

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590999

研究課題名(和文) ヒトTCF-4アイソフォームによる造腫瘍能獲得は低酸素依存性である

研究課題名(英文) Human T-Cell factor-4 isoform promotes tumorigenicity in a hypoxia-dependent manner

研究代表者

古賀 浩徳 (Koga, Hironori)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：90268855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナル伝達系は発生や発癌過程において極めて重要な役割を担っている。これまで私たちは、Wntシグナル伝達系の中核転写因子であるTCF-4のisoformを14種クローニングし、そのisoformに内在するモチーフ「SxxSS」の機能に着目している。今回の研究によって、このモチーフを失うことが細胞の「低酸素耐性」を亢進させ、腫瘍形成に有利に働くことを明らかにした。その機序として、「SxxSS」の欠失がVHLの発現低下を介してHIF-2の安定化を誘導することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The Wnt signaling pathway plays a major role in development and carcinogenesis. Its downstream gene expressions occur through T-cell factor (TCF) proteins. We previously identified and cloned 14 human TCF-4 isoforms, and focused on function of the unique motif SxxSS in the isoforms. In our three-year study, we have demonstrated that loss of the SxxSS motif in a TCF-4 isoform confers hypoxia resistance to liver cancer cells, possibly resulting in augmented tumorigenesis. One of the underlying mechanisms was increased expression levels of HIF-2 α through down-regulated expression of VHL.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学 Wntシグナル 低酸素 TCF

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近の知見により、癌治療後の転移・再発には治療抵抗性の癌幹細胞の関与が指摘されている。したがって、難治癌に対する治療戦略を考える際、癌幹細胞の生物学を理解し、それらの細胞に対する標的分子を探索することには大きな意味がある。これまで、ヒト肝癌においても癌幹細胞が同定されてきたが、これらの細胞では他の癌腫同様 Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の活性化が認められる。したがって、このシグナル伝達系の活性制御機構を明らかにすることが特に重要となる。そこで、我々は Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の中核転写因子 TCF-4 に着目し、その isoform をヒト肝癌細胞株から単離・同定することを試みた。その結果、新規 12 クローンを含む 14 クローンの TCF-4 isoforms を単離することができた。

(2) TCF-4 の第 9 エクソン内に存在する SxxSS モチーフが TCF-4 の転写活性を鋭く制御することが明らかになっていた (JBC 2001, JBC 2003)。そこで TCF-4J、TCF-4K および TCF-4A、TCF-4B、の 4 つの TCF-4 isoform を研究の主たる対象に位置づけた。これら 4 つの isoform の転写活性を比較したところ、「SxxSS」を有する K と A が、それぞれ J、B より低かった。すなわち、「SxxSS」には TCF-4 の転写活性を抑制する機能があることが示唆された。

次に、これら 4 つの isoform の臨床的意義を検討するため、ヒト HCC における発現を RT-PCR にて解析した。その結果、転写活性の最も低い TCF-4K の発現レベルが低分化 HCC で

最も低くなることに気づいた。対照的に「SxxSS」を欠失している TCF-4J の発現レベルは低分化 HCC でも高度に保たれていた。このことは、転写活性の解析結果と矛盾しなかった。すなわち、より進行した低分化 HCC では、転写抑制性の TCF-4K (「SxxSS」保有型) の発現が減少していたのである。そして、「SxxSS」依存性の細胞形質の差は、低酸素状態で顕著に見られることに気づいた。具体的には、TCF-4J 強発現肝癌細胞では厳しい低酸素環境においても HIF-2 の発現上昇が続いていたが、「SxxSS」を有する TCF-4K 発現細胞では HIF-2 の発現上昇は消失していた。近年、HIF-2 は癌幹細胞のマーカーの一つとして重要視されている (Cancer Cell 2009)。したがって、造腫瘍能を獲得した TCF-4J 発現細胞が厳しい低酸素下で HIF-2 の発現上昇を維持していることは興味深い。

2. 研究の目的

本研究では「SxxSS」がどのようにして HIF-2 シグナル系を制御しているのかに焦点を絞った。また、低酸素環境において、「SxxSS」セリン残基のリン酸化を介した分子スイッチが想定されるので、そのスイッチメカニズムを明らかにすることを目的とした。

