

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09141

研究課題名(和文) Trefoil Factorと肝発癌の関連および肝癌新規治療法開発に関する研究

研究課題名(英文) The role of Trefoil Factors in hepato-carcinogenesis

研究代表者

江畑 智希 (Ebata, Tomoki)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60362258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：TFF1はWnt/b-catenin経路を抑制することで肝細胞癌の発生を抑制する作用を有していることが明らかとなった。すなわち、TFF1はin vitroで肝細胞癌細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導することが確認され、またTFF1欠損マウスでは肝細胞癌の発生が頻繁に認められた。一方、TFF2はPTENの活性化を抑制する事で胆管癌の発生を抑制することが明らかとなった。すなわち、TFF2はin vitroで胆管癌細胞の増殖・浸潤を抑え、細胞死を誘導する事が確認され、またTFF2欠損マウスではBillin および胆管細胞癌が発生した。これらの結果は、各TFFによる肝癌発生抑制効果を証明するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の結果、TFFの3つのサブタイプの内、TFF1は肝細胞癌に対して抑制的に、TFF2は胆管細胞癌に対して抑制的に働くことを示している。しかも、前者はWnt/b-catenin経路に干渉し、後者はPTEN経路に干渉するという、全く異なる作用機序を示している。TFF1とTFF2は非常に似通った構造を持つたんぱく質であるにもかかわらずこのような異なる作用を持つことは非常に興味深く、今後の研究によってこの相違の原因が明らかにされ、かつ肝癌に対する新規治療法の開発に繋がることを期待したい。

研究成果の概要(英文)：We found that TFF1 inhibited Wnt/b-catenin pathway and suppress the development of hepatocellular carcinoma. TFF1 inhibited the proliferative activity and promoted apoptosis of hepatocellular carcinoma cells in vitro, and TFF1-deficient mice developed frequent hepatocellular carcinoma. On the other hand, we found that TFF2 activated PTEN pathway and suppress the development of cholangiocellular carcinoma. TFF2 inhibited the proliferative activity and promoted apoptosis of cholangiocellular carcinoma cells, and TFF2-deficient mice developed frequent Billin and cholangiocellular carcinoma. These results revealed that each TFF functioned as tumor suppressor in hepato-carcinogenesis.

研究分野：腫瘍外科

キーワード：肝細胞癌 胆管癌 TFF

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Trefoil factor family (TFF)は消化管上皮に豊富に発現する分泌型タンパクであり、障害を受けた消化管粘膜の再生に寄与するとされている。TFFには3種類の subtype があり、そのうち TFF1 および TFF2 は主に胃粘膜に発現が認められ、胃粘膜上皮の再生に寄与するとされている。近年、TFF の新たな作用として胃癌に対する癌抑制因子としての作用が報告され、腫瘍学分野において注目されつつある。我々はこれまでの研究で、TFF が膵癌に対しても癌抑制作用を持つことを明らかとしてきた。すなわち TFF1 は膵前癌病変である PanIN や IPMN に豊富に発現しており、これらが間質様性質を獲得して浸潤癌となる過程(EMT: Epithelial Mesenchymal transition)を抑制しており(Yamaguchi J et al. J Clin Invest 2018)、また TFF2 は膵管上皮前駆細胞の分裂をコントロールして腫瘍細胞の無秩序な増殖を阻止している(Yamaguchi J et al. Gastroenterology 2016)。これらから示唆されることは、TFF の各 subtype は異なる癌抑制機構を有しており、それぞれに特有の方法で発癌を抑制しているという事である。一方、TFF と肝発癌との関連についてはこれまでに報告がないが、組織における TFF 発現状況を鑑みれば、膵癌とは異なった機序により肝発癌に関与している可能性が高い。

2. 研究の目的

これまでに TFF の癌抑制因子としての作用は、胃や腸といった消化管でしか検討されてこなかった。とくに肝臓においては TFF の発現が微弱であるため、肝発癌と TFF の関係について検討された例はない。一方、肝臓に発生する悪性腫瘍としては肝細胞癌と胆管細胞癌が挙げられるが、同一臓器でありながら異なる腫瘍が発生する機序については不明な点が多い。本研究の目的は、ヒト肝癌切除標本、培養肝癌細胞、および遺伝子改変マウスモデルを用いることで肝発癌における TFF の癌抑制遺伝子としての役割と機序を検討して明らかにすることであり、さらには肝細胞癌、胆管細胞癌およびその他の悪性腫瘍に対する新たな治療戦略を開拓することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝癌切除標本を用いた研究:名古屋大学医学部附属病院で手術を施行した肝細胞癌および胆管細胞癌を用いて、TFF およびその関連分子の発現状況を免疫染色法により検討した。また標本より DNA を抽出し、TFF 遺伝子の epigenetic な発現制御機構について検討した。

