

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590414
 研究課題名（和文） 肝分化・肝再生における dickkopf 3 の作用機序の解明

研究課題名（英文） Functional analysis of dickkopf 3 in liver development and regeneration

研究代表者
 加野 准子 (KANO JUNKO)
 筑波大学・医学医療系・講師
 研究者番号：60334059

研究成果の概要（和文）：肝分化・肝再生に関わると予想される分泌蛋白質 Dickkopf 3 (Dkk3) の作用機序を解明するために Dkk3 高発現細胞における抗アポトーシス作用の分子機序の解析、受容体探索および Dkk3 ノックアウトマウスにおける肝再生への影響を解析した。その結果、抗アポトーシス作用には活性酸素種の抑制が関連すること、また受容体としては CKAP4 など数種の候補分子を明らかにし、その結合と作用を確定しつつある。一方今回のノックアウトマウスを用いた解析では、肝再生に顕著な影響は見出せなかった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the function of Dickkopf 3 (Dkk3), a possible regulator in liver development and regeneration, we have investigated the molecular mechanism of anti-apoptotic function in Dkk3-overexpressing cells, the receptor of Dkk3, and the contribution to liver regeneration in Dkk3-knockout mice. In result, it was revealed that the suppression of reactive oxygen species was involved in the anti-apoptotic function, and possible candidates for the receptors were found. On the other hand, no significant contribution was shown in the analysis using Dkk3-knockout mouse model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：肝臓・細胞・がん関連遺伝子・発生・分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝分化の分子機構と Dkk3

前腸内胚葉の肝への運命決定は心臓中胚葉からの FGF と横中隔間充織からの BMP が誘導することが報告された (Deutsch G et al, Development, 2001, Rossi JM et al, Genes Dev, 2001)。続く肝芽の発達には GATA ファミリー、肝特異的転写因子 (HNF) 群、C/EBP ファミリーの分子が働き、albumin (ALB)

など肝機能分子の発現を誘導し、さらに肝細胞の成熟化に OncostatinM が関わることなどが明らかにされた (Hayashi Y et al, J Clin Pathol:Mol Pathol, 1999, Bossard P et al, Development, 1998, Kamiya A et al, EMBO J, 1999)。しかし、各因子のシグナル伝達に関わる分子メカニズムは大部分が不明であった。Dkk3 が肝分化に関与する事は私たちが初めて示唆した (Kano J et al, Lab Invest,

2008)。Dkk3 発現を欠損したミュータントマウスは肝臓を含め発生、繁殖は正常であることが報告された (Barrantes IB et al, Mol Cell Biol, 2006) が、ミュータントマウスでの肝再生など肝臓に着目した詳細な研究は行われていなかった。

(2) Dkk ファミリーと Dkk3 の機能

分泌性蛋白 Dkk ファミリーは、共通する二つの cysteine 豊富な領域をもつ 1 から 4 までのメンバーから成る。Dkk ファミリーの各メンバーは、神経、歯、網膜、頭蓋底、副腎皮質などの発生において、組織内の各領域および時間軸上で特異的に発現することが明らかになり、組織の領域決定に関わる事が示唆されている。また Dkk1, -2, -4 は Wnt の受容体である LRP5/6 との結合を競合することによって Wnt シグナル経路の調節因子として働くことが報告されているが、Dkk3 は LRP5/6 とは結合せず、Wnt シグナル経路への作用も明らかでないため、他のメンバーとは分岐した分子であろうと考えられている (Niehrs C, Oncogene, 2006)。

Dkk3 の受容体は未同定であるが、機能については、アフリカツメガエルの初期発生において中胚葉誘導に必要であることが報告された (Pinho S et al, Differentiation, 2007)。一方、Dkk3 はいくつかの腫瘍組織や細胞、不死化細胞で発現抑制されることから **Reduced Expression in Immortalized Cells (REIC)** という名でがん抑制遺伝子としての働きが示唆されてきた (Tsuji T et al, BBRC, 2000 など)。肺がん、前立腺がん、白血病などの悪性腫瘍では Dkk3 が高メチル化されている事実や、がん細胞の Dkk3 強制発現系では細胞がアポトーシスに陥り、悪性度に影響を与える事が報告されているが (Hoang BH et al, Cancr Res, 2004, Abarzua F et al, Cancer Res, 2005 など)、Dkk3 欠損ミュータントマウスでは腫瘍形成に変化がないことなど、Dkk3 のがん抑制機構についてはまだ不明な点が多かった (Barrantes IB et al, Mol Cell Biol, 2006)。

