

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009年度

課題番号：20790315

研究課題名（和文） 肝および肝がんにおける $\beta$ カテニンの機能解析研究課題名（英文） Role of  $\beta$ -catenin in the liver and liver cancer

研究代表者

関根 茂樹 (Shigeki Sekine)

国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・研究所病理部・室長

研究者番号：10321879

研究成果の概要（和文）：

肝細胞特異的 $\beta$ -catenin ノックアウトマウスの遺伝子発現解析を行い、肝細胞において $\beta$ -cateninによって制御されている遺伝子を網羅的に同定した。さらに、ヒト肝細胞がん検体を用いて、これらの遺伝子の発現と、 $\beta$ -catenin 遺伝子変異との関連を検索したところ、マウスで同定された下流遺伝子のうち一部のものが、遺伝子変異の存在と高い相関を示した。現在、ヒト肝細胞がん細胞株を用いて、これらの下流遺伝子の機能解析を行っている。

肝細胞特異的Dicer ノックアウトマウスが門脈周囲領域に特異的な遺伝子の局在のみが失われるという、部分的に $\beta$ -catenin ノックアウトマウスに一致する表現形を示す事を見いだした。これらのマウスモデルの解析の結果から、Dicerは $\beta$ -cateninの下流で門脈周囲領域特異的な遺伝子の発現抑制に必須の役割を果たしている事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To systematically identify  $\beta$ -catenin-regulated genes in the liver, a microarray analysis was performed on hepatocyte-specific  $\beta$ -catenin knockout mice. The expression of the identified  $\beta$ -catenin downstream genes were further examined in human hepatocellular carcinoma samples. The result showed that overexpression of a subset of the  $\beta$ -catenin-regulated genes identified in the mouse models correlated closely with the presence of  $\beta$ -catenin gene mutations in human hepatocellular carcinomas.

Hepatocyte-specific Dicer knockout mice was found to exhibit impaired localization of periportal genes within the liver lobule. This phenotype partially simulates that of  $\beta$ -catenin knockout mice. Analysis of these two mouse models revealed an essential role of Dicer in the regulation of periportal area-specific gene expression by  $\beta$ -catenin.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：

キーワード： $\beta$ -catenin、肝、肝がん

## 1. 研究開始当初の背景

$\beta$ -Catenin は、細胞間接着に関わるカドヘリン複合体の細胞質内構成成分であると同時に、Wnt シグナル伝達系の成分としても働いている。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達系は発生や生体機能の調節に種々の臓器において重要な役割を果たしている。さらに、ヒトおよびマウスの種々の腫瘍において  $\beta$ -catenin が遺伝子異常により異常集積していることが分かってきた。異常集積した  $\beta$ -catenin は、核内において TCF/LEF 転写因子と結合しその転写を恒常的に活性化させる事で発がんに寄与すると考えられている。

肝がんの腫瘍発生における  $\beta$ -catenin の役割については、1998 年 Miyoshi らによって肝がんにおける  $\beta$ -catenin 遺伝子変異の存在が報告されて以来、多くの報告があり、肝がんの約30%が  $\beta$ -catenin 遺伝子変異を有している事が知られている (Miyoshi Y et al. Cancer Res, 1998; deLa Coste A et al. PNAS, 1998)。

申請者は肝細胞特異的  $\beta$ -catenin ノックアウトマウスを作成し、これを用いて肝における  $\beta$ -catenin の機能解析を行ってきた。肝細胞特異的  $\beta$ -catenin ノックアウトマウスは肝重量の減少を示すものの、通常飼育環境下においては正常に成長し、肝機能に異常を来さない。ただし、グルタミン合成経路に必要な分子の発現を欠損しており高タンパク食により血中アンモニアの上昇が認められる事、いくつかのチトクローム P450 の発現を欠いており、アセトアミノフェンによる肝傷害に対して耐性である事を明らかにした (Sekine et al. Hepatology, 2006)。また、部分肝切除後の肝再生において肝細胞の分裂が遅れる事を見いだした (Sekine et al. Hepatology, 2007)。しかしながら、肝の生理的機能における  $\beta$ -catenin の役割の解析は未だ端緒についたばかりで、その多くは明らかにされていない。

近年、複数のグループから Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達系が肝小葉内での領域特異的な遺伝子発現の制御に関わっている、との報告がなされた。Benhamouche らは肝での DKK1 の過剰発現により Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが抑制されることで、肝小葉の中心静脈周囲特異的な遺伝子 (pericentral gene) 発現が抑

制され、門脈周囲特異的に発現している遺伝子 (periportal gene) が肝小葉全体に発現する事を示した。さらに、APC の肝特異的ノックアウトマウスでは  $\beta$ -catenin の安定化を通して pericentral gene が肝小葉全体に発現するとともに periportal gene の発現は抑制される (Benhamouche S et al. Dev Cell, 2006)。Stahl らは肝細胞癌の解析から  $\beta$ -catenin 遺伝子変異を有する腫瘍では主に pericentral gene が、 $\beta$ -catenin 遺伝子変異のない腫瘍では主に periportal gene が過剰発現している事を示した (Stahl S et al. Hepatology, 2006)。これらの報告は肝小葉において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは pericentral gene の発現を誘導するとともに periportal gene の発現を抑制する事で、肝小葉内の領域特異的遺伝子発現に重要な働きを有している事を示唆する。しかしながら、 $\beta$ -catenin/TCF 複合体がすべての領域特異的に発現する遺伝子を直接的に調節しているとは考え難く、その遺伝子発現の調節機構については未だ不明である。

## 2. 研究の目的

本研究においては  $\beta$ -catenin の肝における生理的役割を解析するとともに、ヒト肝がん発生における変異  $\beta$ -catenin の機能的役割を明らかにする事を目的とした。特に (1) 肝および肝がんにおける  $\beta$ -catenin 下流遺伝子の網羅的同定、(2) 肝における  $\beta$ -catenin による遺伝子発現制御における microRNA の役割の解析、の2点を中心として研究を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では肝細胞特異的  $\beta$ -catenin ノックアウトマウスの遺伝子発現解析をマイクロアレイを用いて行い、肝における  $\beta$ -catenin の下流遺伝子を網羅的に同定した。さらに、同定された  $\beta$ -catenin 下流遺伝子のタンパク産物の発現を解析した。また、ヒト肝がんの臨床検体を用いて、マウス肝で同定された  $\beta$ -catenin 下流遺伝子発現と  $\beta$ -catenin 遺伝子変異との関連およびその臨床的意義を

検索した。

さらに、 $\beta$ -cateninによる肝機能制御におけるmicroRNAの関与の可能性について検索するため、 $\beta$ -cateninノックアウトマウスにおけるmicroRNAの発現解析を行った。さらに、microRNAが $\beta$ -cateninによる肝小葉内領域特異的遺伝子発現に与える影響を検索する目的で、領域特異的に発現するタンパクに対する免疫組織学的解析をDicerノックアウトマウスとの比較とともに行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 肝および肝がんにおける $\beta$ -catenin下流遺伝子の網羅的同定

肝細胞における $\beta$ -catenin下流遺伝子を同定する目的で、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行い、肝細胞特異的 $\beta$ -cateninノックアウトマウスにおいて発現が低下している遺伝子群を同定した。これらの同定された $\beta$ -catenin下流遺伝子の肝小葉内における発現の局在を確認したところ、いずれも中心静脈周囲領域に局在して発現が認められ、これまでの実験から示唆されているように $\beta$ -cateninの肝小葉内の領域特異的遺伝子発現制御における機能を示唆する所見と考えられた。

さらにマウスの解析から同定された $\beta$ -catenin下流遺伝子の発現をヒト肝細胞がんで検索したところ、 $\beta$ -catenin変異を有する肝細胞がんで有意に高発現している遺伝子を複数同定した。

