

2012/0008A

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

肝硬変・肝がん治療への応用を目的とした
 β -catenin依存性シグナルによる肝代謝機能制御機構の基礎的研究
(H22-政策創薬-一般-011)

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 関根 茂樹

平成 25 (2013) 年 5 月

別添 2

目 次

I. 総括研究報告

肝硬変・肝がん治療への応用を目的とした β -catenin 依存性シグナルによる 肝代謝機能制御機構の基礎的研究 -----	3
関根茂樹	

II. 分担研究報告

肝硬変・肝がん治療への応用を目的とした β -catenin 依存性シグナルによる 肝代謝機能制御機構の基礎的研究 -----	6
関根茂樹	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	該当無し
---------------------------	------

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	該当無し
-----------------------	------

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

肝硬変・肝がん治療への応用を目的とした

β -catenin依存性シグナルによる肝代謝機能制御機構の基礎的研究

(H22-政策創薬一般-011)

研究代表者 関根 茂樹 国立がん研究センター研究所

研究要旨

肝臓は多彩な代謝機能を担う臓器であり、その機能は多くのシグナル経路によって複雑に制御されている。これまでの主に肝細胞特異的 β -cateninノックアウトマウスを用いた研究から β -cateninシグナルによる肝代謝機能制御を解析し、この経路が肝予備能に影響を与えている事、そして外来異物を含む種々の物質の代謝を制御している事が明らかになってきた。 β -cateninは肝小葉内で領域特異的な遺伝子発現制御に重要な働きを果たしている事から、肝小葉構築の破壊に伴う肝硬変においては β -cateninシグナル異常が肝機能の低下に相乗的に関わっている可能性が考えられる。一方、このシグナル経路は肝発がんにおいても重要な役割を果たしている事が報告されている。約30%の肝細胞がんにおいて β -cateninをコードするCTNNB1遺伝子変異が見られ、その頻度は特にC型肝炎患者に発生する腫瘍で高率である事が知られている。このシグナル経路が代謝機能に与える役割を考慮すると、これらの腫瘍発生の背景となっているC型肝炎および、その発がん過程において β -cateninシグナルの異常が関わっている事、さらに β -catenin遺伝子変異陽性の腫瘍は特徴的な代謝特性を有している事が予想される。本研究では、肝臓における β -cateninシグナルの生理的機能と肝硬変、肝細胞がんにおける異常を明らかにし、このシグナル経路の制御を通じた肝機能の改善の可能性を探る。また、肝細胞がんにおける β -catenin遺伝子異常に伴う腫瘍特性を明らかにし、これを診断および個別改良への応用の可能性を検討する。

研究分担者

関根 茂樹 国立がん研究センター
研究所分子病理分野
ユニット長

域特異的な遺伝子発現制御に重要な働きを果たしており、この制御を通じて種々の代謝機能の制御に関わっている事が明らかにされつつある。さらに、30-40%の肝細胞がんでは β -cateninの変異の存在が知られている。本研究では肝細胞の代謝機能調節に関わる β -cateninの役割に注目し、その肝硬変、肝細胞がんにおける β -cateninシグナル異常の病態への関わりを明らかにし、このシグナル制御を通じた、肝硬変における肝代謝能の改善や肝細胞がんの診

A. 研究目的

ウイルス性肝炎の終末像である肝硬変や肝細胞がんの治療については未だ対症療法や外科切除等が治療の重要な部分を占めており、新たな治療標的の同定が望まれる。 β -cateninは肝小葉内で領

断・個別化治療への応用のための基礎的な知見を得る事を目標とする。

B. 研究方法

本研究では、 β -catenin ノックアウトマウスの解析により β -catenin の生体肝における生理的機能を明らかにし、これを基盤として、さらにマウスモデルを用いた機能解析を行うとともに、肝硬変および肝細胞がん臨床検体の解析によるヒト疾患での β -catenin シグナル異常の病態への関わりを検索する。

今年度はこれまでの研究から明らかになってきた β -catenin の下流遺伝子の肝細胞がんにおける転写誘導機構および機能的意義を明らかにする目的で、ヒト肝細胞がん培養細胞株を用いて、変異型 β -catenin の導入による下流遺伝子の誘導などについて検討を行った。さらに、生体内において変異 β -catenin およびその下流遺伝子の肝発がん過程における影響をより詳細に検討する目的で、トランスポゾンを用いたマウス肝細胞への遺伝子導入の試みを行った。

(倫理面への配慮)