(3) 着想に至った経緯

私たちは Dkk3 がブタ成体肝幹様細胞に特徴的に発現し、AFP や ALB といった肝機能分子が発現する以前の初期胎仔肝細胞にのみ発現すること、Dkk3 は再生肝でも発現上昇するが、再生肝組織における Dkk3 発現細胞は AFP 発現細胞とは異なる事実を見出した (Kano J et al, In Vitro Cell Dev Biol-Animal, 2003, Kano J et al, Lab Invest, 2008)。さらにヒト肝がん組織を用いた Dkk3 の発現解析から、正常部では陰性であるが腫

瘍組織で高発現する症例があり、成体肝細胞由来と考えられる肝細胞がんよりも、胎仔肝由来とされる肝芽腫で有意に発現頻度が高いことが示された。また同一腫瘍組織内で Dkk3 と、肝分化の胎児性マーカーである AFP の発現腫瘍細胞は異なっており、肝腫瘍組織での解析でも Dkk3 は AFP とは異なる過程に関与する分子である可能性が示唆された。これらの結果から Dkk3 が肝分化、肝再生に作用すると予想し、Dkk3 の肝分化および肝再生における作用を明らかにすることによって肝分化の分子機構の一端を新しい側面から解明できるのではないかと思に至った。

2. 研究の目的

Dkk3 は、発生・発がんの主要経路である Wnt シグナルの調節因子とされる Dkk ファミリーの一員であり、がん抑制遺伝子であることが知られていた。一方私たちは Dkk3 を成体肝幹様細胞差次的発現遺伝子の一つとして見出し、胎仔肝と再生肝組織を用いた発現解析により、肝分化や再生に関わる可能性を示した (Kano J et al, Lab Invest, 2008)。さらに肝芽腫および肝細胞がんにおける発現解析から、Dkk3 は肝細胞の未熟性や増殖に関連し、肝分化において AFP 発現とは異なる段階で作用している事が示唆された。しかしその受容体や機能の詳細は不明であった。そこで本研究では Dkk3 が肝分化の分子機構解明の新しいキー分子の一つであると仮定し、Dkk3 の受容体の同定と作用シグナル分子の探索を行い、それら分子の肝分化、再生に対する機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Dkk3 高発現細胞における抗アポトーシス作用の分子機序の解析

Dkk3 高発現肝がん細胞株 Li21 に、Dkk3 に対する siRNA を導入して Dkk3 抑制系を作成し用いた。Dkk3 抑制の作用について、アポトーシスの誘導、活性酸素種 (ROS) の産生、抗酸化剤 N-acetylcysteine (NAC) 添加による影響、抗酸化酵素の発現を、WST-1 分析、caspase3/7 活性測定、phosphatidylserine の細胞膜外層への移行検出、ウェスタンブロット、リアルタイム PCR などの方法を使って解析した。

(2) Dkk3 受容体の探索

Dkk3 高発現細胞株、tPH5CH, HuH6, RD 細胞からの抽出蛋白を用い、免疫共沈降 (Co-IP) および LC-MS/MS 分析によって受

容体候補分子を同定した。

(3) Dkk3 ノックアウトマウスにおける肝再生への影響

Dkk3 ノックアウトマウス

(129S6/SvEvTac-Dkk3,tmlTfur) およびコントロールマウスは理研バイオリソースセンターより購入し、繁殖した。肝障害モデルは CCl₄ 投与 (2.5 μL/g・体重) と先行試験として 70%部分肝切除を施し作成した。再生肝について 3, 7 日目に生存率、肝体重比、組織学的分析を行なった。

4. 研究成果

(1) Dkk3 高発現細胞における抗アポトーシス作用の分子機序

Dkk3 高発現肝がん細胞株 Li21 において Dkk3 を抑制すると細胞の剥離、細胞増殖の減少、caspase3/7 活性の上昇 (図 1)、phosphatidylserine の細胞膜外層への移動が検出され、アポトーシスの誘導が確認されると同時にリン酸化 Erk1/2, Akt の低下が示

図 1 Dkk3 抑制による caspase 活性上昇

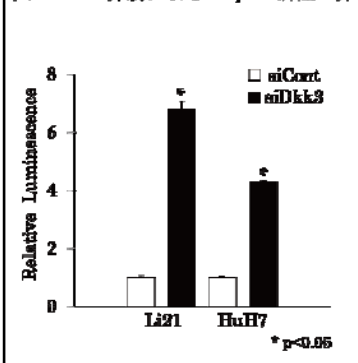
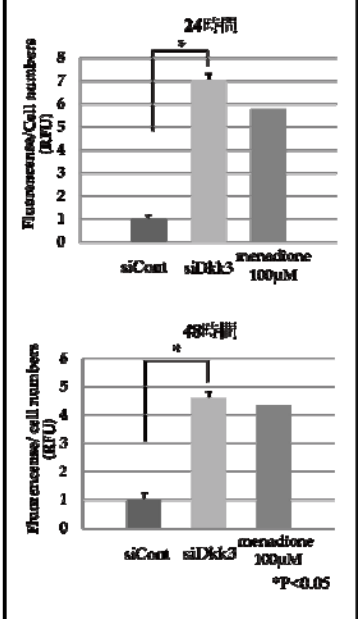


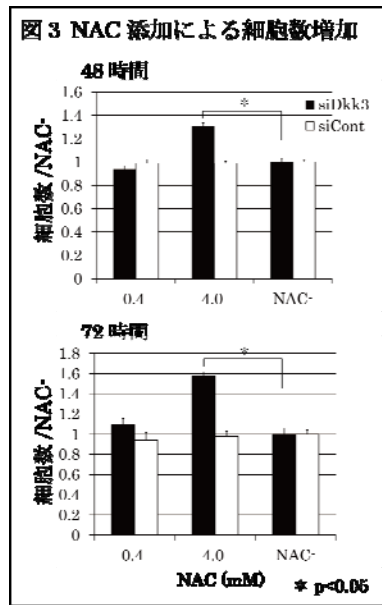
図 2 Dkk3 抑制による ROS 濃度上昇



された。また、Dkk3 抑制細胞において明らかに ROS の増加を認めたこと (図 2) から、Dkk3 発現肝がん細胞株 Li21

において Dkk3 発現を抑制すると酸化ストレスが上昇することが明らかになった。さらに、Dkk3 抑制細胞に NAC を添加し酸化ストレスを低減すると細胞数が有意に増加し Dkk3 抑制によるアポトーシス効果を低減で

きる事が明らかになった (図 3)。このこと



から酸化ストレスの上昇がアポトーシス誘導の一因である可能性が示唆された。一方、Dkk3 抑制による抗酸化酵素の発現について、catalase は有意に低下し、

HO-1, SOD1 では低下傾向が示されたことから、Dkk3 抑制による酸化ストレスの上昇には catalase など抗酸化酵素の発現低下が関与することが示唆された。これまで報告された Dkk3 のがん抑制遺伝子としての作用は、低下している Dkk3 発現を増加することによってアポトーシスが誘導されるというものであった。この点から上記の結果は従来とは反対に、Dkk3 が生存に必要な抗アポトーシス作用を有する場合があることを新規に示したものであり、Dkk3 高発現がん細胞の治療法の開発に有用な知見を加えることができたと考えられる。

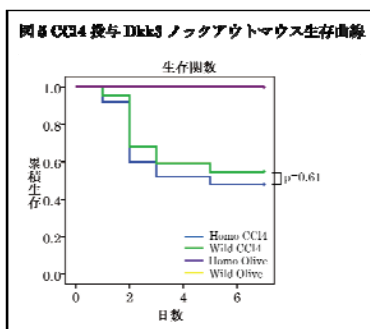
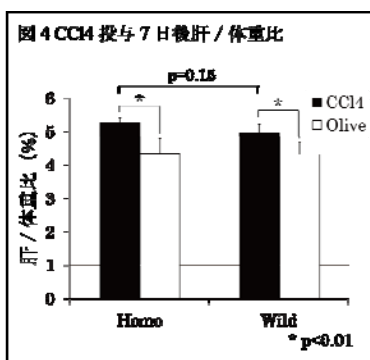
(2) Dkk3 受容体

