

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08392

研究課題名（和文）p68の肝癌細胞及び肝癌血管内皮細胞における機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of p68 in hepatoma cells and hepatoma vascular endothelial cells

研究代表者

野尻 俊輔 (Nojiri, Shunsuke)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・教授

研究者番号：50381843

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）：本研究は肝臓癌の分子医学的側面から解明を試みている。筆者らが発見したp68は経常的に全身の血管に発現しており血管形成に必須の遺伝子である。我々は全く違うアプローチから偶然p68が肝細胞に発現していることを発見し、肝癌の悪性度を示すフェトプロテイン（AFP）のサプレッサーであることを示した。しかしその作用は血管内皮細胞での働きを含め全くの不明であった。今回KOマウスでの結果よりp68は通常から肝細胞に発現し、その発現低下により肝癌の悪性度が増加し易発癌性となる。同時にp68の低下によりAFP発現が上昇するため、AFPが臨床的な悪性度をしめす機序の分子医学的証明となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓癌での治療はまだ不十分でありその悪性度の生物学的機序も不明であった。今回の実験結果は肝癌の悪性度及び発癌性の一因にp68が関与している事を細胞実験、ヒト臨床検体、さらにKOマウスの作製により証明し、腫瘍マーカーであるAFP上昇メカニズムとの整合性を説明可能とした。今回の研究成果により新たな分子医学的治療への一助になることを期待する。

研究成果の概要（英文）：This study attempts to elucidate the biological characteristics of liver cancer from the molecular medical aspect. p68 discovered by the authors is originally recognized to be expressed in the blood vessel of the whole-body continuously, and it seems to be an indispensable gene for the angiogenesis. We discovered that p68 expression acts as a suppressor of alpha-fetoprotein (AFP), which indicates the malignancy of liver cancer. However, the action was completely unknown including the role in the vascular endothelial cell. From the experiment of KO mouse, p68 is normally expressed in hepatocytes and the malignancy of hepatoma is increased by the inhibition of the p68 expression, and it becomes a carcinogenicity. Simultaneously, AFP expression rose by the lowering of p68, and it became the molecular medicine proof of the mechanism in which the malignancy was clinically indicated AFP.

研究分野：肝臓

キーワード：p68 AFP 肝癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓癌の腫瘍マーカーである フェトプロテイン(AFP) の強力なサプレッサーである ATBF1 の研究途中で偶然発見した p68 は ATBF1 とは独立した因子であることを確認した。さらに、機能解析中に、肝臓周囲の血管内皮細胞にも p68 が発現している事を発見した。AFP はもともと肝臓癌の悪性度と相関があることは知られているが悪性度を含めた分子医学的な解析はほとんど報告がない。p68 の肝細胞と血管内皮細胞での生理的役割はほとんど研究されていない。

2. 研究の目的

一般に AFP が高値であると肝臓癌の悪性度は増すが、ATBF1 では説明できない事項が多い。本研究は P68 の肝細胞における発癌のメカニズムと AFP との関係を明らかにすること、肝細胞周囲の血管内皮細胞での生物学的な動態の解明を目的とした。そのため細胞培養での実験と実臨床での標本での解析、さらには肝臓での p68 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し発癌物質投与の際の影響を検討する。p68 は全身ノックアウト(KO)とすると出生直後に血管形成不全が起こり直ちに死亡することが知られているため肝臓でのアルブミンの発現に特化したコンディショナル KO マウスを製作する。従って肝臓内皮細胞の P68 は KO されないが肝細胞は完全に KO されるマウスでの変化を観察する。

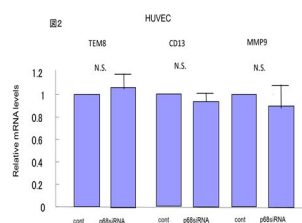
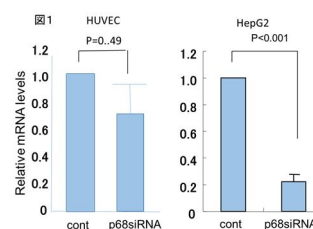
3. 研究の方法