肝がん臨床検体の解析に関しては国立がん研究センター倫理審査委員会の審査と承認を受けている。実施に当たっては「疫学研究に関する倫理指針」に基づいて行った。研究対象となる臨床検体については国立がん研究センター中央病院で得られた肝切除材料のうち、摘出標本のがん研究への利用に関して文書による患者の同意が得られている検体のみを用いた。解析にあたっては適切に匿名化を行った。

動物実験に関しては既に国立がんセンター動物実験倫理委員会の審査および認可を受けている。実施に当たっては「国立研究がんセンターにおける動物実験に関する指針」ならびに関連規定に従った。

C. 研究結果

平成23年度までの研究において、主に肝細胞特異的 β -catenin ノックアウトマウスの解析から β -catenin 依存性シグナルが肝臓におけるアミノ酸代謝・薬剤代謝や胆汁酸代謝制御に重要な役割を果たしている事が明らかになってきている。これらに関わる多くの下流因子の発現は生理的条件下では β -catenin

に強く依存しているが、この中で変異 β -catenin を有する肝細胞がんで高発現している分子は比較的少数である。このため、肝細胞がんに重要な β -catenin 下流遺伝子を同定する目的で、ヒト肝細胞がんマイクロアレイデータを用いて、変異 β -catenin を有する肝細胞がんにおいて有意に高発現し、かつ β -catenin ノックアウトマウスで発現の有意に低下している遺伝子を抽出した。

これらの遺伝子の機能を検索する目的で、ヒト肝細胞がん培養株を用いた検索を行った。変異型 β -catenin を発現する肝細胞がん細胞株は知られていないため、野生型 β -catenin を有する肝細胞がん細胞株に変異型 β -catenin の導入し、 β -catenin 下流遺伝子の発現を検討した。この結果、*AXIN2*をはじめとする canonical な β -catenin 下流遺伝子は誘導されたが、代謝関連遺伝子の誘導は全く認められなかった。

以上の結果から、*in vivo* モデルをもちいて、 β -catenin 下流遺伝子の機能解析を行う必要があると考え、*Sleeping beauty* トランスポゾンを用いたマウス肝細胞への安定的な遺伝子導入の系を導入することとした。複数のプロモーターを検討し、安定的な遺伝子発現が得られた *EF1a* プロモーターを用いたプラスミドベクターを構築した。マウスの尾静脈注入により肝細胞への遺伝子導入を行い、複数のがん関連遺伝子の発現によって発がんを行えることを確認した。

今後、 β -catenin を協同して肝発がんに関わる *HRAS* 等の遺伝子との共発現や、個別の β -catenin 下流遺伝子の導入を行い、これらの分子の肝発がんへの寄与について検討を進める。

D. 考察

β -catenin 依存性シグナルは多くの遺伝子の発現制御を通じて肝臓の多様な代謝機能を制御している。一方、肝細胞がんにおいては β -catenin は生理的条件下と比較して、より少数の遺伝子のみを誘導していると考えられた。しかしながら、*GLUL*、*AMACR*、*SLC01B3*をはじめとする複数の代謝関連下流遺伝子は *CTNMB1* 変異肝細胞がんにおいて高頻度に過剰発現しており、これら特定の下流遺伝子の関わる代謝経路は肝発がんにおいて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

肝細胞がんにおける β -cateninによる下流遺伝子制御機構の解析に用いる目的でヒト肝細胞がん培養細胞株を用いた遺伝子導入実験を行ったが、ヒト肝細胞がんの臨床検体で認められる特徴的な遺伝子発現は再現できず、*in vivo*モデルの必要性を示す所見と考えられた。

以上の所見に基づいてトランスポゾンを用いたマウス肝発がんモデルを導入し、安定的に肝発がんを誘導する事が可能となった。このモデルの利点として、ベクターの構築が簡便であるため多様な遺伝子の導入が可能であること、また、複数遺伝子の導入が可能であることが挙げられる。今後、複数の β -catenin下流遺伝子の導入やその他の腫瘍関連遺伝子の共導入などを通じて、 β -cateninの代謝制御が肝発がんに関わる機構についてさらに検索を進めていく。

E. 結論

肝細胞がん臨床例とノックアウトマウスの解析から、肝細胞がんにおいては代謝に関連する β -catenin下流遺伝子のうち、特定のもののみが高頻度に誘導されていると考えられる。