(2) 肝癌培養細胞株を用いた研究:ヒト肝細胞癌培養細胞である Huh7 およびヒト胆管細胞癌培養細胞である HuCCT1, TFK1 を用いて肝癌細胞と TFF 発現の関係を検討した。これらの細胞に TFF1 および TFF2 の強制発現ベクターを導入し、細胞増殖能や細胞浸潤能に対する効果と、各種 pathway に対する影響を検討した。

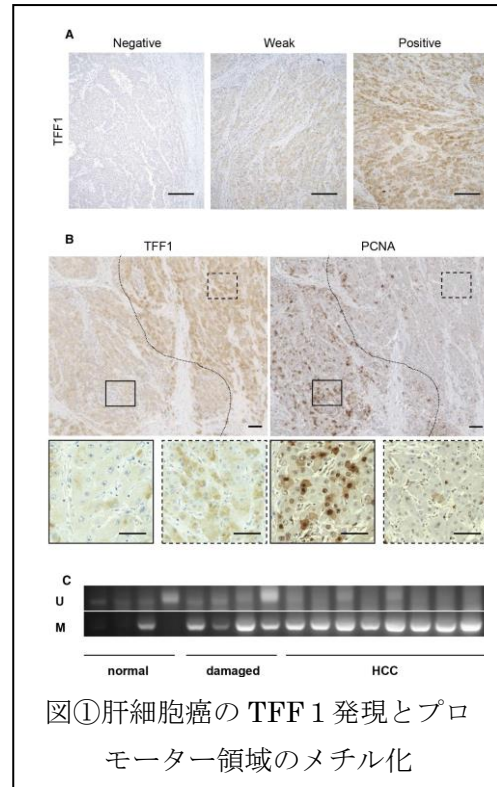
(3) 遺伝子改変マウスモデルを用いた研究:肝発癌マウスモデルである KC マウス (Alb-Cre/LSL-KRAS^{G12D}) を導入した。このマウスに各 TFF 欠損マウスを交配する事で KC/TFF1KO および KC/TFF2KO マウスを作成し、それぞれの肝臓を摘出して観察検討した。

4. 研究成果

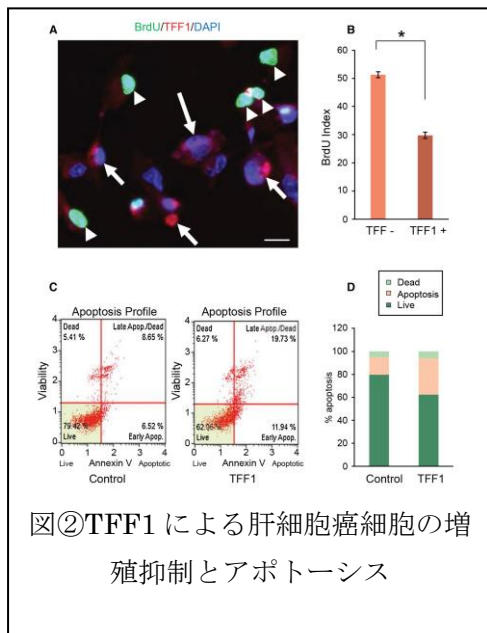
(A) 肝細胞癌

(1) ヒト切除標本を免疫染色で検討したところ、肝細胞癌では TFF1 陽性腫瘍細胞と陰性腫瘍細胞がモザイク状に分布しており、TFF1 陽性細胞では腫瘍の増殖能が低下していることが明らかとなった。また TFF1 プロモーター領域のメチル化を methylation-specific PCR で検討したところ、肝細胞癌では高頻度にメチル化修飾されていることが明らかとなった (図①)。