Dkk3 発現ヒト非腫瘍肝細胞株 tPH5CH 蛋白と分泌 Dkk3 含有馴化培地もしくは組み換え Dkk3 蛋白を用いた Co-IP 及び LC-MS/MS の解析により、Dkk3 受容体として CKAP4 など有力候補を同定した。これらの分子との結合をウェスタンブロットで確認し、現在さらに強制発現系を用いて in situ 結合を試験中である。今後これらの結果により、新規に Dkk3 の受容体が明らかになると共に、腫瘍細胞特異的な Dkk3 の抗アポトーシス作用の解明を目指した本研究を進展させるために重要な標的分子を得ることができると考えられる。

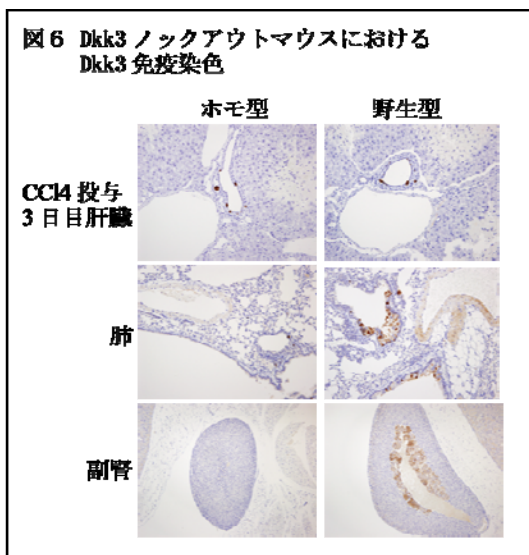
(3) Dkk3 ノックアウトマウスにおける肝再生への影響

① 四塩化炭素投与肝障害モデルを用いて解析を行なった結果、野生型とホモ欠損型で投与 7 日目の肝体重比 (図 4)、生存率 (図 5)、および組織学的検討において有意な差は認められなかった。さらに先行実験として 70%

部分肝切除モデルを用いて解析を行なった結果からも、両遺伝子型間で顕著な差は認められなかった。



確認されているが、Dkk3 に近似する蛋白が発現し機能している可能性が明らかになった (図 6)。このことから本研究で用いたホモ型で Dkk3 の肝再生における機能を解析するためには、発現型の状態について詳細な検討が必要であると考えられた。



(4) 今後の展望

本研究の成果をもとに①受容体以下のシグナル経路の詳細を解析し、酸化ストレス制御による抗アポトーシス機序において Dkk3 がどのように関わっているのか、②Dkk3 高発現がん細胞がどのような機序で特異的に

Dkk3 依存の生存システムを持つのか、を明らかにしていく必要があると考えられる。また肝発生・肝再生における Dkk3 の機能解析はノックアウトマウスのシステムを用いることが最適であると考えられるが、今回用いた開始コドンを含むエキソンの相同組み換えによる系以外の系を作成し、改めて検討する必要があると考えられた。

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)

① Pei Y, Kano J, Iijima T, Morishita Y, Inadome Y, Noguchi M. Overexpression of Dickkopf 3 in hepatoblastomas and hepatocellular carcinomas. *Virchows Archiv*. 査読有, 454(6), (2009), 639-646

[学会発表] (計 4 件)

① 加野准子, Dickkopf 3の抗アポトーシス機能, 第18回肝細胞研究会, 2011年6月25日, 東京ガーデンパレス

② 加野准子, Dickkopf 3の抗アポトーシス機序の解明, 第15回日本肝臓医生物学研究会, 2011年10月8日, 秋田温泉さとみ

③ Junko Kano, Establishment of hepatic stem-like cell lines from normal adult porcine liver in a poly-D-lysine-coated dish with NAIR-1 medium. 3rd Pan Pacific Symposium on Stem Cells Research 2010, 2010年4月17日, Taichung

④ Pei Yihua, 肝腫瘍における肝幹様細胞特徴的遺伝子dickkopf3の発現と機能解析, 第6回日本病理学会カンファレンス, 2009年7月31日, つくば国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/diagpatho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加野 准子 (KANO JUNKO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：60334059

(2) 研究分担者

野口 雅之 (NOGUCHI MASAYUKI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：00198582

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：