- 1) ヒト内皮細胞培養：ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) を正常内皮細胞として使用した。p68 を強制発現、およびノックダウンを肝細胞 HepG2 を用いて施行する。その上で、内皮細胞で特異的に発現している遺伝子 TEM8, DKK-3, CD13, MMP9, HEYL で検索する
- 2) Hep 3 B を使用した肝細胞での p68 強制発現及び siRNA によるノックアウトの AFP, HNF1, p21, p27, p57 を測定する。また cell count 法にて細胞増殖能の変化を観察する。
- 3) 臨床手術標本を用いて、肝臓癌部と非癌部肝臓から抽出した mRNA を使用して各種遺伝子を比較測定する。
- 4) 手術記録を追跡調査し患者の生存曲線を作製し予後を比較検討する。
- 5) p68 コンディショナルノックアウトマウスの作製

Floxp/p68 のホモ F1 マウスと Alb-Cre ホモ F1 マウスを交配させ KO マウスを選別し、肝臓特異的な p68KO を作製する。KO 確認後 c57BL/6N をコントロールマウスとし 4 週令より N,N-diethylnitrosamine (DEN) をメタノール希釈し 25mg/L の濃度に調節した飲料水を自由飲水とし 25W で sacrifice とした。Wild type と KO マウスの肝臓発癌状況を肉眼で確認し、また腫瘍部と非腫瘍部から mRNA と蛋白抽出を抽出し、ともに網羅的解析をさざゲノムテクノロジーに委託する。

4. 研究成果

1) 定常状態において内皮細胞での p68 遺伝子発現を検出した。同時にヒト星細胞(LX-2)も検索したがこちらは発現の確認ができなかった。ヒト内皮細胞を用いて強制発現を試みたが効率よい発現は確認できず各種条件を変えて試すも安定した結果は得られず実験はこれ以上進展できず。肝細胞と違いプラスミドの細胞内導入の効率が悪いことが原因であると考えられた。siRNA を使用した遺伝子ノックダウンは強制発現よりも効率が良かったが、HepG2 を使用した結果よりも効率が悪かった(図 1)。ノックダウンした細胞を使用して mRNA を抽出し候補としていた遺伝子を解析した。DKK-3 と HEYL は発現量が少なく十分な解析ができなかった。TEM8, CD13, MMP9 に関して p68 のノックダウンの影響を調べたが、すべての遺伝子において若干の増減の傾向は認められるが有意な変化は認めなかった(図 2)。これは p68 とこれらの遺伝子は実際には関連性がなく変化が無かったことも考えられるが、p68 のノックダウン変化が半分程度までの減少であり実験により変動が激しかったため十分な変化を観察できなかった可能性がある。これらに関しては今後引き続き遺伝子導入法を変更するか使用する細胞を他の血管内皮に変更するかで検討していきたい。



2) HepG2 及び Hep3B を使用した siRNA による p68 ノックダウンでは平均でコントロールの 10-20%程度まで遺伝子のノックダウンに成功した。これらの細胞では p68 ノックダウンによる AFP の有意な増加を認めた。p 21, p27, p57, HNF1 は有意な変化を示さなかった (data not shown)。(図 3)。 反対に p 68 強制発現系では AFP の減少を認めた一方で p 21, p27, p57, HNF1 は有意な変化を示さなかった。AFP の変化はこれらの因子による変化ではない事が示された (図 4)。

さらに Hep3B 細胞に p 68 を強制発現させ、Cell count 法にて増殖能の変化を調べた。P68 を強制発現することにより細胞増殖能は有意に抑制された (n=7,p=0.0018) (図 5)。

3) 肝臓癌の診断にて当院で手術を施行された症例のプレパラート標本から mRNA を抽出し、また一部は手術時に直接採取したサンプルから mRNA を抽出し p 68、HNF1、AFP の遺伝子発現を PCR 法にて定量した。全症例を通し、非癌部では AFP 発現はほとんど見られなかった。一方腫瘍部では症例によって AFP 発現している肝細胞癌と発現を認めないものが存在していた。腫瘍部で AFP が発現している症例では発現量が多い場合は血清 AFP が高値となっている傾向があった。非癌部と癌部で p 68、HNF1、AFP を測定した。AFP が腫瘍部で発現が無いかまたは非常に低い症例では、p 68 発現は非癌部に比べ癌部では 8 割に減少していた。一方、癌部で AFP 発現が著明な症例では、p 68 発現は癌部では、非癌部の 43%に減少しており有意に p 68 減少を認めた。ちなみに HNF1 はいずれの症例でも癌部は非癌部で 1.5 倍と亢進しており AFP の発現量との相関はなかった。以上より肝癌での AFP の上昇は HNF1 の発現量による差ではなく p 68 の発現量低下の差によるものであると考えられる。(図 6)

