

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460980

研究課題名(和文)肝疾患におけるHippo pathwayの役割

研究課題名(英文)The Hippo pathway in liver disease

研究代表者

浅岡 良成 (Asaoka, Yoshinari)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90431858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo pathwayの因子WW45の変異を細胞株および臨床検体で認めた。この変異を有する細胞株において、エフェクター因子であるYAP1およびTAZのノックダウン細胞株を樹立した。YAP1のノックダウンでは、pile up現象の抑制、TAZのノックダウンではEMT様の表現型の減弱を認めた。YAP1のノックダウンにより、既知の標的遺伝子のCTGFの発現低下とともにTGFB2の発現低下を認めており、表現型との関与を検討中である。

研究成果の概要(英文)：We discovered somatic mutations of WW45, which is a components of the Hippo pathway, in cell lines and clinical samples of liver cancer. Using one of these cell lines, We established YAP1 or TAZ knockdown cells. These transcription cofactors are downstream effector genes for this pathway. The YAP1 knocked-down cells could not grow overcoming contact inhibition. The TAZ knocked-down cells partially lost the phenotype like EMT. In YAP1 knocked-down cells, the expression of TGFB2 decreased in concordance with the expression of CTGF, an already-known target of YAP1. We are now examining the relationship between the phenotype and the expressed gene.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝臓 Hippo pathway 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

Hippo pathway は、近年明らかとなったシグナル伝達経路であり、腫瘍形成に関連しているとともに、細胞における接触阻止をはじめ、細胞に加わった力を感知するシステムや癌幹細胞に関与することが知られ、注目されるようになっている。

肝臓においてもマウスモデルを用いた解析により、このシグナルが肝細胞の増殖、発癌に重要な役割を果たすことが明らかにされている。

われわれは、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた消化器癌細胞株における網羅的なゲノム異常の解析により、肝癌細胞株 HT17 に Hippo pathway の構成因子である WW45 のホモ欠失があることを認め、さらにゲノム DNA のシーケンスにより、HLE、HLF 細胞に機能喪失変異、臨床検体 2 例にもミスセンス変異を認めることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、Hippo pathway と肝臓および肝硬変などの肝臓における各種病態との関与を明らかとすることを目的とする。

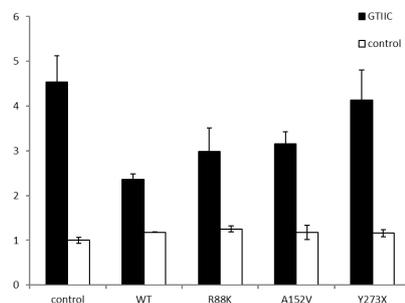
3. 研究の方法

臨床検体から DNA を抽出し、WW45 のシーケンスを行う。

HLE、HLF 細胞に関して、shRNA を用いて Hippo pathway のエフェクター遺伝子である YAP および TAZ のノックダウン株を作成する。表現型を解析、また、これらの株から RNA を抽出し、YAP および TAZ のそれぞれの下流、発癌への関与を解析する。

4. 研究成果

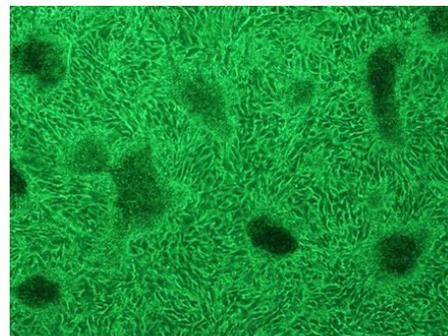
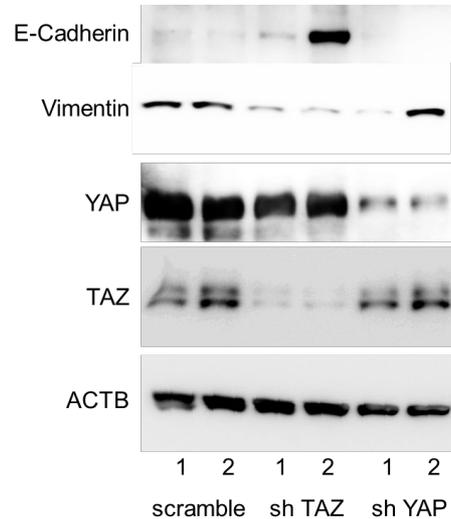
臨床検体での解析において 2 検体でミスセンス変異を認めた。レポーターアッセイで、これらの遺伝子異常で、WW45 遺伝子の活性が低下することが確認された。