代謝に関連する β -catenin下流遺伝子の誘導は肝細胞がん培養株では再現が困難であり、*in vivo*モデルが有用と考えられた。このため、トランスポゾンを利用したマウス肝細胞への遺伝子導入による肝発がんの手法を導入した。今後、この手法を利用し、 β -cateninによる代謝制御の発がんにおける役割の解析を進める。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当無し

2. 学会発表
該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | 該当なし |
| 3. その他 | 該当なし |

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

肝硬変・肝がん治療への応用を目的とした

β -catenin依存性シグナルによる肝代謝機能制御機構の基礎的研究

(H22-政策創薬-一般-011)

分担研究者 関根 茂樹 国立がん研究センター研究所

研究要旨

肝臓は多彩な代謝機能を担う臓器であり、これらの機能は多くのシグナル経路によって複雑に制御されている。これまでの主に肝細胞特異的 β -catenin ノックアウトマウスを用いた研究から β -catenin シグナルによる肝代謝機能制御を解析し、この経路が肝予備能に影響を与えている事、そして外来異物を含む種々の物質の代謝を制御している事が明らかになってきた。 β -catenin は肝小葉内で領域特異的な遺伝子発現制御に重要な働きを果たしている事から、肝小葉構築の破壊に伴う肝硬変においては β -catenin シグナル異常が肝機能の低下に相乗的に関わっている可能性が考えられる。一方、このシグナル経路は肝発がんにおいても重要な役割を果たしている事が報告されている。約30%の肝細胞がんにおいて β -catenin をコードする *CTNNB1* 遺伝子変異が見られ、その頻度は特にC型肝炎患者に発生する腫瘍で高率である事が知られている。このシグナル経路が代謝機能に与える役割を考慮すると、これらの腫瘍発生の背景となっているC型肝炎および、その発がん過程において β -catenin シグナルの異常が関わっている事、さらに β -catenin 遺伝子変異陽性の腫瘍は特徴的な代謝特性を有している事が予想される。本研究では、肝臓における β -catenin シグナルの生理的機能と肝硬変、肝細胞がんにおける異常を明らかにし、このシグナル経路の制御を通じた肝機能の改善の可能性を探る。また、肝細胞がんにおける β -catenin 遺伝子異常に伴う腫瘍特性を明らかにし、これを診断および個別改良への応用の可能性を検討する。

A. 研究目的

ウイルス性肝炎の終末像である肝硬変や肝細胞がんの治療については未だ対症療法や外科切除等が治療の重要な部分を占めており、新たな薬物治療の開発が望まれる。 β -catenin は肝小葉内で領域特異的な遺伝子発現制御に重要な働きを果たしており、この制御を通じて種々の代謝機能の制御に関わっている事が明らかにされつつある。さらに、30-40%の肝細胞がんでは β -catenin の変異の存在が知られている。本研究では

肝細胞の代謝機能調節に関わる β -catenin の役割に注目し、その肝硬変、肝細胞がんにおける β -catenin シグナル異常の病態への関わりを明らかにし、このシグナル制御を通じた、肝硬変における肝代謝能の改善や肝細胞がんの診断・個別化治療への応用のための基礎を築く事を目標とする。

B. 研究方法

本研究では、 β -catenin ノックアウト

トマウスの解析により β -catenin の生体肝における生理的機能を明らかにし、これを基盤として、さらにマウスモデルを用いた機能解析を行うとともに、肝硬変および肝細胞がん臨床検体の解析によるヒト疾患での β -catenin シグナル異常の病態への関わりを検索する。

今年度はこれまでの研究から明らかになってきた β -catenin の下流遺伝子の肝細胞がんにおける転写誘導機構および機能的意義を明らかにする目的で、ヒト肝細胞がん養細胞株を用いて、変異型 β -catenin の導入による下流遺伝子の誘導などについて検討を行った。さらに、生体内において変異 β -catenin およびその下流遺伝子の肝発がん過程における影響をより詳細に検討する目的で、トランスポゾンを用いたマウス肝細胞への遺伝子導入の試みを行った。

(倫理面への配慮)

肝がん臨床検体の解析に関しては既に国立がんセンター倫理審査委員会の審査と承認を受けている。実施に当たっては「疫学研究に関する倫理指針」に基づいて行う。研究対象となる臨床検体については国立がんセンター中央病院での肝切除材料のうち、摘出標本のがん研究への利用に関して文書による患者の同意が得られている検体のみを用いる。解析にあたっては適切に匿名化を行い、患者情報の取り扱いに留意する。

