

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17485

研究課題名(和文) 肝線維化を伴う肝発がん・再発の新規治療標的因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of new therapeutic target factors for tumorigenesis and recurrence with liver fibrosis

研究代表者

岡田 光 (Okada, Hikari)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任助教

研究者番号：50788916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、ヒト臨床検体及びこれまでのモデルマウスから肝線維化病態進行及び肝細胞癌の悪性度の進行に伴いPKMのバリエーションであるPKM1とPKM2共に発現が増加することを発現解析から確認した。PKM1は、肝星細胞を活性化させ筋線維芽細胞に形質転換することで肝線維化病態を亢進させた。PKM2は、肝細胞癌細胞のNotch1の細胞内ドメインNICDと複合体を形成し、核内のCSLを介して肝細胞癌の悪性度を高めている役割があることを示した。これらの研究成果から、肝線維化を基盤とした肝発がん病態は、PKM2単独よりPKM1とPKM2の両方を標的とした発現阻害する治療戦略が効果的であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変を背景とした肝細胞癌患者では、根治的治療後も肝細胞癌が高率に再発し、再発率は年間約20-25%、5年では70%以上に上ることから肝細胞癌の再発抑制が治療上極めて重要な課題である。そのため、肝線維化・肝硬変による肝発がん機序を解明し、新規治療法につながる基礎研究が重要である。今回の研究成果から、肝線維化病態から肝発がん過程におけるPKM1とPKM2の発現制御機序の一端を解明することができ、肝線維化及び肝発がん・再発に対する新規治療標的の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The applicant confirmed from the expression analysis that the expression of both PKM1 and PKM2, which are PKM variants, increases with the progression of hepatic fibrosis and the malignancy of hepatocellular carcinoma. PKM1 enhanced hepatic fibrosis by transforming hepatic stellate cells into myofibroblasts. PKM2 was shown to form a complex with the intracellular domain NICD of Notch1 in liver cancer cells. And it was shown that this complex has a role of increasing the malignancy of hepatocellular carcinoma through CSL in the nucleus. From these research results, it was clarified that a therapeutic strategy that inhibits the expression of both PKM1 and PKM2 is more effective than PKM2 alone for the pathological condition of liver carcinogenesis based on liver fibrosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：肝発がん 肝線維化 PKM NICD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝硬変を背景とした肝細胞癌患者では根治的治療後も肝細胞癌が高率に再発する。肝細胞癌の再発抑制が治療上極めて重要な課題である。そのため、肝線維化・肝硬変による肝発がん機序を解明し、新規治療法につながる基礎研究が重要である。

申請者の研究室は、これまでに国内新規肝細胞癌再発抑制薬ペレチノインが数種類のマウスモデル及びヒト臨床検体を用いて肝線維化・血管新生・肝発がんを抑制することを報告してきた (Okada H et al. Cancer Research 2012, Honda Met al. BMC cancer 2012, Takegoshi K et al. Oncotarget. 2017, Okada H et al. Oncotarget. 2017)。申請者は、新規肝細胞癌再発薬ペレチノインを用いたこれらの Data から肝線維化及び肝細胞癌の発癌に関わる因子を探索した。その結果、新規肝細胞癌再発因子ピルビン酸キナーゼ・マッスル(PKM)を同定した。

2. 研究の目的

申請者は、肝細胞癌の再発を高めるピルビン酸キナーゼ M(PKM)を同定した。肝線維化病態進行による肝発がんに対する PKM1 と PKM2 の生理的役割は未知な状態である。正常肝組織では、ピルビン酸キナーゼ L(PKL)が中心に働き解糖系等のエネルギー代謝の正常状態を維持している。申請者は、PKM1 が肝線維化病態進行に関与し、PKM2 は肝細胞癌の腫瘍成長促進に働くと同時に PKL の機能が損失していることを発見した。本研究では、肝疾患病態進行における PKM の生理的役割・発現制御機構を解明し、肝線維化及び肝発がんの新規治療標的になり得るかを動物モデル及び培養実験で検討する。

3. 研究の方法

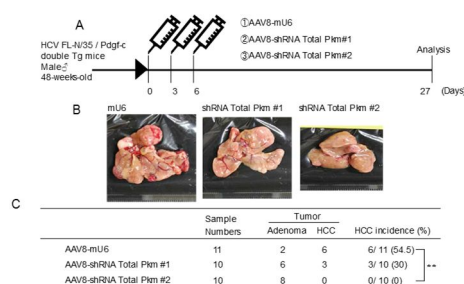
肝臓特異的なアデノ随伴ウイルス 8 型に shRNA-mU6, shRNA-PKM2, AAV8-shRNA total PKM#1 と#2 を搭載したウイルス粒子を作製した。作製後、肝線維化から悪性度の高い肝細胞癌を発症する HCV FL-N/35/ PDGF-C double Tg mice の 48 週齢雄性に尾静注した。ウイルス感染後 27 日目の肝組織を用いて肝線維化・肝発がんに対する影響を検討した。肝線維化の評価は、アザン (AZAN) 染色、シリウスレッド (Sirius Red) 染色、 α -Sma 染色、コラーゲン I 染色にて、腫瘍形成は、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色にて行う。PKM1, PKM2, ACTA2, COLL1A2, CTGF, JAG1, HES1, HEY1, DLL4 の発現をリアルタイム PCR 法で解析する。NICD, HES1, p-AKT (Ser473), p-p38MAPK (Thr180/ Tyr182) の発現を、免疫組織染色法及びウエスタンブロッティング法によって評価する。Notch1 シグナル活性を評価するため 4x CSL リポーターアッセイを行った。