4) 手術後の予後が追跡できた 64 症例について予後と p 68 の相関を検討した。手術検体から mRNA を抽出し p 68 発現を定量し、癌部で非癌部より半分未満に減っている群;(癌部/非癌)<0.5, と、減少はするが半分以上はある群;(癌部/非癌) 0.5, に分けて全生存率を計算した。癌部での発現が半分未満の群は半分以上の群に比べ全生存率が有意に悪化していた。この結果より p 68 発現が肝癌組織で大きく低下している症例は手術後の予後が悪いことが示唆された。(図 7)

5) p 68 コンディショナルノックアウトマウスの発癌に対する影響: DEN投与後 2 5 Wで sacrifice した。Wild は 1 5 匹、KO マウスは 12 匹解析可能であった。体重増加は 2 群間で特に有意な差はなかった。肉眼的な肝臓内に認められた腫瘍個数を Table.1 に示す。Wild では、3 匹で全く腫瘍の発現がなく、p 68 KO マウスでは、1 匹が無腫瘍であった。Wild では、1 匹

図3 mRNA of AFP by knock down by siRNA

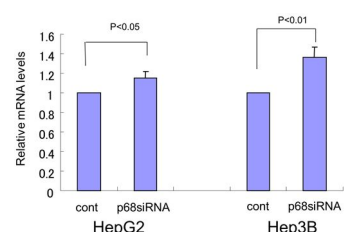


図4 P68強制発現によるAFPの変化

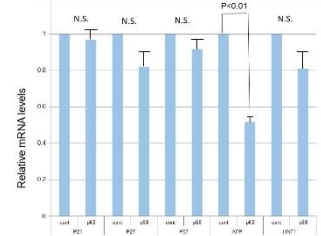


図5 Cell proliferation

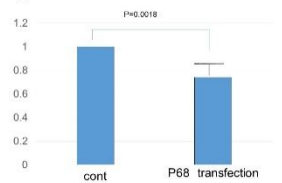


図6 P68 HNF1

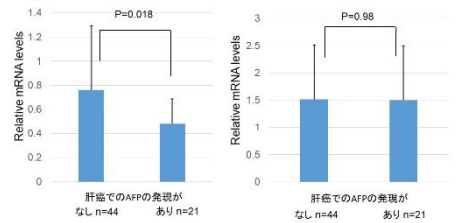
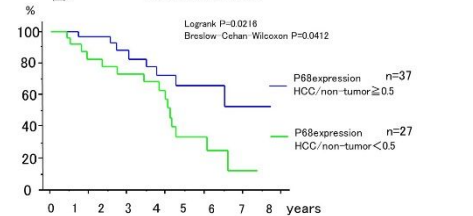


図7 Overall survival



で肝臓全体に肉眼で確認できた腫瘍は最大3個であったがKOマウスでは3匹で10結節以上の多発発癌を認めた。多発の結節は非常に細かいびまん性の腫瘍であり正確には個数をとらえることは不可能であったが、これらを10個としてカウントし、各群での1個体あたりの腫瘍数を計算するとwildでは平均1個/匹、KOマウスでは平均3.25個/匹で有意にKOマウスで肝臓癌発生個数が増加していた ($p=0.046$) (Table.1)。

Table.1

一個体あたりの肝臓腫瘍数

P=0.046

	0	1	2	3	10以上	1匹当たりの腫瘍数
Wild(15)	3	10	1	1	0	1
KO(12)	1	7	1	0	3	3.25

(結語)：今回の研究結果よりp68は肝臓内の肝細胞と血管内皮細胞に通常より発現しており肝細胞では癌化に伴いその発現が抑制される。その発現抑制は肝癌の悪性度に関連しており発現低下により肝癌の悪性度は増す。同時にp68は腫瘍マーカーであるAFPの発現を抑制している事より、結果的にp68発現低下によりAFPの発現は上昇する。臨床的にAFP高値例では悪性度が高い事の分子生物学的機序を説明していると考えられた。今回の研究では血管内皮細胞でのp68の生物学的特性を明らかにすることはできなかったが引き続き手法を変えて研究をすすめる必要がある。なお、KOマウスの遺伝子、タンパク質の網羅的解析を現在着手中であり今後これらの結果から新たな関連遺伝子の研究もしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	三浦 裕 (Miura Yutaka) (90285198)	至学館大学・健康科学部・教授 (33909)	

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