型であり、発がんプロモータ分子ANGPTL2の分解活性を持たないことを示した。TLL1の発がん抑制メカニズムを詳細に解析を進めることにより、C型肝炎治療後の肝発がんを抑制可能な分子ターゲットを同定できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that short transcript variants of the TLL1 gene was increased in patients who have the risk allele of a polymorphism in the TLL1 gene which is associated with hepatocellular carcinoma development after cure of hepatitis C. TLL1 is known to cleave one of oncogenic proteins, ANGPTL2 suggesting that TLL1 act as a tumor suppressor protein. Protease assay revealed that c-terminal-truncated TLL1 encoded by the short transcript variants do not have enzymatic activity, suggesting that the increase of non-functional TLL1 may be insufficient for interfere oncogenic function of ANGPTL2 in the patients with TLL1 risk allele.

研究分野：分子生物学

キーワード：肝繊維化 発がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

優れた抗ウイルス薬の開発により C 型肝炎ウイルス (HCV) の排除が可能となった。しかし HCV 排除後も肝線維化および肝発がんのリスクは依然として高い。我々は Tollid-like 1 (TLL1) 遺伝子内多型 rs17047200 (A/T) のうちリスクアリル T を保有する患者は、HCV 排除後の肝発がん率が約 2.4 倍高いことをゲノムワイド関連解析により同定した。TLL1 には 2 種の転写産物が報告されており、それぞれ全長 mRNA (variant 1)、および 3' 側配列を欠損した短鎖 mRNA (variant 2) に対応する。興味深いことに、リスクアリル T 保因者の肝がん組織では全長 mRNA に対して短鎖 mRNA の比率が有意に増加しており、この差異が発がんに寄与する可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

TLL1 は分泌型メタロプロテアーゼファミリーに属する酵素をコードしている。さまざまな細胞外分子がその標的基質として報告されているが、そのうちコラーゲン前駆体や TGF の活性化に必須である LTBP1 は組織繊維化の主要なプロモーターである。さらに、HCV 感染患者では線維化進展に伴い TLL1 の発現が上昇していること、肝繊維化に主要な役割を担う肝星細胞 (肝臓内線維芽細胞) を TGF で処理すると TLL1 の発現が誘導されることを見出した。以上から TGF と TLL1 が互いの活性化を誘導することにより C 型肝炎患者において炎症・繊維化が亢進し発がんリスクが増大する可能性が考えられる。しかし、肝臓における TLL1 の機能の報告例は皆無である。本研究では TLL1 の機能と、TGF をはじめとする炎症関連分子の関係を詳細に解明することを旨とした。

### 3. 研究の方法

#### TLL1 発現定量

初代ヒト肝細胞、初代ヒト肝星細胞、不死化ヒト肝星細胞 LX-2、肝がん由来細胞株 HuH-7 を 5 ng/mL の組換え TGF で処理し、24 時間後、mRNA を回収し cDNA 合成を行なった。各サンプルに対し TLL1 の発現量を定量 PCR を用いて測定した。qPCR には、全長および短鎖 mRNA を増幅可能なプライマーセット (Exon 5-6 間)、全長 mRNA のみを増幅可能なプライマーセット (Exon 20-21 間) に加え、Exon 7-8 間および Exon 8-9 間を増幅可能なプライマーセットを用いた。初代ヒト肝星細胞を組換え TGF で処理し、24 時間後の mRNA に対し、イルミナ社 MiSeq を用いて次世代シーケンズ解析を行なった。

#### TLL1 メタロプロテアーゼ活性測定

TLL1 全長 mRNA がコードする全長タンパク、短鎖 mRNA 候補 variant 2、variant 3、variant 4 がコードする C 末端欠損タンパクを CMV プロモーターで強制発現するプラスミドベクターを構築した。このベクターは TLL1 タンパクの C 末端側に MycHis タグが付加されるように設計した。これを 293T 細胞へ導入し、72 時間後に培養上清を回収した。培養上清に存在する各組換え TLL1 タンパクをニッケル-セファロースカラムで精製したのち、透析により溶媒をプロテアーゼ活性測定バッファーに置換した。得られた組換え TLL1 タンパクと基質であるマウス Chordin、およびヒト ANGPTL2 を混合し、5 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で 37 °C、6 時間反応させプロテアーゼ活性を測定した。

### 4. 研究成果

#### 短鎖 TLL1 mRNA の同定

リスクアリル T 保因者の肝組織では TLL1 短鎖 mRNA の発現比が上昇していたが、その発現を *in vitro* で検証するため、初代ヒト肝細胞、初代ヒト肝星細胞、不死化ヒト肝星細胞 LX-2、肝がん由来細胞株 HuH-7 を用いて定量 PCR (qPCR) を行なった。Exon 5-6 間を増幅するプライマーは TLL1 の全ての mRNA を増幅可能であるが、Exon 20-21 間を増幅するプライマーは全長 TLL1 mRNA のみを増幅する。解析の結果、全ての細胞で Exon 5-6 間の増幅が Exon 20-21 間の増幅を上回っており、その差が TLL1 の短鎖 mRNA (short variants) の量を反映していると考えられる (図

1) 一方、既報の短鎖 mRNA である variant 2 の発現量は極めて低く、この qPCR で推定された短鎖 mRNA の発現量を説明できない。そこで、TLL1 の発現量が最も高かった LX-2 を TGF で処理したサンプルを用いて次世代シーケンス解析を行い、未知の短鎖 TLL1 mRNA の探索を行なった。その結果、Exon 9 および Exon 10 で停止する TLL1 転写産物の存在が確認された。Exon 7 に設計したプライマーと Oligo dT プライマーを用いて rapid amplification of 3' cDNA end を行なった結果、それぞれ

