

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430134

研究課題名(和文)新規バイオマーカーAPC結合蛋白EB1の肝細胞癌発癌進展における分子機構の解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism of adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 in HCC

## 研究代表者

中西 一彰(NAKANISHI, Kazuaki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：80374338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：以前にAdenomatous polyposis coli結合蛋白EB1(以下EB1)が肝細胞癌で高発現していることを報告した。今回の研究で、初発肝細胞癌根治切除症例においてEB1の発現は分化度、AFP、門脈浸潤と有意な相関関係を示し、EB1高発現群では全生存率が有意に不良であり、再発率も有意に高かった(各 $P<0.0001$ )。肝癌細胞株においてEB1の発現を変動させると、細胞の増殖能・遊走能・浸潤能・腫瘍増殖能がパラレルに変動した。マイクロアレイ解析においてEB1はDlk-1の発現を制御している可能性が示唆された。以上より、EB1は新規バイオマーカーとして有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 (EB1) is overexpressed in HCC tissues by proteomics. In present study, EB1 expression significantly correlated with the degree of histological differentiation, AFP, vascular invasion status in HCC patients. Moreover, overall survival and recurrence rate was significantly poor in EB1-high expressed HCC patients. EB1 promoted cell proliferation, migration, invasion, tumor growth in HCC cell lines. Microarray analysis revealed that EB1 might regulate the expression level of Dlk-1. As a conclusion, EB1 may become a new biomarker of HCC and a potential molecular target of HCC therapy.

研究分野：肝癌

キーワード：EB1 肝細胞癌 バイオマーカー 増殖 浸潤 Dlk-1

1. 研究開始当初の背景

我々は Proteomics 解析にて正常肝細胞株と比較して肝細胞癌株で APC binding protein EB1(以下 EB1)が高発現していることを明らかにした。EB1 は乳癌や胃癌、大腸癌、食道癌でも高発現していることが報告されている。

EB1 は腫瘍制御タンパクとして有名な APC と結合するタンパクとして 1995 年に発見され、その後微小管の伸長端に特異的に局在し微小管の動的不安定性を制御するのに重要なタンパクであることが知られている。その機能は生物種を超えて高く保存されていることも分かっている。

しかし、肝細胞癌におけるその役割は十分に明らかとなっていない。

2. 研究の目的

肝細胞癌における EB1 の発現の意義およびその役割を解明する。

3. 研究の方法

(1)1997年 から 2006年 までに当院で行った 235 例の初発肝細胞癌根治切除症例を対象に免疫組織化学染色を行い、臨床病理学的因子と EB1 の発現との相関関係を検討した。また、予後・再発における EB1 の発現の意義についても検討した。

(2)当科で保有している肝癌細胞株を用いて EB1 の発現を Western blot にて解析し、その中で EB1 が比較的高発現している肝癌細胞株 HLF、HLE、HuH7 を用いて下記のアッセイを行った。HLF、HLE、HuH7 に対し EB1 特異的 siRNA を用いて EB1 の発現を一時的に抑制することで、増殖能(MTS アッセイ)、遊走能(Transwell アッセイ)、浸潤能(Matrigel invasion アッセイ)がどのように変化するかを検討した。HLF に対し EB1 特異的 shRNA をレンチウイルスを用いて導入し EB1 の発現を恒常的に抑制することで、増殖能、遊走能、浸潤能がどのように変化するかを検討した。HuH7 に対し CRISPR/Cas9 技術を用いて EB1 の発現を一度ノックアウト(KO)し、その EB1-KO HuH7 細胞株に対し EB1 の発現を戻してあげると、増殖能、遊走能、浸潤能がどのように変化するかを検討した。また、各細胞株をマウスに皮下注射し、生体内での腫瘍増殖能の変化を検討した。

(3)EB1-KO HuH7 細胞株と EB1-KO 後 EB1 再発現 HuH7 細胞株から抽出した Total RNA を用いて Microarray 解析を施行し、EB1-KO 細胞株に EB1 を再発現させると、どのような遺伝子が変動するのかを検討した。また、抽出された変動遺伝子でもっとも変動の激しかった遺伝子を Real time PCR および Western blot にて変動を検証した。

4. 研究成果

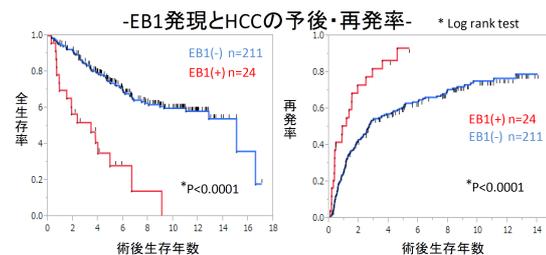
(1)免疫組織化学的検討では、まず胆管上皮細胞を Internal positive control として

腫瘍細胞の EB1 染色度がその胆管上皮より強いものを陽性、それ以下のものを陰性と評価し、その後その腫瘍細胞が腫瘍全体の 30% 以上を占める場合を EB1 発現陽性症例と診断した。上記診断基準を用いると、EB1 陽性症例は 235 例中 24 例、陰性症例は 211 例であった。臨床病理学的因子との検討(Pearson の<sup>2</sup> 検定あるいは Student t 検定)では、EB1 陽性群と AFP、PIVKA-II、分化度、腫瘍径、門脈浸潤、肝内転移との強い相関が得られた(いずれも P<0.05)。また、予後・再発の検討(Kaplan-Meier 法および Log rank 検定)では、EB1 陽性群は有意に予後が不良であり(P<0.0001)、再発率も有意に上昇していた(P<0.0001)。以上のことから、肝細胞癌において EB1 の発現は癌の増殖や浸潤との強い相関関係があると考えられた。また、EB1 の発現は肝細胞癌の予後・再発予測因子として有用であると考えられた。

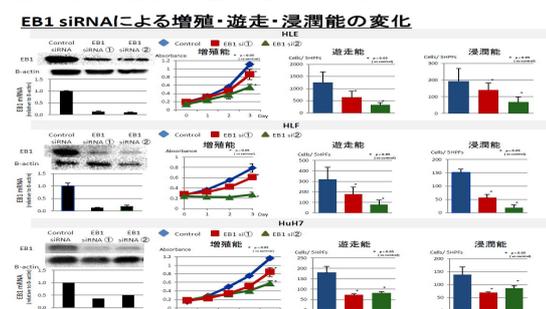
-EB1発現と臨床病理学的因子との関連性-

	EB1 (+)	EB1 (-)	P Value
性別(男性/女性)	23/1	172/39	0.0770
年齢	56.3	61.7	0.0054
ウイルス感染状況(HBV/HCV/両方/なし)	12/8/1/3	77/78/5/51	0.4461
Child-Pugh分類(A/B)	20/3	205/4	0.0031
肝硬変(あり/なし)	10/13	67/135	0.3234
AFP (≥20ng/ml/ <20)	18/6	101/107	<b>0.0141</b>
PIVKA-II(≥40AU/ml/ <40)	18/5	117/84	0.0627
病期(I + II / III + IVa)	7/17	141/69	<b>0.0003</b>
腫瘍数(単発/多発)	11/9	121/34	<b>0.0241</b>
腫瘍径(cm)	7.4	3.7	<b>0.0006</b>
分化度(高+中/低分化型)	10/14	178/33	<b>&lt;0.0001</b>
門脈浸潤(あり/なし)	14/10	29/182	<b>&lt;0.0001</b>
肝内転移(あり/なし)	11/13	46/165	<b>0.0092</b>

\* Pearson χ<sup>2</sup> 検定または Student t 検定 \* \* 原発性肝癌取扱規約に準ずる

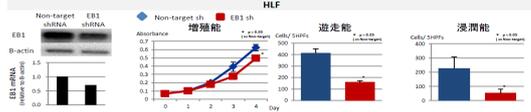


(2) 肝癌細胞株 HLF、HLE、HuH7 に対し 2 種類の EB1 特異的 siRNA と control siRNA を用いて増殖能・遊走能・浸潤能アッセイを行ったところ、いずれの細胞株においても EB1 を一過性に抑制すると細胞の増殖能・遊走能・浸潤能が有意に低下した。



(2) 肝癌細胞株 HLF に対し EB1 特異的 shRNA と control 用に Non-target shRNA をレンチウイルスを用いて導入し、増殖能・遊走能・浸潤能アッセイを行ったところ、EB1 を恒常的に抑制しても細胞の増殖能・遊走能・浸潤能が有意に低下した。

EB1 shRNAによる増殖・遊走・浸潤能の変化



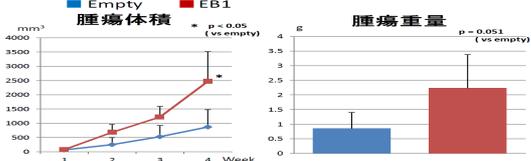
(2) 肝癌細胞株 HuH7 に対し CRISPR/Cas9 技術を用いて一度 EB1 の発現を KO した細胞株を 2 種類 (EB1-KO HuH7 #1 と EB-KO HuH7 #6) 作製した後に、EB1 の塩基配列をあらかじめ導入した EB1 再発現用レンチウイルスまたは何の配列も導入していないコントロール用レンチウイルスをそれぞれの EB1-KO HuH7 細胞株に導入し、増殖能・遊走能・浸潤能アッセイを行ったところ、EB1 の発現を戻すことによって細胞の増殖能・遊走能・浸潤能が有意に上昇した。

EB1-KO後再発現による増殖・遊走・浸潤能の変化



また、過齡 5 週目の雌のヌードマウスに上記 EB1-KO HuH7 #1 細胞株と EB1-KO 後再発現 HuH7 #1 細胞株を皮下注し、生体内での腫瘍増殖能を検討したところ、EB1 の発現を戻すことで生体内での腫瘍増殖能が有意に上昇した。

EB1-KO後再発現による腫瘍増殖能の変化



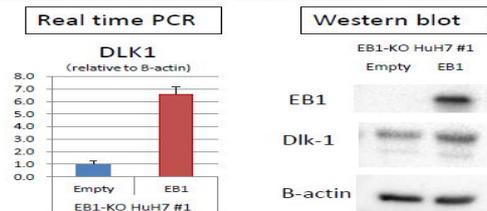
以上のことから、EB1 の発現は肝癌細胞株の増殖能・遊走能・浸潤に深く関わっているものと考えられた。また、生体内における腫瘍増殖にも強く関与しているものと考えられた。

(3) 上記 EB1-KO HuH7 #1 細胞株と EB1-KO 後再発現 HuH7 #1 細胞株の Total RNA を RNA 抽出キットを用いて抽出し、その RNA を Microarray 測定用の変換キットを用いてラベル化 cRNA に変換し、Agilent SurePrint G3 Human GE v3 8x60K Microarray (Design ID: 072363) を用いて Microarray 解析を行ったところ、2 倍以上有意に上昇していた変動遺伝

子が 18 個、2 倍以上有意に減少していた変動遺伝子が 51 個抽出された。その中で最も発現が亢進していた遺伝子は Delta like-1 (以下 Dlk-1) であった。

Dlk-1 の mRNA の発現を Real time PCR で、タンパクの発現を Western blot で確認したところ、いずれにおいても発現の亢進がみられた。

EB1-KO後再発現によるDlk-1の発現変化



Dlk-1 の発現は肝癌細胞癌の増殖に深く関与していると報告されていることから、EB1 の発現亢進により癌の増殖が亢進する一因として Dlk-1 の発現亢進が関与している可能性が今回の研究で示唆された。

## 5. 主な発表論文等 (雑誌論文) (計 0 件)

## (学会発表) (計 7 件)

相山健、横尾英樹、折茂達也、大畑多嘉宣、柿坂達彦、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、福原崇介、高橋秀徳、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信：肝細胞癌における Adenomatous polyposis coli 結合蛋白 EB1 の機能解析、第 116 回日本外科学会定期学術集会、リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府大阪市)、2016 年 4 月 14 日 4 月 16 日

相山健、横尾英樹、折茂達也、大畑多嘉宣、柿坂達彦、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、高橋秀徳、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信：肝細胞癌における Adenomatous polyposis coli 結合蛋白 EB1 と浸潤の関連性、第 26 回日本消化器癌発生学会総会、米子全日空ホテル (鳥取県米子市)、2015 年 11 月 19 日 11 月 20 日

相山健、折茂達也、横尾英樹、大畑多嘉宣、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、神山俊哉、武富紹信：Vp3,4 肝細胞癌の門脈腫瘍栓に対する術前放射線治療と APC-binding protein EB1 の発現の意義、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)、2015 年 10 月 8 日 10 月 10 日

相山健、横尾英樹、折茂達也、大畑多嘉宣、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、高橋秀徳、若山顕治、柿坂達彦、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信：肝細胞癌における Adenomatous polyposis coli 結合蛋白 EB1 の新規バイオマーカーとしての可能性、第 115 回日本外科学会定期学術集会、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)、2015 年 4 月 16 日 4 月 18 日

相山健、横尾英樹、折茂達也、大畑多嘉宣、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、若山顕治、

柿坂達彦、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信：肝細胞癌における Adenomatous polyposis coli 結合蛋白 EB1 の予後・再発予測因子としての有用性。第 25 回日本消化器癌発生学会総会、ホテル日航福岡（福岡県福岡市）2014 年 11 月 13 日 11 月 14 日

相山健、折茂達也、横尾英樹、大畑多嘉宣、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、神山俊哉、武富紹信：肝細胞癌における APC-binding protein EB1 の予後・再発予測因子としての有用性。第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）、2014 年 9 月 25 日 9 月 27 日

Aiyama T, Orimo T, Yokoo H, Ohata T, Hatanaka K, Hatanaka Y, Matsuno Y, Wakayama K, Kakisaka T, Tsuruga Y, Kamachi H, Kamiyama T, Taketomi A : Adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 as an important predictive factor for the prognosis and recurrence in hepatocellular carcinoma. AASLD the liver meeting 2014, Boston(USA), 2014.11.7-11.11

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

中西 一彰(NAKANISHI, Kazuaki)  
北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 I・客員研究員  
研究者番号：80374338

##### (2)研究分担者

横尾 英樹(YOKOO, Hideki)  
北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 I・助教  
研究者番号：70399947

柿坂 達彦(KAKISAKA, Tatsuhiko)  
北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 I・特任研究助教  
研究者番号：40583092

神山 俊哉(KAMIYAMA, Toshiya)  
北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 I・准教授  
研究者番号：80322816

武富 紹信(TAKETOMI, Akinobu)  
北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 I・教授  
研究者番号：70363364

##### (3)連携研究者

折茂 達也(ORIMO, Tatsuya)  
北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 I・助教  
研究者番号：80711861

##### (4)研究協力者

福原 嵩介(FUKUHARA, Takasuke)  
大畑 多嘉宣(OHATA, Takanori)  
高橋 秀徳(TAKAHASHI, Hidenori)  
小林 希(KOBAYASHI, Nozomi)  
三好 早香(MIYOSHI, Sayaka)  
堀米 正敏(HORIGOME, Masatoshi)