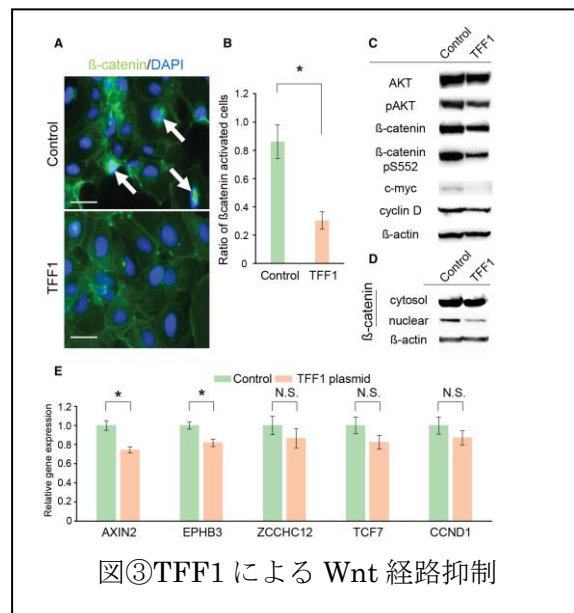
(2) 培養肝細胞癌に対して TFF1 を強制発現させると、細胞の増殖能が抑制され、かつアポトーシスが誘導されることが明らかとなった (図②)。また、TFF1 発現群では Wnt/b-catenin 経路が抑制され、b-catenin の核内移行が抑えられることも明らかとなった (図③)。