動物実験に関しては既に国立がんセンター動物実験倫理委員会の審査を受け、認可を受けている。実施に当たっては「国立がんセンターにおける動物実験に関する指針」ならびに関連規定を遵守する。

C. 研究結果

平成23年度までの研究において、主に肝細胞特異的 β -catenin ノックアウトマウスの解析から β -catenin 依存性シグナルが肝臓におけるアミノ酸代謝・薬剤代謝や胆汁酸代謝制御に重要な役割を果たしている事が明らかになってきている。これらに関わる多くの下流因子の発現は生理的条件下では β -catenin に強く依存しているが、この中で変異 β -catenin を有する肝細胞がんで高発現している分子は比較的少数である。このため、肝細胞発がんにおいて重要な β -catenin 下流遺伝子を同定する目的で、ヒト肝細

胞がんマイクロアレイデータを用いて、変異 β -catenin を有する肝細胞がんにおいて有意に高発現し、かつ β -catenin ノックアウトマウスで発現の有意に低下している遺伝子を抽出した。

これらの遺伝子の機能を検索する目的で、ヒト肝細胞がん培養株を用いた検索を行った。変異型 β -catenin を発現する肝細胞がん細胞株は知られていないため、野生型 β -catenin を有する肝細胞がん細胞株に変異型 β -catenin の導入し、 β -catenin 下流遺伝子の発現を検討した。この結果、*AXIN2*をはじめとする canonical な β -catenin 下流遺伝子は誘導されたが、代謝関連遺伝子の誘導は全く認められなかった。

以上の結果から、*in vivo* モデルをもちいて、 β -catenin 下流遺伝子の機能解析を行う必要があると考え、*Sleeping beauty* トランスポゾンを用いたマウス肝細胞への安定的な遺伝子導入の系を導入することとした。複数のプロモーターを検討し、安定的な遺伝子発現が得られた *EF1a* プロモーターを用いたプラスミドベクターを構築した。マウスの尾静脈注入により肝細胞への遺伝子導入を行い、複数のがん関連遺伝子の発現によって発がんを行えることを確認した。

今後、 β -catenin を協同して肝発がんに関わる *HRAS* 等の遺伝子との共発現や、個別の β -catenin 下流遺伝子の導入を行い、これらの分子の肝発がんへの寄与について検討を進める。

D. 考察

β -catenin 依存性シグナルは多くの遺伝子の発現制御を通じて肝臓の多様な代謝機能を制御している。一方、肝細胞がんにおいては β -catenin は生理的条件下と比較して、より少数の遺伝子のみを誘導していると考えられた。しかしながら、*GLUL*、*AMACR*、*SLC01B3*をはじめとする複数の代謝関連下流遺伝子は *CTNBN1* 変異肝細胞がんにおいて高頻度に過剰発現しており、これら特定の下流遺伝子に関わる代謝経路は肝発がんにおいて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

肝細胞がんにおける β -catenin による下流遺伝子制御機構の解析に用いる目的でヒト肝細胞がん培養細胞株を用いた遺伝子導入実験を行ったが、ヒト肝細胞がんの臨床検体で認められる特徴的

な遺伝子発現は再現できず、*in vivo*モデルの必要性を示す所見と考えられた。

以上の所見に基づいてトランスポゾンを用いたマウス肝発がんモデルを導入し、安定的に肝発がんを誘導する事が可能となった。このモデルの利点として、ベクターの構築が簡便であるため多様な遺伝子の導入が可能であること、また、複数遺伝子の導入が可能であることが挙げられる。今後、複数の β -catenin下流遺伝子の導入やその他の腫瘍関連遺伝子の共導入などを通じて、 β -cateninの代謝制御が肝発がんに関わる機構についてさらに検索を進めていく。

E. 結論

肝細胞がん臨床例とノックアウトマウスの解析から、肝細胞がんにおいては代謝に関連する β -catenin下流遺伝子のうち、特定のもののみが高頻度に誘導されていると考えられる。

代謝に関連する β -catenin下流遺伝子の誘導は肝細胞がん培養株では再現が困難であり、*in vivo*モデルが有用と考

えられた。このため、トランスポゾンを利用したマウス肝細胞への遺伝子導入による肝発がんの手法を導入した。今後、この手法を利用し、 β -cateninによる代謝制御の発がんにおける役割の解析を進める。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当無し

2. 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

4. 特許取得 該当なし

5. 実用新案登録 該当なし

6. その他 該当なし