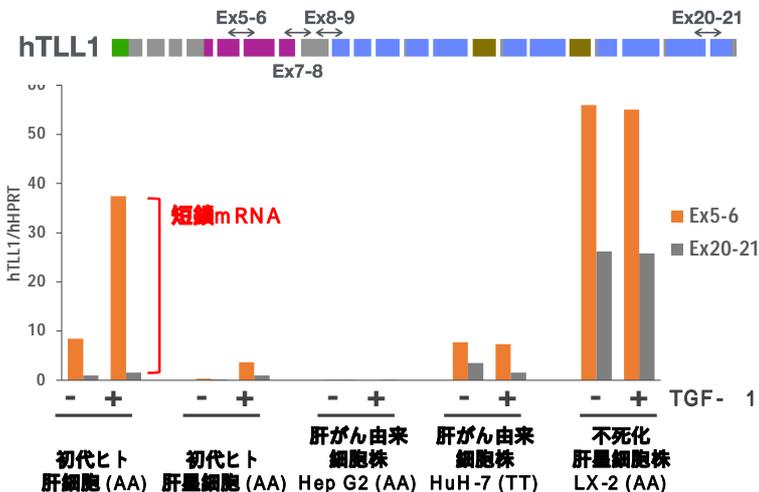


図 1

の転写産物に対応する増幅産物が得られた(それぞれ variant 4, variant 5 と命名)。また、Exon 7-8 間のイントロンの切り出し位置が異なる alternative splicing も存在するが、この構造を持つ mRNA はフレームシフト変異により C 末端側を欠損した ORF をコードすることが判明した (variant 3 と命名)。

### TLL1 タンパクのプロテアーゼ活性測定

次に、リスクアリル T 保因者の肝組織で発現増加していた TLL1 短鎖 mRNA が TLL1 の機能にどう関連するかを調べるため、全長 TLL1 mRNA (variant 1) がコードする全長 TLL1 タンパク、および短鎖 mRNA (variant 2, 3, 4, 5) がコードする C 末端欠損タンパクの組換えタンパクを準備し、既知の TLL1 基質である Chordin を用いてその切断活性を測定した。その結果、全長 TLL1 タンパクは Chordin 切断活性を示したが、C 末端欠損タンパクのいずれも切断活性は観察されなかった (図 2A、variant 4 = hTLL1v4 のみ示す。hBMP1 は TLL1 のホモログ)。

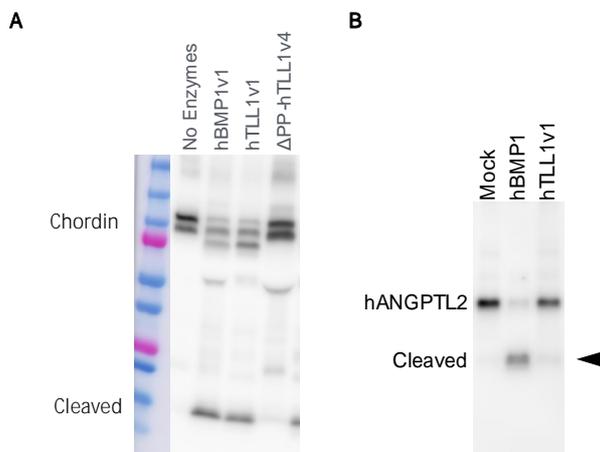


図 2

TLL1 mRNA のうち Exon 1-9 は酵素活性部位、Exon 10-21 は調節領域をそれぞれコードする。TLL1 短鎖 mRNA の variant 2, 3, 4, 5 はいずれも調節領域を欠損している。この領域は標的基質との会合に必須であることから、短鎖 mRNA から翻訳されるタンパクは標的との結合ができないことが示唆された。以上から、リスクアリル T 保因者では機能喪失型 TLL1 が増加していることが推察される。

### 発がん関連分子 ANGPTL2 との関係

最近、TLL1 は炎症、発がん関連分子 ANGPTL2 を切断することが報告された (図 2B)。ANGPTL2 は血管内皮細胞に作用しその成長を促進することが知られている。血管内皮細胞における TLL1 の発現をヒト臍帯血管内皮細胞 HUVEC を用いて測定したところ、興味深いことに、その発現量は肝細胞や肝星細胞を上回っていた。したがって、肝組織における TLL1 の主な供給源は類洞内皮細胞 (肝組織における内皮細胞) である可能性が高い。TLL1 が発がん関連分子 ANGPTL2 に対し抑制的に機能することから、リスクアリル T 保因者の肝組織では機能喪失型 TLL1 が増加することにより ANGPTL2 の切断効率が低下、最終的に発がんにつながる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Kiso A., Toba Y., Tsutsumi S., Deguchi S., Igai K., Koshino S., Tanaka Y., Takayama K., Mizuguchi H | 4. 巻<br>4             |
| 2. 論文標題<br>TLL1 negatively regulates hepatic differentiation of human iPS cells through TGF signaling         | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Hepatology Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>255-267 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/hep4.1466  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kentaro Matsuura, Susumu Tsutsumi, Etsuko Iio, Masanori Isogawa, Yasuhito Tanaka   |
| 2. 発表標題<br>The role of TLL1 in hepatic fibrogenesis and carcinogenesis                        |
| 3. 学会等名<br>The Liver Meeting 2018, American Association for the Study of Liver Diseases（国際学会） |
| 4. 発表年<br>2018年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

|       | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号）                          | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号）                          | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 松浦 健太郎<br><br>(Matsuura Kentaro)<br><br>(30580576) | 名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師<br><br><br><br>(23903) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|