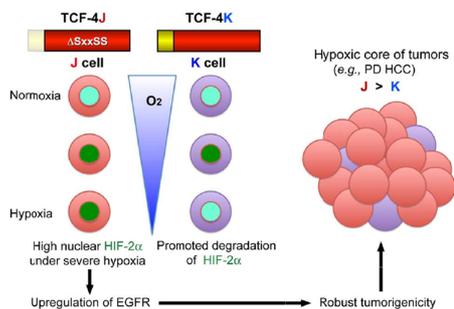
3. 研究の方法

新規にクローニングしてきた TCF-4 isoform を用い、米国 Brown 大学肝臓研究所と共同で以下の計画を遂行した。TCF-4 内の機能モチーフ「SxxSS」の欠失によって活性化される HIF-2 以下のシグナルを同定を目指

した。とくに EGFR 以下の 3 経路 (MAPK、PI3K/Akt、STAT3) に焦点を当てた。さらに「SxxSS」のセリン残基をリン酸化する酵素の同定を目指した。候補として NLK との共発現系での会合などから検討していくが、プロテオミクス的手法で「SxxSS」のセリン残基に対する責任キナーゼを同定しようと努めた。

4 . 研究成果

1) 「SxxSS」モチーフの欠失は VHL の発現低下を介して HIF-2 の安定化を誘導し、結果的に EGFR 系を活性化することで、癌細胞の低酸素環境下での増殖に寄与していることが明らかになった (下図; PLoS ONE 2012)。



(2) EGFR 以下の 3 経路 (MAPK、PI3K/Akt、STAT3) の中で、「SxxSS」モチーフによる顕著な活性制御を受けているものとして MAPK が考えられた。

(3) 「SxxSS」先頭のセリン残基(S269)をリン酸化しうる酵素として HIPK2 (Homeodomain-interacting protein kinase 2)を同定した (Cancer Lett 2013)。さらに、この部位は TCF-4 蛋白自体の安定性に深く関与していることを見出している。

(4) また、本研究に付随したいくつかの実験で、この「SxxSS」モチーフには Wnt5a/b 発

現を調節する機能や、低グルコース状況下での細胞増殖を調節する機能などの極めてユニークな機能があることがわかりつつある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Nakamura T, Torimura T, Iwamoto H, Kurogi J, Inoue H, Hori Y, Sumie S, Fukushima N, Sakata M, Koga H, et al. CD34+ cell therapy is safe and effective in slowing the decline of hepatic reserve function in patients with decompensated liver cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol. 査読有, 2014 in press. DOI: 10.1111/jgh.12622.

Torimura T, Iwamoto H, Nakamura T, Koga H, Ueno T, Kerbel RS, Sata M. Metronomic chemotherapy: possible clinical application in advanced hepatocellular carcinoma. Transl Oncol. 査読有, 2013;6:511-519.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3799193/>

古賀浩徳, Kim Miran, 中村徹, ほか. 低酸素環境における β -catenin-TCF-4 相互作用と肝癌の悪性化. 消化器内科, 査読無, 2013;57:485-490. (DOI, URL 無)

伏見崇, 古賀浩徳, 上妻友隆, ほか. 妊娠中に発症し胎児に腹水を認めた自己免疫性肝炎の 1 例. 肝臓, 査読有, 2013;54:780-786. (DOI, URL 無)

Tomimaru Y, Koga H, Shin TH, et al. The SxxSS motif of T-cell factor-4 isoforms modulates Wnt/ β -catenin signal activation

in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* 査読有, 2013;336;359-369. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.03.031.

Tomimaru Y, Koga H, Yano H, et al. Upregulation of T-cell factor-4 isoform-responsive target genes in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 査読有, 2013;33;1110-1112. DOI: 10.1111/liv.12188

Koga H, Tamiya Y, Mitsuyama K, et al. Probiotics promote rapid-turnover protein production by restoring gut flora in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Hepatol Int.* 査読有. 2013;7:767-774. DOI:10.1007/s12072-012-9408-x

古賀浩徳, ほか. T-cell factor (TCF)-4 アイソフォームによる低酸素耐性と腫瘍形成能制御. *消化器内科*, 査読無, 2013;56:331-339. (DOI, URL 無)

Koga H, et al. PPAR potentiates anticancer effects of gemcitabine on human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 査読有, 2012;40:679-685. DOI: 10.3892/ijo.2011.1237.

Koga H, et al. Loss of the SxxSS motif in a human T-cell factor-4 isoform confers hypoxia resistance to liver cancer: an oncogenic switch in Wnt signaling. *PLoS One.* 査読有. 2012;7:e39981. DOI: 10.1371/journal.pone.0039981.