HLF 細胞において YAP1 と TAZ のノックダウン細胞を樹立した。

HLF 細胞は密集しても pile up する現象を認め、Hippo シグナルの異常により接触阻害がかからないことが示唆された。

この現象は、YAP1 のノックダウン株でキャンセルされた。

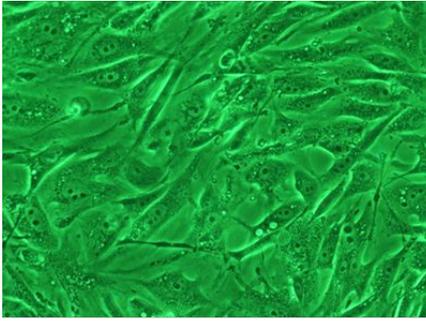


コントロール

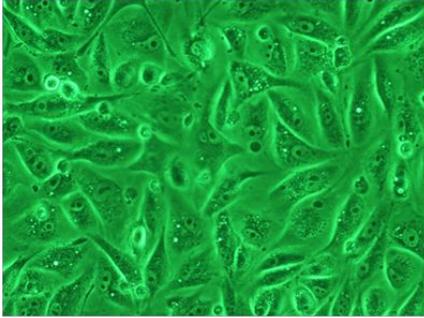


YAPノックダウン

HLF 細胞の TAZ ノックダウン細胞株では、EMT 様変化の減弱を認め、E-カドヘリンの発現上昇およびビメンチンの発現低下を認めた。

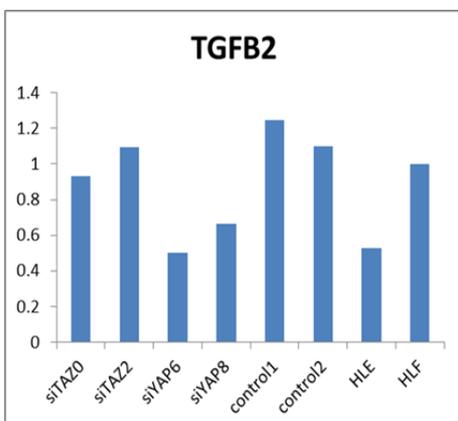
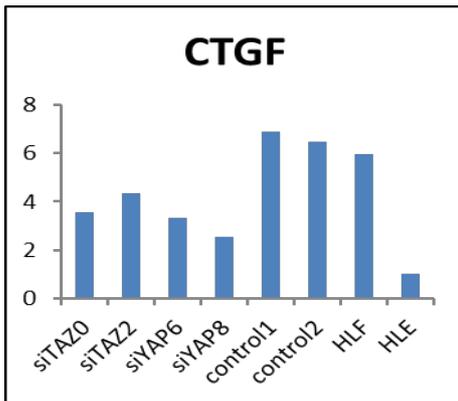


コントロール



TAZノックダウン

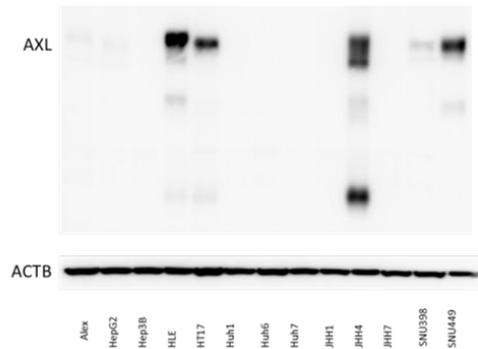
また YAP1 のノックダウン株では、既知の標的遺伝子である CTGF の発現低下とともに TGF2 の発現低下を認めていた。HLE, HLF 細胞は他の肝癌細胞株と比較し、EMT 様の特性を所持しており、YAP1 の活性化に伴う TGF2 や CTGF の発現上昇が関与している可能性が示唆された。



HLE, HLF 細胞のほかに、細胞株のデータベースである Cancer Cell Line Encyclopedia (www.broadinstitute.org/ccle/home) によると SK-HEP1 細胞にもこの pathway の LATS1 遺伝子の変異を認めていることが判明した。

これらの細胞はいずれも CD90 陽性であることが報告されている (Hepatology 2013; 57:1484-97)。われわれのさらなる検討では、Hippo pathway との関連が示唆されている CD44 (Cancer Res 2010; 70: 2455-64) や受容体型チロシンキナーゼである AXL (Oncogene 2011; 30:1229-40) の発現も陽性であることを確認した。

われわれは、PLC/PRF/5、HepG2、Hep3B、Huh1、Huh6、Huh7、HLE、HLF、HT17、SK-HEP-1、JHH1、JHH4、JHH7、SNU398、SNU449 の 15 種類の肝癌細胞株を有しており、ゲノム異常のデータを有している。この中で、HLE、HLF、HT17、SK-HEP-1、JHH4、SNU449 の 6 種類の細胞では、CD44、CD90、AXL が高発現である一方、非常に興味深いことに、残りの 9 種類の細胞ではほとんど発現しておらず、明瞭に区別された。



まとめ

肝癌において Hippo pathway の因子の遺伝子変異を認めた。この pathway の異常を伴う細胞株では間葉系の表現型を呈しており、癌幹細胞とも関連している可能性が示唆された。

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3件)

Asaoka Y, Tateishi R, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Frequency of and predictive factors for vascular invasion after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. PLoS One. 査読有 2014 Nov 14; 9(11):e111662. doi: 10.1371/journal.pone.0111662.

eCollection 2014.

Asaoka Y, Ijichi H, Koike K. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N Engl J Med. 査読有 2015 Nov 12;373(20):1979. doi: 10.1056/NEJMc1510353#SA1.

Ikenoue T, Terakado Y, Nakagawa H, Hikiba Y, Fujii T, Matsubara D, Noguchi R, Zhu C, Yamamoto K, Kudo Y, Asaoka Y, Yamaguchi K, Ijichi H, Tateishi K, Fukushima N, Maeda S, Koike K, Furukawa Y. A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion. Sci Rep. 査読有 2016 Apr 1;6:23899. doi: 10.1038/srep23899.

〔学会発表〕(計1件)

浅岡良成、田中康雄、建石良介、小池和彦「肝臓における Hippo シグナルの役割に関する検討」第50回日本肝癌研究会、2014年6月5日、国立京都国際会館(京都府京都市左京区)

〔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〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/livercancer/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅岡 良成 (ASAOKA YOSHINARI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90431858

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし