

機関番号 : 24303	
研究種目 : 基盤研究 (C)	
研究期間 : 2008~2010	
課題番号 : 20590408	
研究課題名 (和文)	肝細胞癌における 17p11 増幅の標的遺伝子 ERK5 の同定とその細胞周期制御の解析
研究課題名 (英文)	ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry.
研究代表者	
	安居 幸一郎 (YASUI KOHICHIROH)
	京都府立医科大学・医学研究科・准教授 (寄附講座)
	研究者番号 : 30323695

研究成果の概要 (和文) : 肝細胞癌に生じたDNAコピー数変化を全ゲノム領域を高密度にカバーするオリゴヌクレオチド・アレイを用いて網羅的に解析し、第17番染色体短腕17p11領域に新規の遺伝子増幅を発見した。そして、MAPキナーゼの一員であるERK5遺伝子をこの17p11増幅の標的遺伝子であると同定した。さらにERK5は、細胞周期のG2/M期にリン酸化されると細胞周期M期へ進行を加速し、肝癌細胞の増殖を促進することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Using high-density oligonucleotide microarrays, we investigated DNA copy-number aberrations in hepatocellular carcinomas and detected a novel amplification at 17p11. Our results suggest that the ERK5 gene is the target of 17p11 amplification and that the ERK5 promotes the growth of hepatocellular carcinoma cells by regulating mitotic entry.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野 : 腫瘍学、消化器病学

科研費の分科・細目 : 基礎医学・実験病理学

キーワード : 肝細胞癌、遺伝子増幅、ERK5、MAPK7

1. 研究開始当初の背景

癌は体細胞に生じた遺伝子病である。ゲノム異常・エピゲノム異常が蓄積することで細胞は癌化する。また、その異常の組み合わせの違いによって、癌の悪性形質の違い、言い換えると癌の個性が規定される。

癌においては、染色体構造の不安定性によってDNAコピー数変化 (遺伝子増幅あるいは欠失) が生じる。遺伝子増幅は癌遺伝子を活性化する機序のひとつであり、欠失は癌抑制遺伝子を不活性化する機序の

ひとつである。

肝細胞癌は世界的に5番目に発生数が多く、癌による死因の3番目を占める予後の悪い癌である。よって、その発癌機序の解明と有効な治療法の開発が急務である。

2. 研究の目的

肝細胞癌の特定の染色体領域に生じたDNAコピー数変化（遺伝子増幅あるいは欠失）を網羅的に検出し、その異常を解析することで肝細胞癌の発生・進展機序を明らかにし、さらには治療の標的分子を同定することを目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

肝細胞癌手術検体 34 例と肝細胞癌細胞株 20 株を対象にした。全ゲノム領域を高密度にカバーするように約 25 万個のオリゴヌクレオチド・プローブを搭載した GeneChip 250K アレイ (Affymetrix 社) を用いて、肝細胞癌に生じた DNA コピー数変化を網羅的に探索した。FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法、real-time PCR 法、Western blot 法、免疫染色法で ERK5 遺伝子の DNA コピー数と発現量を調べた。siRNA 法で ERK5 の発現をノックダウンして、細胞周期進行と細胞増殖に関する ERK5 の機能を検討した。

4. 研究成果

網羅的 DNA コピー数解析によって、第 17 番染色体短腕 17p11 領域に新規の遺伝子増幅を発見した。FISH 法と PCR 法で同領域の遺伝子増幅を確認した。最小の共通増幅領域 (amplicon) を 750kb の範囲に局限化し、その amplicon 内にある遺伝子すべてについて調べた。その結果、ERK5 遺伝子が増幅メカニズムによって発現亢進する遺伝子であること、すなわち 17p11 増幅の標的遺伝子であることが判明した。

ERK5 は MAPK (mitogen-activated protein kinase) のひとつで、細胞外からのストレスや増殖シグナルを核内に伝達する。siRNA を用いたノックダウン実験の結果から、ERK5 は細胞周期の G2/M 期にリン酸化されて活性型になり、細胞周期 M 期へ進行を加速することで肝癌細胞の増殖を促進することが明らかになった。以上から、ERK5 は肝細胞癌の発生・進展に関与し、肝細胞癌に対する治療標的分子になり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