図①肝細胞癌の TFF1 発現とプロモーター領域のメチル化



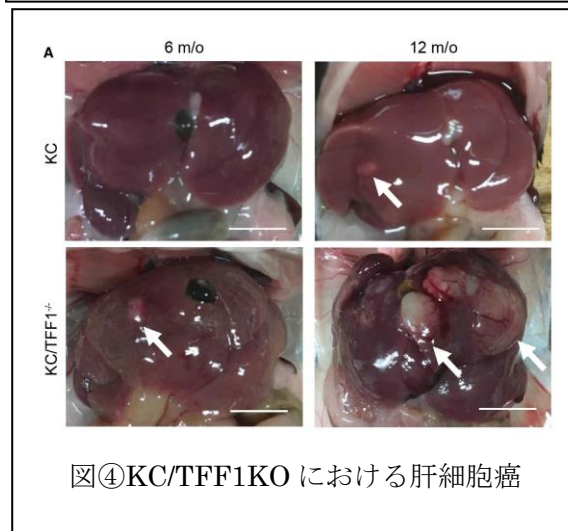
図②TFF1 による肝細胞癌細胞の増殖抑制とアポトーシス



図③TFF1 による Wnt 経路抑制

(3) KC/TFF1KO マウスの肝臓では肝細胞癌の発生が多く (図④)、また β -catenin の核内移行が高頻度に見られることが明らかとなった。

これらの結果から、TFF1 は Wnt/ β -catenin 経路を抑制することによって肝細胞癌に対して腫瘍抑制的な役割を示すことが明らかとなった。

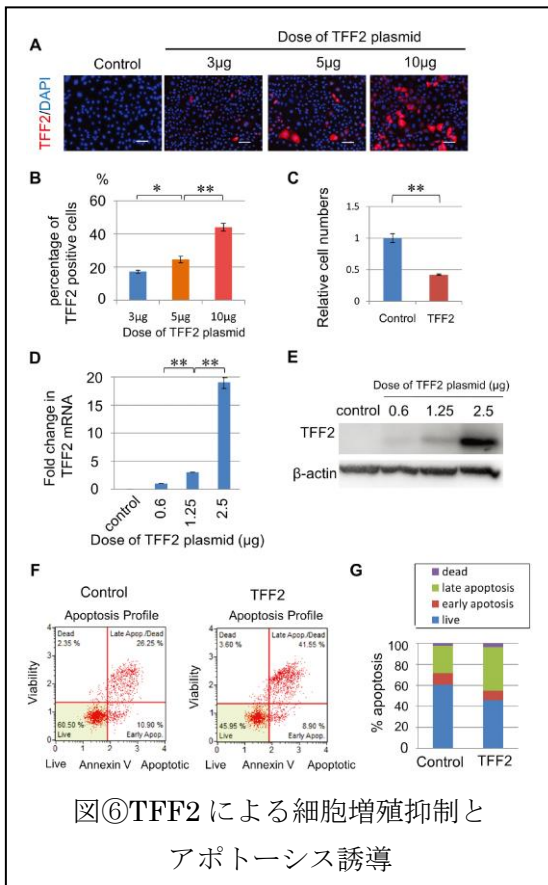


図④KC/TFF1KO における肝細胞癌

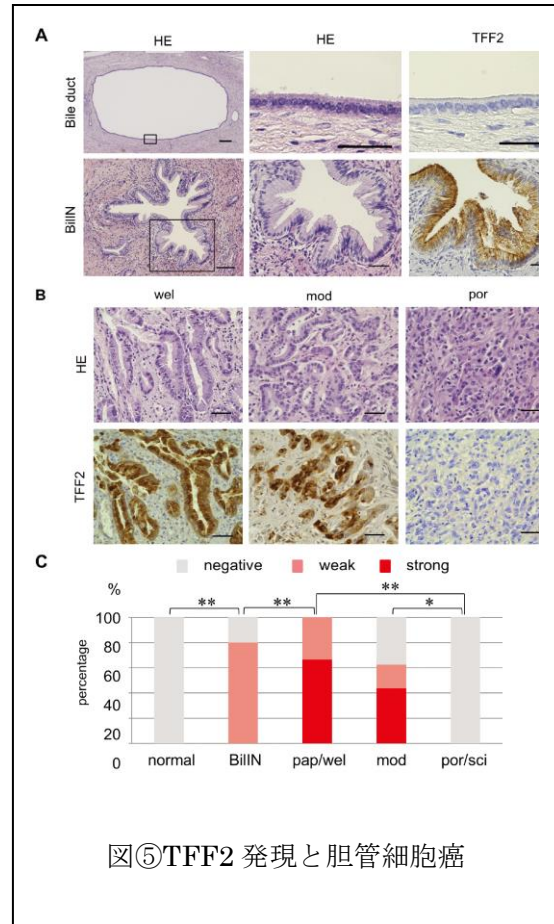
(B) 胆管細胞癌

(1) ヒト切除標本を免疫染色で検討したところ、胆管前癌病変である BiIN (Biliary Intraepithelial Neoplasm) では TFF2 が豊富に発現し、また低分化腺癌ではこれが低下していることが明らかとなった (図⑤)。

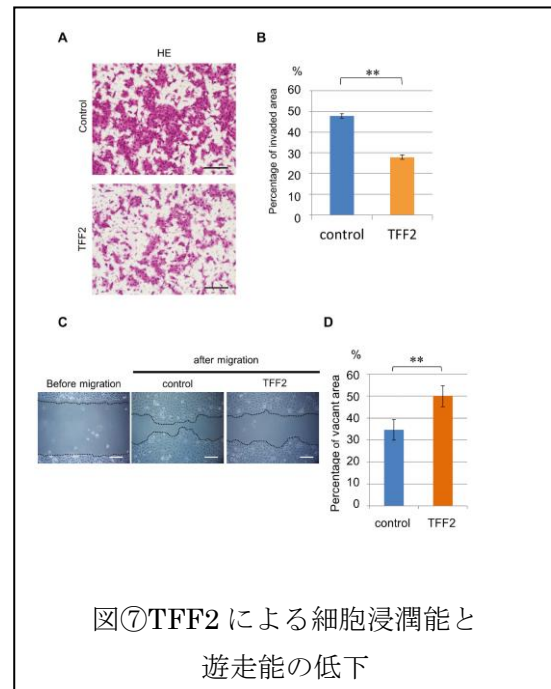
(2) 培養胆管癌細胞に TFF2 を強制発現させたところ、細胞の増殖能が抑制され、かつアポトーシスが増加する事が明らかとなった (図⑥)。また、TFF2 群では細胞の浸潤能および遊走能が抑制されることも明らかとなった (図⑦)。