[学会発表](計22件)

Hironori Koga

「The Wnt signal transcription factor TCF-4 directly regulates Bcl-xL expression in human hepatocellular carcinoma cells」, AACR 2014、2014年4月6日、San Diego

古賀浩徳

「NAFLD患者におけるsmall-dense LDLコレステロール解析の意義」, 第40回日本肝臓学会西部会、2013年12月6日、岐阜市

Hironori Koga

「T-cell factor-4 isoforms directly regulate Bcl-xL expression in human hepatocellular carcinoma cells」, AASLD The Liver Meeting 2013、2013年11月5日、Washington D.C.

古賀浩徳

「NAFLD患者におけるリポ蛋白粒子サイズの検討」, JDDW 2013、2013年10月10日、東京

Hironori Koga

「TCF-4 directly regulates Bcl-xL expression in liver cancer cells」, 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月4日、横浜市

古賀浩徳

「Wnt シグナル転写因子 TCF-4 による Bcl-xL 発現の転写レベル調節機構」, 第45回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、2013年9月13日、福岡市

古賀浩徳

「NAFLD患者における脂質粒子サイズの検討」, 第101回日本消化器病学会九州支部例会、2013年6月21日、北九州市

Hironori Koga

「Probiotics promote rapid-turnover

protein production by restoring gut flora in patients with alcoholic liver cirrhosis」, APASL 2013、2013年6月9日、Singapore

古賀浩徳

「アルコール性肝硬変に対するプロバイオティクスの効果」, 第49回日本肝臓学会総会、2013年6月6日、東京

古賀浩徳

「Wntシグナルと肝癌」, 第49回肝形態科学研究会(招待講演)、2013年6月5日、東京

Hironori Koga

「Drug resistance as a function of human T-cell Factor-4 isoform expression in hepatocellular carcinoma cells」, AACR 2013、2013年4月7日、Washington D.C.

古賀浩徳

「Wntシグナル転写因子TCF-4のアイソフォームにおける構造機能相関」, 第15回Liver Forum in Kyoto、2013年3月30日、京都市

古賀浩徳

「TCF-4アイソフォームは抗癌剤耐性形質を制御する」, 第20回浜名湖シンポジウム、2012年12月23日、浜松市

Hironori Koga

「Drug resistance as a function of human T-cell Factor-4 isoform expression in hepatocellular carcinoma cells」, AASLD The Liver Meeting 2012、2012年11月11日、Boston

古賀浩徳

「低酸素環境における β -catenin-TCF-4 相互作用と肝癌の悪性化」, JDDW 2012、2012年

10月11日、神戸市

古賀浩徳

「Wntシグナル転写因子T-cell factor-4は抗癌剤耐性を制御する」, 第44回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、2012年09月28日~2012年09月29日、高知市

Hironori Koga

「T-cell Factor-4 isoforms regulate drug resistance involving upregulation of Bmi-1 in hepatocellular carcinoma cells」, 第71回日本癌学会学術総会、2012年09月19日、札幌市

古賀浩徳

「Wntシグナルと低酸素ニッチの接点:T-cell factor-4 isoformは特異的モチーフ依存性にHIF-1 α 分解を制御する」, 第48回日本肝臓学会総会、2012年06月06日~2012年06月08日、金沢市

Hironori Koga

「Thiazolidinediones augment anticancer effects of gemcitabine on human pancreatic cancer cells through PPAR γ activation」, AACR 2012、2012年3月31日~2012年4月5日、Chicago

古賀浩徳、Jack R. Wands、Miran Kim

「ヒト肝癌細胞由来T-cell factor-4 isoformによる低酸素耐性と腫瘍形成能制御」, JDDW 2011、2011年10月21日、福岡市

②Hironori Koga, Orkhontuya Tsedensodnom, Evan J. Walker, Han Chu Lee, Kang Mo Kim, Hirohisa Yano, Jack R. Wands, Miran Kim

「Loss of SxxSS motif in TCF-4 Isoform Confers Tumorigenic Potential to

Hepatocellular Carcinoma

Upregulating HIF-2 α 、第70回日本癌学会
学術総会、2011年10月3日、名古屋市

②古賀浩徳、Jack R. Wands、Miran Kim

「ヒト T-cell factor-4 アイソフォームによ
る低酸素耐性：低分化癌発育のメカニズム」

第43回日本臨床分子形態学会総会・学術集
会、2011年9月9日、高槻市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/staff/liver.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀浩徳 (KOGA, Hironori)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：90268855