4. 研究成果

申請者は、肝線維化から自然に肝発癌する 49 週齢雄性の HCV FL-N/35/ PDGF-C double Tg mice に PKM2 の発現阻害する shRNA が搭載されたアデノ随伴ウイルス 8 型 (AAV8) 1 x 10¹⁰ Vg を尾静注した。AAV8-shRNA PKM2 を投与 3 週間後の肝組織の病理学的評価の結果、AAV8-mU6 投与群と比較して発癌率に差はなかったが、最大腫瘍径を有意に抑制した。

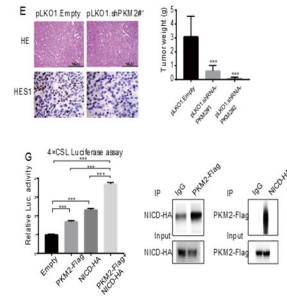
次に申請者は、PKM2 のバリエーションである PKM1 と PKM2 の両方ともに発現阻害する AAV8-shRNA total PKM#1 と#2 の 2 種類のウイルス粒子を作製し、上記と同様に 49 週齢雄性の HCV FL-N/35/ PDGF-C double Tg mice に尾静注した。その結果、興味深いことに PKM2 を単独に発現阻害するより PKM1 と PKM2 の両方を発現阻害することが肝発がんを劇的に抑制することが確認できた(図 1)。

図1 PKM1/2の発現共阻害は、PKM2のみ発現阻害するよりも強力に肝発がんを抑制する。



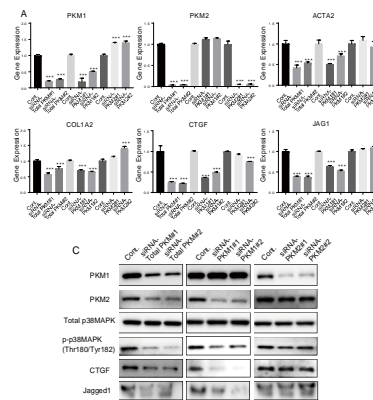
shRNA によって PKM2 の発現抑制したヒト初代肝細胞癌株は、腫瘍形成を有意に抑制し、Notch1 の下流である HES1 の発現が顕著に阻害されていた。Notch1 の活性化を示す 4 × CSL のレポーターアッセイを用いて、PKM2 と Notch1 の細胞内ドメインである NICD を同時に発現させたところ CSL の活性が単独に発現させたものより有意に亢進した。更に免疫沈降法(IP)から PKM2 と NICD の結合することも確認できた。NICD の阻害剤 L-685,458 をヒト初代肝細胞癌株に添加すると PKM2 の核内移行を抑制することが確認できた。つまり、PKM2 は、Notch1 の活性化分子 NICD と細胞質内で複合体を形成し、核移行を促す。そして、複合体は核内の CSL に結合することで HES1 の発現増加に働き、腫瘍形成を亢進させる機序を明らかにすることができた(図 2)。

図2 PKM2は、NICDと複合体を形成し核内移行することで CSLの活性化に働く



PKM1 は、ヒト肝星細胞株である Lx-2 に siRNA を用いて発現阻害したところ、肝線維化マーカーである COLL1A2, ACTA2, CTGF, JAG1 を有意に発現抑制した。siRNA-PKM1 は、特に p38MAPK シグナル活性を有意に抑制することが確認できた。PKM1 の発現阻害した Lx-2 を用いて発現網羅的マイクロアレイ解析を行ったが、なぜ PKM1 が肝星細胞の活性を抑制する詳細なメカニズムを解明することができなかった。これらの結果から PKM1 は p38MAPK/Ctgf によって肝線維化病態形成を促すことがわかった(図 3)。しかしながら、今回の研究で PKM1 による p38MAPK の活性化機序を明らかにすることができなかった。

図3 PKM1は、p38MAPK/CTGF経路を活性化させることで肝線維化を誘導する



上記の結果から、肝線維化を背景とした肝細胞癌の発癌を抑制するには PKM1 と PKM2 の両方を標的とした方が効率的である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chen H, Nio K, Yamashita T, Okada H, Li R, Suda T, Li Y, Doan Phuong Thi Bich, Seki A, Nakagawa H, Toyama T, Terashima T, Iida N, Shimakami T, Takatori H, Kawaguchi K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S	4. 巻 1878-0261
2. 論文標題 BMP9 ID1 signaling promotes EpCAM positive cancer stem cell properties in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 12963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.12963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田光, 山下太郎, 金子周一
2. 発表標題 Stem cell/Immune exhausted subclassマウス肝がんの特性解析
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 岡田光, 本多政夫, 金子周一
2. 発表標題 肝線維化に伴うリモデリングを正常化する新規治療法の開発
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 岡田光, 山下太郎, 金子周一
2. 発表標題 Stem cell/Immune exhausted subclassマウス肝がんの特性解析
3. 学会等名 第23回日本肝がん分子標的治療研究会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------