*以下すべて査読有り

- (1) Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, et al. (17 名中 1 番目) Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 9:428-433, 2011.
- (2) Sumida Y, Kanemasa K, Yasui K, et al. (11 名中 8 番目) Impact of amino acid substitutions in the hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and glucose tolerance in non-cirrhotic patients without overt diabetes. *J Gastroenterol Hepatol* 26:836-842, 2011.
- (3) Yasui K (corresponding author), Sumida Y, Mori Y, et al. (10 名中 1 番目) Nonalcoholic steatohepatitis and increased risk of chronic kidney disease. *Metabolism*. 60:735-739, 2011.
- (4) Sumida Y, Yoneda M, Yasui K, et al. (18 名中 13 番目) A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 46:257-268, 2011.
- (5) Park H, Shima T, Yasui K, et al. (14 名中 6 番目) Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 46:101-107, 2011.
- (6) Gen Y, Yasui K (corresponding author), Zen Y, et al. (14 名中 2 番目) *SOX2* identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;202:82-93.
- (7) Dohi O, Takada H, Yasui K, et al. (9 名中 4 番目) Epigenetic silencing of *RELN* in gastric cancer. *Int J Oncol*. 2010;36:85-92.
- (8) Tsuji K, Yasui K (corresponding author), Gen Y, et al. (14 名中 2 番目) *PEG10* is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;198:118-25.
- (9) Takada H, Wakabayashi N, Yasui K, et al. (8 名中 4 番目) Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2) is frequently silenced by aberrant promoter hypermethylation in gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet*.

- 2010;197:16-24.
- (10) **Yasui K (corresponding author)**, Harano Y, Mitsuyoshi H, et al. (12名中1番目) Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol*. 2010;45:95-104.
- (11) Park H, Hasegawa G, **Yasui K**, et al. (15名中9番目) The fatty acid composition of plasma cholesteryl esters and estimated desaturase activities in patients with nonalcoholic fatty liver disease and the effect of long-term ezetimibe therapy on these levels. *Clin Chim Acta*. 2010;411:1735-40.
- (12) Park H, Ishigami A, **Yasui K**, et al. (17名中9番目) Hepatic senescence marker protein-30 is involved in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2010;45:426-34.
- (13) Zen K, **Yasui K (corresponding author)**, Gen Y, et al. (12名中2番目) Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (*PAR3*) in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2009;28:2910-8.
- (14) Endo M, **Yasui K (corresponding author)**, Nakajima T, et al. (15名中2番目) Infrequent Amplification of *JUN* in Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res*. 2009;29:4989-4994.
- (15) Zen K, **Yasui K (corresponding author)**, Nakajima T, et al. (16名中2番目) ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48:109-20.
- (16) Gen Y, **Yasui K (corresponding author)**, Zen K, et al. (14名中2番目) A novel amplification target, *ARHGAP5*, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2009;275:27-34.
- (17) Okanoue T, Itoh Y, **Yasui K**, et al. (14名中4番目) Predictive values of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study. *J Gastroenterol*. 2009;44:952-63.
- (18) Mitsuyoshi H, **Yasui K**, Harano Y, et al. (9名中2番目) Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2009;39:366-73.
- (19) Nakajima T, **Yasui K (corresponding author)**, Zen K, et al. (12名中2番目) Activation of B-Myb by E2F1 in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol Res*. 2008;38:886-95.
- (20) Inagaki Y, **Yasui K (corresponding author)**, Endo M, et al. (12名中2番目) *CREB3L4*, *INTS3* and *SNAPAP* are targets for the 1q21 amplicon frequently detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;180:30-6.
- (21) Mitsuyoshi H, Itoh Y, **Yasui K**, et al. (7名中5番目) Evidence of oxidative stress as a cofactor in the development of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res*. 2008;38:348-53.
- (22) Okanoue T, Itoh Y, **Yasui K**, et al. (16名中5番目) Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum aminotransferase based on platelet counts. *Hepatol Res*. 2008;38:27-36.
- (23) Miyagawa M, Minami M, **Yasui K**, et al. (12名中8番目) Molecular characterization of a variant virus that caused de novo hepatitis B without elevation of hepatitis B surface antigen after chemotherapy with rituximab. *J Med Virol*. 2008;80:2069-78.
- [学会発表] (計14件)
- (1) Endo M. Mutation and Deletion of The SWI/SNF Chromatin Remodeling Subunit-BRG1 and BRM Genes in Hepatocellular Carcinoma. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. 2010 Oct 30: Boston, USA.
- (2) Mitsuyoshi H. Limited Synthesis of Hepcidin Against Iron Overload In Nonalcoholic Fatty Liver Disease. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. 2010 Oct 30 : Boston, USA.
- (3) Yasui K. Nonalcoholic Steatohepatitis And Increased Risk Of Chronic Kidney Disease. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. 2010 Oct 30 : Boston,

- USA.
- (4) Wada T. ARHGAP5, a novel target for gene amplification at 14q12, promotes hepatocellular carcinoma cell migration by inhibiting RhoA activity. The 111th Annual Meeting of the AGA Institute. Digestive Disease Week. 2010 May 4 : New orleans, USA.
 - (5) 安居幸一郎. NASH/NAFLD における慢性腎臓 (CKD) 第 14 回日本肝臓学会大会. 2010 年 10 月 14 日. 横浜.
 - (6) 遠藤美生. 投与後 10 週で病変が消失した著効例を含めた当院における sorafenib の使用経験. 第 46 回日本肝臓学会総会. 2010 年 5 月 27 日. 山形.
 - (7) 玄泰行. 食道扁平上皮癌の 3q26 増幅標的遺伝子 SOX2 は in vitro 及び in vivo において、細胞増殖と腫瘍形成を促進する. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010 年 9 月 23 日. 大阪.
 - (8) 城正泰. 肝細胞癌における酸化ストレスと血管新生についての検討. 第 46 回日本肝臓学会総会. 2010 年 5 月 27 日. 山形.
 - (9) 辻和宏. EGF 受容体シグナル伝達を阻害する MIG6 の肝細胞癌における欠失と発現低下. 第 46 回日本肝臓学会総会. 2010 年 5 月 27 日. 山形.
 - (10) 西川太一郎. マウス腫瘍移植モデルを用いた肝細胞癌生長におけるインスリン抵抗性の役割についての検討. 第 46 回日本肝臓学会総会. 2010 年 5 月 27 日. 山形.
 - (11) 遠藤美生. 肝細胞癌における Brg1 遺伝子の欠失. 第 45 回日本肝臓学会総会. 2009 年 6 月 4 日. 神戸.
 - (12) 辻和宏. 高密度オリゴヌクレオチド・アレイを用いた肝細胞癌における 1p36 遺伝子欠失領域の検出と欠失遺伝子の同定. 第 45 回日本肝臓学会総会. 2009 年 6 月 4 日. 神戸.
 - (13) 遠藤美生. 高密度オリゴヌクレオチド・アレイを用いた肝細胞癌における 1p32-31 遺伝子増幅領域の検出と標的遺伝子の検討. 第 44 回日本肝臓学会総会. 2008 年 6 月 5 日. 愛媛.
 - (14) 遠藤美生. 肝細胞癌における 1p32-31 遺伝子増幅領域の検出とその標的遺伝子 c-JUN の同定. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008 年 10 月 28 日. 名古屋.

[図書] (計 2 件)

- (1) 全 圭夏、他. アークメディア、肝細胞癌において同定した新規 17p11 増幅領域の標的遺伝子 MAPK7 の機能についての検討. 消化器疾患における Translational Research. 2008、

pp213-215.

- (2) 山口寛二、他. 中外医学社、肝硬変の成因別実態と肝癌合併症例の検討. 肝硬変の成因別実態. 2008、 pp187-180.

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/sun/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安居 幸一郎 (YASUI KOHICHIROH)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授 (寄附講座)

研究者番号 : 30323695