図⑥TFF2による細胞増殖抑制とアポトーシス誘導

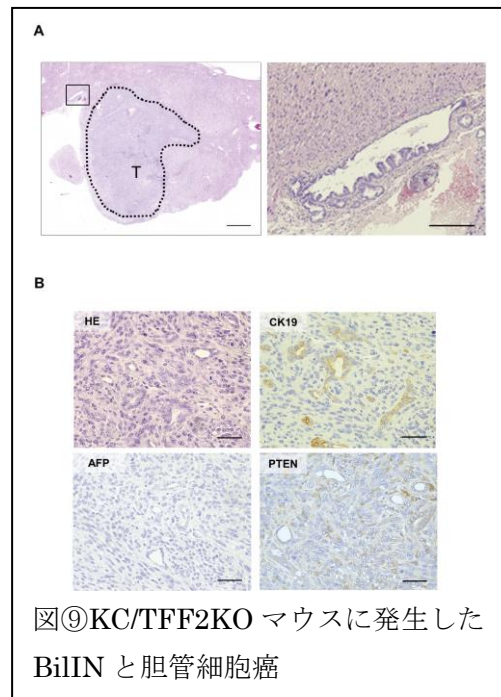
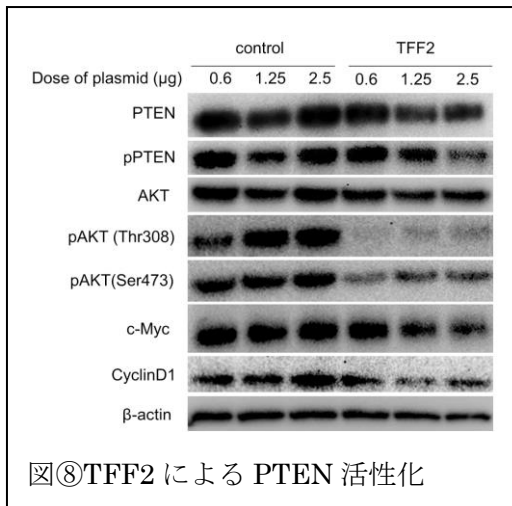


図⑤TFF2発現と胆管細胞癌



図⑦TFF2による細胞浸潤能と遊走能の低下

(3) TFF2 発現細胞では PTEN のリン酸化が抑制され、PTEN 経路が活性化する事が明らかとなった (図⑧)。また、KC/TFF2KO マウスの胆管では BiIN が頻繁に発生し、かつ胆管細胞癌も発生する事が明らかとなった (図⑨)。



これらの結果より、TFF2は腫瘍抑制因子であるPTENを活性化することによって胆管細胞癌に対して抑制的な役割を示すことが明らかとなった。

以上の結果は、TFFの3つのサブタイプの内、TFF1は肝細胞癌に対して抑制的に、TFF2は胆管細胞癌に対して抑制的に働くことを示している。しかも、前者はWnt/ β -catenin経路に干渉し、後者はPTEN経路に干渉するという、全く異なる作用機序を示している。TFF1とTFF2は非常に似通った構造を持つたんぱく質であるにもかかわらずこのような異なる作用を持つことは非常に興味深く、今後の研究によってこの相違の原因が明らかにされ、かつ肝癌に対する新規治療法の開発に繋がることを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yosuke Ochiai, Junpei Yamaguchi, Toshio Kokuryo, Yukihiro Yokoyama, Tomoki Ebata, and Masato Nagino	4. 巻 72 (2)
2. 論文標題 Trefoil Factor Family 1 Inhibits the Development of Hepatocellular Carcinoma by Regulating - Catenin Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 503-517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31039.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keiji Hasebe, Junpei Yamaguchi, Toshio Kokuryo, Yukihiro Yokoyama, Yosuke Ochiai, Masato Nagino and Tomoki Ebata	4. 巻 42 (12)
2. 論文標題 Trefoil factor family 2 inhibits cholangiocarcinogenesis by regulating the PTEN pathway in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1496-1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgab093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 Ochiai Y, Yamaguchi J, Kokuryo T, Yokoyama Y, Ebata T, Nagino M
2. 発表標題 Trefoil Factor Family 1 Inhibits the Development of Hepatocellular Carcinoma by Regulating -Catenin Activation.
3. 学会等名 The Liver Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 淳平 (Yamaguchi Junpei) (00566987)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柳野 正人 (Nagino Masato) (20237564)	愛知県がんセンター・副総長・副総長 (83901)	
研究分担者	國料 俊男 (Kokuryo Toshio) (60378023)	名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901)	
研究分担者	横山 幸浩 (Yokoyama Yukihiro) (80378091)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授 (13901)	

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