今回同定した、ヒト肝がんにおいて $\beta$ -catenin変異の存在と強い相関を示す分子の1つにAMACRがある。AMACRの発現はmRNAおよびタンパクレベルで $\beta$ -catenin変異の存在と極めて高い相関を示した。この分子は分枝鎖脂肪酸の $\beta$ 酸化に関わり、前立腺がんで高発現しており、その悪性度に関わるとの報告があることから、腫瘍関連分子として注目されている。さらに、 $\beta$ -catenin変異を有する肝細胞癌は胆汁産生を示す事が報告されているが(Audard et al. J Pathol, 2007)、AMACRは肝臓においては胆汁産生にも重要な働きを果たしている事が知られており、 $\beta$ -cateninが胆汁産生に重要な働きを果たしている可能性をさらに示唆する所見と考えられた(投稿中)。

現在、遺伝子変異の存在と相関の高かったその他の $\beta$ -catenin下流遺伝子について、さらに免疫染色をもちいたタンパク質レベルでの発現解析や培養細胞を用いて機能解析を進めている。

##### (2) 肝における $\beta$ -cateninによる遺伝子発現制御におけるmicroRNAの役割

上述した通り、 $\beta$ -catenin依存性シグナルは肝細胞において中心静脈周囲型の遺伝子発現を誘導するとともに、門脈周囲型の遺伝子発現を抑制する事で、肝小葉内の領域特異的遺伝子発現の確立に必須の役割を果たしている。このため肝細胞特異的 $\beta$ -cateninノックアウトマウスは肝小葉内での領域特異的遺伝子発現が完全に失われている。一方、肝細胞特異的Dicerノックアウトマウスは中心静脈周囲型の遺伝子発現が保たれたまま、門脈周囲領域に特異的な遺伝子の局在のみが失われるという、 $\beta$ -cateninノックアウトマウスと部分的に一致する表現形を示す事を見いだした。これらの所見から、DicerもしくはmicroRNAの発現が $\beta$ -cateninによって制御されている可能性を考慮して、 $\beta$ -cateninノックアウトマウスにおけるDicerやmicroRNAの発現を定量PCRやマイクロアレイによって検索したが、これらの発現に明らかな変化は認められなかった。

これらの所見から、 $\beta$ -cateninによる遺伝子発現の肝小葉内の局在性制御にDicerもしくはDicerによって生成されるmicroRNAが重要な役割を果たしていると考えられた。これらのマウスモデルでDicer, microRNAなど

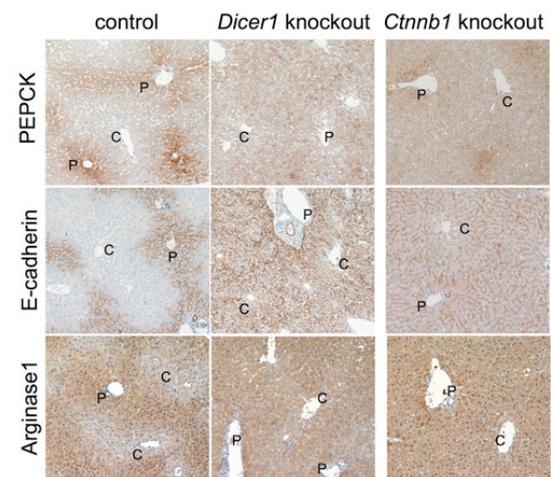


図: Dicerおよび $\beta$ -cateninノックアウトマウスにおける小葉内の領域性タンパク発現の変化

対照群(control)では肝小葉内で門脈周囲領域に局在するタンパクが肝細胞特異的Dicerノックアウトマウス(*Dicer1* knockout)および $\beta$ -cateninノックアウトマウス(*Ctnnb1* knockout)ではともにびまん性に発現している。(C:中心静脈, P:門脈)

の発現解析を行った結果、Dicer は  $\beta$ -catenin の下流で門脈周囲領域特異的な遺伝子の発現抑制に必須の役割を果たしているが、 $\beta$ -catenin の直接の制御下ではなく、間接的に  $\beta$ -catenin 下流遺伝子の発現制御に関わっている事が示唆された。

#### 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1件)

Sekine S, Ogawa R, Mcmanus MT, Kanai Y, Hebrok M. Dicer is required for proper liver zonation J Pathol. 2009;219:365-372

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 関根茂樹  
(Shigeki Sekine)

研究者番号 : 10321879