

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 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：25460981

研究課題名(和文)肝細胞癌における直鎖状ポリユビキチン鎖の役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of the roles of linear polyubiquitin chains and Sharpin in hepatocellular carcinoma

研究代表者

建石 良介 (Tateishi, Ryosuke)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：50444089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肝細胞癌における直鎖状ポリユビキチン鎖の役割とSharpin高発現の意義の検討を行った。Sharpinは癌部で発現が増加しており、腫瘍径及び病理学的悪性度と有意な相関を認めた。Sharpin安定発現株では増殖能に変化は認めなかったものの浸潤能が亢進し、一部NF- κ B非依存的な機序が考えられた。cDNAマイクロアレイ解析ではVersicanという細胞外マトリックスプロテオグリカンの発現亢進が認められ、ノックダウンで浸潤能は低下した。SharpinはVersicanの発現亢進を介して肝癌の浸潤を促進している可能性が示唆され、新規の癌進展メカニズムと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sharpin is one of the components of the LUBAC, which specifically generates linear polyubiquitin chains to activate NF- κ B pathway. Sharpin is also reported to be up-regulated in various types of cancers including HCC and implicated in cancer progression. In this study, we showed that Sharpin transcription was up-regulated in HCC tissues, and significantly correlated with tumor size and histology. Increased expression of Sharpin enhanced the invasion of hepatoma cells, and cDNA microarray analysis identified that Versican, an extracellular matrix proteoglycan, was also up-regulated in Sharpin expressing cells. Knocking down of Versican greatly attenuated the invasion of hepatoma. Furthermore, Sharpin overexpression resulted in activation of Versican promoter activity. Taken together, these results suggest that Sharpin plays crucial roles in tumor-invasiveness during cancer progression through transactivating Versican.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝臓 肝細胞癌 Sharpin 癌関連遺伝子 浸潤能

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン (ubiquitin)は3種の酵素、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン転移酵素(リガーゼ) (E3) により鎖状につながり(ポリユビキチン鎖)その標的タンパクに結合することで、タンパク質分解や細胞内シグナル伝達、さらにはDNA修復や翻訳調節などさまざまな生命現象に関与していることが知られている。

ユビキチンには7つのリジン残基(K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63)が存在し、一般的にこれら全てのリジン残基を介してポリユビキチン鎖が形成されるが、どのリジンを介したユビキチン鎖かによりそれぞれ細胞内での役割が異なっている。プロテアソーム依存性のタンパク質の分解にはユビキチンの48番目のリジン残基を介したユビキチン鎖(K48型ポリユビキチン鎖)が関与している一方で、63番目のリジン残基を介したK63型ポリユビキチン鎖は転写因子NF- κ Bを活性化することが知られている。

近年このK63型ポリユビキチン鎖以外にユビキチンのN末端メチオニン残基のアミノ基とC末端グリシン残基とがペプチド結合することで形成される直鎖状ポリユビキチン鎖が細胞内に存在し、NF- κ B活性化に関与していることが明らかとなり、注目を浴びている(EMBO J. 2006;25:4877-87)。

彼らはHOIL-1L・HOIP・SHARPIN (SHANK-ASSOCIATED RH DOMAIN INTERACTOR)複合体が直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に形成するユビキチンリガーゼLUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex)であることを明らかにし、さらにこの複合体がTNFなど種々の刺激に依存的にNF- κ Bを活性化に導くことが分かった。(Nature 2011;471:633-6)

このSHARPINという分子は1993年に慢性皮膚炎、種々の免疫異常、関節炎など多彩な症状を呈する自然変異マウスとして報告されたcpdm(chronic proliferative dermatitis)マウスの責任遺伝子産物である。

肝細胞癌を含むさまざまな悪性腫瘍で恒常的なNF- κ B活性化はすでに報告されているが、そのメカニズムは決して明らかではなかった。近年、悪性腫瘍においてSHARPINが高発現しており特に卵巣癌・肝細胞癌で高発現が認められることが報告された。(Mol Cell Biochem. 2010;340:161-7) またSHARPINを強制発現させた細胞では、細胞の増殖能、浸潤能が亢進しており、癌の悪性化に関与している可能性が示唆されたものの、その詳細なメカニズムは明らかとはされていない。

2. 研究の目的

(1)肝細胞癌における直鎖状ポリユビキチン鎖の役割

(2)肝細胞癌におけるSHARPIN高発現の意義

を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌臨床検体におけるHOIL-1L・HOIP・SHARPIN複合体、直鎖状ポリユビキチン鎖の発現解析

本研究では東京大学医学部附属病院で採取された、肝細胞癌患者の病理検体の解析を行う。これらは倫理委員会ですでに承認の得られている同意説明文書にて十分に説明し、文書同意を得た後、本人の自由意思による文書同意を得られた当院の入院患者から手術もしくは針生検により採取されたものとする。本研究に協力することで患者さんの負担が増えないよう十分な配慮を行う。

サンプルの肝細胞癌臨床検体におけるHOIL-1L・HOIP・SHARPIN複合体、直鎖状ポリユビキチン鎖の発現状態を検討するために各種抗体を用いた免疫染色もしくは抽出RNAを用いた定量的PCR法を行う。これらの結果と患者臨床データを対比することで、臨床病態との関連を調べる。

(2) 肝細胞癌におけるHOIL-1L・HOIP・SHARPIN複合体の機能解析

肝細胞癌におけるSHARPIN複合体の機能解析を行うために、SHARPINを強制発現もしくはノックダウンした肝癌細胞株を樹立し、その表現型(細胞増殖、浸潤能、遊走能など)を検討する。さらにTNFなどで刺激してNF- κ B活性化能を検討する。

発現遺伝子をcDNAマイクロアレイにて網羅的に解析し、上記の表現型の責任遺伝子の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) 肝細胞癌臨床検体におけるHOIL-1L・HOIP・SHARPIN複合体、直鎖状ポリユビキチン鎖の発現解析

市販の組織アレイの免疫染色では、SHARPINの発現は非癌部に比べ癌部で高発現していた。

さらに当院での肝癌手術検体の解析を行い、SHARPINが非癌部に比べ癌部で高発現していることを確認した。さらにSHARPINの発現は腫瘍径及び病理学的悪性度と有意な相関を認め、肝細胞癌の進展に関与している可能性が示唆された。

(2) 肝細胞癌におけるHOIL-1L・HOIP・SHARPIN複合体の機能解析

SHARPINの生物学的意義を検討するために、

肝癌細胞株で SHARPIN の安定発現細胞株及びノックダウン細胞株を作成し、増殖能や浸潤能など癌の悪性度に関連している表現形を検討した。

SHARPIN は細胞の増殖能には影響を与えなかったが、SHARPIN 高発現の細胞株では細胞浸潤能が亢進していることがマトリゲル細胞浸潤チャンバーを用いた細胞浸潤アッセイで明らかとなった。さらに SHARPIN ノックダウン細胞では浸潤能が低下し、本分子は肝細胞癌の浸潤能に関与している可能性が考えられた。

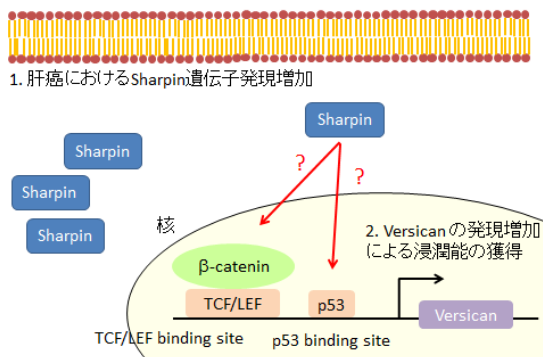
この高浸潤能を持つ SHARPIN の安定発現株を用いて cDNA マイクロアレイ遺伝子発現解析を行い、本表現型の責任分子同定を試みた。その結果、SHARPIN の高発現株では VERSICAN という細胞外マトリックスプロテオグリカンの発現亢進が認められた。一方で既知の NF- κ B 下流の分子の発現上昇は認められなかった。

また VERSICAN は臨床検体でも癌部で発現が増加しており、SHARPIN の発現と相関が認められた。さらに SHARPIN 高発現株で VERSICAN をノックダウンしたところ浸潤能が低下した。以上より、VERSICAN が SHARPIN による浸潤能亢進という表現型を説明する分子の一つである可能性が考えられた。

さらに VERSICAN 発現亢進の機序を検討したところ、VERSICAN の転写は SHARPIN の発現により上昇したが、NF- κ B 活性化では転写は変化しなかった。SHARPIN のカルボキシ末端が浸潤能増強及び VERSICAN 転写に必要であったが、SHARPIN 単独では NF- κ B の活性化は認められず、一部 NF- κ B 非依存的な機序が考えられた。既報では転写因子 p53 や Wnt/ β -catenin 系の転写因子 TCF/LEF が Versican の転写制御に関わることが知られており、これらの転写因子の関与が示唆される。

以上より SHARPIN は一部 NF- κ B 非依存的に VERSICAN の発現亢進を介して肝癌の浸潤を促進している可能性が示唆され、新規の癌進展機序と考えられた。

本研究のまとめ



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 9件)

Koji Uchino, Ryosuke Tateishi, Naoto Fujiwara, Tatsuya Minami, Masaya Sato, Kenichiro Enooku, Hayato Nakagawa, Yoshinari Asaoka, Yuji Kondo, Haruhiko Yoshida, Kyoji Moriya, Shuichiro Shiina, Masao Omata and Kazuhiko Koike.

Impact of serum ferritin level on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients.

Hepatol Res. 2016;46:259-68. (査読有)

doi: 10.1111/hepr.12517.

Tatsuya Minami, Ryosuke Tateishi, Masyuko Kondo, Ryo Nakagomi, Naoto Fujiwara, Masaya Sato, Koji Uchino, Kenichiro Enooku, Hayato Nakagawa, Yoshinari Asaoka, Yuji Kondo, Kyoji Moriya, Shuichiro Shiina and Kazuhiko Koike.

Serum Alpha-Fetoprotein Has High Specificity for the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma After Hepatitis C Virus Eradication in Patients.

Medicine (Baltimore). 2015;94:e901 (査読有)

doi: 10.1097/MD.0000000000000901.

Naoto Fujiwara, Hayato Nakagawa, Yotaro Kudo1, Ryosuke Tateishi, Masataka Taguri, Takeyuki Watadani, Ryo Nakagomi, Mayuko Kondo, Takuma Nakatsuka, Tatsuya Minami, Masaya Sato, Koji Uchino, Kenichiro Enooku, Yuji Kondo, Yoshinari Asaoka, Yasuo Tanaka, Kuni Ohtomo, Shuichiro Shiina, Kazuhiko Koike.

Sarcopenia, intramuscular fat deposition, and visceral adiposity independently predict the outcomes of hepatocellular carcinoma.

J Hepatol.2015;63:131-40. (査読有)

doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.031.

Hayato Nakagawa, Naoto Fujiwara, Ryosuke Tateishi, Toru Arano, Ryo Nakagomi, Mayuko Kondo, Tatsuya Minami, Masaya Sato, Koji Uchino, Kenichiro Enooku, Yoshinari Asaoka, Yuji Kondo, Shuichiro Shiina, Haruhiko Yoshida, Kazuhiko Koike.

Impact of serum levels of interleukin-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients.

J Gastroenterol Hepatol. 2015;30:379-88. (査読有)

doi: 10.1111/jgh.12719.

Naoto Fujiwara, Ryosuke Tateishi, Hayato Nakagawa, Ryo Nakagomi, Mayuko Kondo, Tatsuya Minami, Masaya Sato, Koji Uchino, Kenichiro Enooku, Yuji Kondo, Yoshinari Asaoka, Shuichiro Shiina, Haruhiko Yoshida, Kazuhiko Koike. Slight elevation of high-sensitivity C-reactive protein to predict recurrence and survival in patients with early stage hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2015;45:645-55. (査読有)
doi: 10.1111/hepr.12398.

Tomoko Yamazaki, Mayumi Mori, Satoko Arai, Ryosuke Tateishi, Masanori Abe, Mihoko Ban, Akemi Nishijima, Maki Maeda, Takeharu Asano, Toshihiro Kai, Kiyohiro Izumino, Jun Takahashi, Kayo Aoyama, Sei Harada, Toru Takebayashi, Toshiaki Gunji, Shin Ohnishi, Shinji Seto, Yukio Yoshida, Yoichi Hiasa, Kazuhiko Koike, Ken-ichi Yamamura, Ken-ichiro Inoue, Toru Miyazaki. Circulating AIM as an indicator of liver damage and hepatocellular carcinoma in humans. *PLoS One.* 2014;9:e109123. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0109123

Kenichiro Enooku, Hayato Nakagawa, Yoko Soroida, Ryunosuke Ohkawa, Yuko Kageyama, Baasanjav Uranbileg, Naoko Watanabe, Ryosuke Tateishi, Haruhiko Yoshida, Kazuhiko Koike, Yutaka Yatomi, Hitoshi Ikeda. Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer.* 2014;135:871-9. (査読有)
doi: 10.1002/ijc.28720

Baasanjav Uranbileg, Kenichiro Enooku, Yoko Soroida, Ryunosuke Ohkawa, Yotaro Kudo, Hayato Nakagawa, Ryosuke Tateishi, Haruhiko Yoshida, Seiko Shinzawa, Kyoji Moriya, Natsuko Ohtomo, Takako Nishikawa, Yukiko Inoue, Tomoaki Tomiya, Soichi Kojima, Tomokazu Matsuura, Kazuhiko Koike, Yutaka Yatomi, Hitoshi Ikeda. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. *Int J Cancer.* 2014;134:2189-98. (査読有)
doi: 10.1002/ijc.28547.

Guobin He, Debanjan Dhar, Hayato Nakagawa, Joan Font-Burgada, Hisanobu

Ogata, Yuhong Jiang, Shabnam Shalpour, Ekihiro Seki, Shawn E. Yost, Kristen Jepsen, Kelly A. Frazer, Olivier Harismendy, Maria Hatziapostolou, Dimitrios Iliopoulos, Atsushi Suetsugu, Robert M. Hoffman, Ryosuke Tateishi, Kazuhiko Koike, Michael Karin. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell.* 2013;155:384-96. (査読有)
doi: 10.1016/j.cell.2013.09.031.

〔学会発表〕(計 3 件)

Yasuo Tanaka, Keisuke Tateishi, Takuma Nakatsuka, Yotaro Kudo, Yoshinari Asaoka, Ryosuke Tateishi, Kazuhiko Koike. Sharpin cooperates with Wnt pathway to transactivate Versican expression to promote HCC invasion
APASL2016
グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
2016年02月20日~2016年02月24日

田中 康雄, 立石 敬介, 中塚 拓馬, 宮林 弘至, 高橋 良太, 山本 恵介, 工藤 洋太郎, 浅岡 良成, 伊地知 秀明, 建石 良介, 小池 和彦
新規がん関連遺伝子 Sharpin の肝癌進展における役割の解明
JDDW2015
グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
2015年10月08日~2015年10月11日

Yasuo Tanaka, Keisuke Tateishi, Takuma Nakatsuka, Yotaro Kudo, Yoshinari Asaoka, Ryosuke Tateishi, Kazuhiko Koike. Sharpin promotes invasion of hepatocellular carcinoma through trans-activating Versican expression
AASLD 2014 Annual Meeting (Boston, USA)
2014年11月07日~2014年11月11日

〔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

建石 良介 (TATEISHI, Ryosuke)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：50444089

(2)研究分担者

田中 康雄 (TANAKA, Yasuo)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40422290

(3)連携研究者

該当なし