

学位論文の要旨

学位の種類	博士	名前	山本 雅大
学位論文題目			
Neoplastic Hepatocyte Growth Associated with Cyclin D1 Redistribution from the Cytoplasm to the Nucleus in Mouse Hepatocarcinogenesis (マウス前癌肝細胞における cyclin D1 の細胞質から核への移行と増殖の活性化)			
共著者			
玉川 進, 吉江 真澄, 柳沼 裕二, 小川 勝洋			
未公表			
研究目的			
<p>肝細胞癌ではしばしばcyclin D1が過剰発現しており、予後不良因子の一つとされている。また、cyclin D1を肝細胞で過剰発現させたトランスジェニックマウスでは肝細胞癌が高率に発生することが報告されており、cyclin D1は肝発癌過程で重要な役割を果たすと考えられている。しかし、このようなcyclin D1の過剰発現が肝発癌過程のどの段階から起こっているかや肝発癌における役割については十分解っていない。一方、肝発癌過程では肝癌が発生するはるかに前から前癌肝細胞が生じ、これらが増殖してコロニーを形成する。肝癌細胞は、前癌肝細胞コロニー内に新たな癌連遺伝子の変異を持つ細胞が生じ、そのような変異が多段階的に集積することにより、誕生すると考えられている。本研究では、マウス肝化学発癌モデルを用いて肝発癌初期過程におけるcyclin D1の発現とその役割について検討した。</p>			
材料・方法			
<p><u>材料</u>：2週齢の雄性B6C3F1マウスにdiethylnitrosamine (DEN) (5 μg/g体重)を腹腔内投与して肝腫瘍を誘発し、5-7ヶ月後に肝腫瘍を摘出して液体窒素にて凍結して-80 $^{\circ}$Cにて保存した。また、一群のDEN処理マウスについては2/3部分肝切除を行い、屠殺1時間前にBrdU (50 μg/g体重)を腹腔内投与し、術後7日目まで経時的に屠殺して肝組織を中性緩衝ホルマリン液にて固定した。さらに、<i>in vitro</i>の実験にはマウス肝腫瘍より樹立した細胞株を用いた。</p> <p><u>細胞培養</u>：肝腫瘍細胞株をinsulin, EGFおよび10% FBSを含むWilliams' E medium (GF/FBS+)で培養した後、増殖因子を含まない無血清medium (GF/FBS-)で24時間培養し、さらに48時間GF/FBS+また</p>			

はGF/FBS-で培養した。また、シグナル伝達経路を阻害するためにGF/FBS+にて培養し、その培養液中にphosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) の阻害剤であるLy294002 (40 μ M), MAPK/ERK kinase (MEK)の阻害剤である PD98059 (80 μ M)およびmammalian target of rapamycin (mTOR)の阻害剤であるrapamycin (100 nM)を添加した。その他、phosphatase of tensin homolog (PTEN)を抑制するためにPTENに対するsiRNA (40 pmol/mL)をlipofectamine 2000を用いて導入した。

Western Blotting法: 正常肝組織、肝腫瘍組織または肝腫瘍細胞をNP-40 lysis buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)にて融解し、12% SDSゲルにて50 μ g蛋白/レーンで電気泳動した。泳動蛋白をニトロセルロース膜に転写後、5%スキムミルク/TBSTを用いて室温1時間ブロッキングし、1次抗体で1.5時間、2次抗体で1時間処理後、ECL plusキットを用いて特異バンドを検出した。

免疫沈降: 培養細胞をlysis bufferで融解し、500 μ gのlysateを50 μ Lのprotein A Sepharoseビーズでpre-washし、抗体を加え4 $^{\circ}$ C 2時間、protein A Sepharose ビーズを加えて4 $^{\circ}$ C 1時間incubateした。次にこのサンプルを1x sample bufferで融解し、遠心分離でビーズをのぞき上清を分離した。

免疫染色: ホルマリン固定肝組織からパラフィン切片を作製し、0.01Mクエン酸バッファーで10分間microwave ovenで加熱後、3%過酸化水素/PBSで30分、ブロッキング10分、1次抗体室温1時間、2次抗体室温30分処理し、DAB基質キットを用い発色した。肝腫瘍細胞はcollagen-coated cover glass上で培養し、-20 $^{\circ}$ C 100%メタノールで10分固定後、5% BSA/PBSで30分ブロッキング、1次抗体室温1時間、蛍光標識2次抗体室温30分処理した後、蛍光顕微鏡で観察した。

MTT法: 肝腫瘍細胞を24 well plateで培養し、mediumの1/10量の50 mg/mL 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)を加えて1時間培養後、等量の0.1 N HCl/isopropanolで溶解し、570 nmの吸光度を測定した。

フローサイトメトリー: 培養細胞をEDTA-trypsin液を用いて回収し、70%エタノールで固定、1% BSA/PBSで3回洗浄後、40 μ g/mL RNase Aおよび50 μ g/mL のpropidium iodide (PI)を含む1% BSA/PBS液にてincubateし、細胞当たりのPI量をフローサイトメーターで計測した。細胞周期は Modifitソフトウェアを用いて解析した。

細胞分画: 肝腫瘍細胞を低浸透圧バッファー(10 mM HEPES, 10 mM KCL, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT)で15分処理後、最終濃度0.625%になるようにNP-40を加えて細胞質を破砕、遠心し、上清を細胞質分画とした。さらに、ペレットに高浸透圧バッファー(20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT)を加えて30分処理後、遠心し上清を核分画とした。

cdk4, cdk2 kinase活性: cdk4またはcdk2抗体による免疫沈降物を10 μ Ci [γ - 32 P]ATPおよびpRb (4 μ g)またはhistone H1(2 μ g)とともに室温40分incubation後、SDS-PAGEで電気泳動し、オートラジオグラフィーを行いpRb又はhistone H1のリン酸化の程度を判定した。

成 績

マウス肝発癌初期病変における細胞周期蛋白の発現：肝腫瘍と正常肝組織で細胞周期関連蛋白の発現を Western blotting で比較したところ、cyclin D1 と cyclin E は腫瘍特異的に発現しており、cdk2, cdk4, p27 は肝腫瘍と正常肝組織でともに発現していたが、腫瘍でより強く発現していた。免疫組織化学では cyclin D1 は主に腫瘍細胞の細胞質に局在しており、cyclin E, p27 は核に発現していた。しかし、腫瘍細胞は G1-S cyclin を高発現しているにも関わらず、S 期細胞を示す BrdU の取り込みは約 5%と低かった。

増殖に伴う cyclin D1 の細胞質から核への移行：肝腫瘍を持つマウスに 2/3 部分肝切除を行い肝細胞に対する増殖刺激を加えたところ、腫瘍細胞の BrdU 標識率は 48 時間でピークに達し、正常肝細胞に比べて高い値を示した。また、腫瘍細胞では増殖に伴って細胞質の cyclin D1 が核内に移行し、再生終了に伴って再び細胞質に局在した。肝腫瘍細胞株においても、同様に GF/FBS-では細胞はほとんど増殖せず cyclin D1 は細胞質に局在したが、GF/FBS+で培養すると 48 時間目で約 3.6 倍に増加し、cyclin D1 の局在は細胞質から核に変化した。また、cyclin D1 と Ki67 と同時に蛍光免疫染色したところ、Ki67 は cyclin D1 を核に発現している細胞にのみ陽性で、細胞質に発現している細胞では陰性であった。また、cyclin D1 のパートナーである cdk4 は GF/FBS-でも GF/FBS+でも主に細胞質に局在し、核では少量であったが、細胞質と核分画の cdk4 に分けて cdk4 キナーゼ活性を測定すると、核の cdk4 のみに強いキナーゼ活性が観察された。

PI3 kinase と cyclin D1 核内移行の関連：肝腫瘍細胞における cyclin D1 の核内移行および増殖の活性化にどのようなシグナル伝達経路が関与するかを調べるために、PI3K, MAPK および mTOR 経路を阻害し、cyclin D1 の局在と発現量および細胞増殖への影響を検討した。その結果、PI3K を阻害すると cyclin D1 は細胞質に止まっていたが、MAPK, mTOR の抑制では cyclin D1 の核移行の阻害は軽度であった。一方、cyclin D1 の発現量は PI3K, mTOR 抑制では無処理の約半分に低下したのに対し、MAPK 経路の阻害では約 1/4 と顕著に低下した。さらに、細胞増殖への影響は PI3K 抑制の影響が最も強く、MAPK, mTOR の抑制ではより軽度であった。したがって、PI3K 経路は cyclin D1 の核内移行に最も深く関わっており、その抑制により細胞増殖が強く抑制されることが明らかになった。一方、siRNA を用いて PTEN を抑制したところ、MAPK 経路は活性化せずに PI3K のみが活性化されたが、cyclin D1 の核移行への影響は見られなかった。

増殖細胞と非増殖細胞における cyclin D1 蛋白複合体の違い：cyclin D1 が細胞質に局在する GF/FBS-と核に局在する GF/FBS+の条件下で cyclin D1 に結合しているタンパク質を免疫沈降-Western Blotting 法にて比較したところ、p21 は核の cyclin D1 特異的に結合していたのに対し、HSC70 と SSeCKs は細胞質の cyclin D1 に結合していた。一方、cdk4, calmodulin, p27 については細胞質、核の両方の cyclin D1 に結合していた。

考 案

本研究では肝発癌過程では cyclin D1 が cyclin E, cdk2, cdk4, p27 とともに肝癌細胞の芽となる前癌肝細胞の段階から高発現しており、初期段階から発癌に深く関わっていることが示唆された。また、腫瘍細胞では cyclin D1 は細胞質に局在しており、増殖刺激を加えると核に移行し、それに伴って増殖が活発化することが明らかになった。細胞株を用いた実験でも、cyclin D1 は増殖が抑制されている GF/FBS-では細胞質に局在し、増殖が活性化する GF/FBS+では核内に局在した。さらに、cyclin D1 が核に局在している細胞では増殖細胞を示す Ki67 が陽性で、cyclin D1 のパートナーである cdk4 が活性化し、cyclin D1 が細胞質に発現している細胞では Ki67 陰性で、cdk4 活性が低いことから cyclin D1 の局在は細胞増殖に密接に関わっていることが裏付けられた。以上の結果は、cdk4/cyclin D1 複合体は核内で cdk7/cyclin H (CAK)により磷酸化を受けて活性化され、pRb をリン酸化して pRb に結合している E2F を活性化し、G1-S 期を進行させるはたらきがあることと合致し、cyclin D1 の核内局在が細胞の増殖に重要であることが示唆された。これまで前癌肝細胞は正常肝細胞に比べて高い増殖能を備えていることが知られていたが、その理由は十分解っていなかった。本研究の結果から、正常肝細胞では cyclin D1 の発現には増殖刺激が持続的に働くことが必要であるのに対し、前癌肝細胞では cyclin D1 を恒常的に発現しており、その局在を核内にかえることにより容易に増殖活性化できることが関係していると考えられた。

PI3K, MAPK および mTOR の阻害剤を用いた実験では、PI3K 経路が cyclin D1 の核内移行に最も深く関わっており、また、MAPK はおもに cyclin D1 の発現量の調節に関わっていることが明らかになった。細胞増殖への影響は MAPK の抑制よりも PI3K の抑制で強く見られることから、腫瘍細胞の増殖には cyclin D1 の発現量よりも核内局在が重要であることが示唆された。また、PTEN knock-down 実験では、MAPK 経路の活性化なしに PI3K 経路が活性化したが、cyclin D1 の局在に変化は見られなかったことから、cyclin D1 の核内移行には PI3K の活性化は重要であるが、それだけでは不十分で、PI3K に加え他のシグナル伝達経路の活性化も必要であることが示唆された。

増殖が停止している GF/FBS-細胞の細胞質に局在する cyclin D1 には Hsc70 と SSeCKS が結合しており、活発に増殖している GF/FBS+細胞の核に局在する cyclin D1 には p21 が特異的に結合していた。この中でも SSeCKS は protein kinase A, C の scaffold 蛋白としてはたらき、細胞骨格のアクチンと結合するとともに cyclin D1 に結合してそれを細胞質にとどめるはたらきがある事が報告されている。また、p21 は核移行シグナルを持ち、核移行シグナルを持たない cyclin D1-cdk4 複合体と結合して核内へ移動させると考えられている。このような cyclin D1 複合体の違いが cyclin D1 の細胞内局在に深く関わっている可能性が考えられた。

結 語

- 1) 肝発癌過程では初期から前癌肝細胞は細胞質に cyclin D1 を高発現しており、それを核に移行させることにより容易に増殖できる。
- 2) 肝腫瘍細胞での cyclin D1 の核内移行には PI3K 経路の活性化が重要であるが、PI3K 経路の活性化のみでは不十分である。
- 3) cyclin D1 は細胞質内と核内では異なる複合体を形成しており、細胞内局在と関係していると考えられる。

引 用 文 献

1. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000;60(14):3689-3695.
2. Radu A, Neubauer V, Akagi T, Hanafusa H, Georgescu MM. PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 2003;23(17):6139-6149.
3. Lin X, Gelman IH. Calmodulin and cyclin D1 anchoring sites on the Src-suppressed C kinase substrate, SSeCKS. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290(5):1368-1375.

参 考 文 献

1. Katsuhiko Ogawa, Masumi Yoshie, Susumu Tamakawa, Yoshihiko Tokusashi, Masahiro Yamamoto, Yuji Yaginuma. Possible role of the microenvironment created by neoplastic hepatocytes during hepatic carcinogenesis. *Appl Genom and Proteom* 2003;2(3):135-143
2. 小川勝洋, 柳沼裕二, 吉江真澄, 玉川進, 山本雅大. 肝癌 病理と臨床 2004;22:141-146.
3. Yoshihiko Tokusashi, Keiko Asai, Susumu Tamakawa, Masahiro Yamamoto, Masumi Yoshie, Yuji Yaginuma, Naoyuki Miyokawa, Takanori Aoki, Shinichi Kino, Shinichi Kasai and Katsuhiko Ogawa. Expression of NGF in hepatocellular carcinoma cells with its receptors in non-tumor cell components. *Int J Cancer* 2005;114:39-45
4. Kenjiro Kamezaki, Kazuya Shimoda, Akihiko Numata, Takashi Haro, Haruko Kakumitsu, Masumi Yoshie, Masahiro Yamamoto, Kiyoshi Takeda, Tadashi Matsuda, Shizuo Akira, Katsuhiko Ogawa, Mine Harada. Roles of Stat3 and ERK in G-CSF signaling. *Stem Cells* 2005;23:252-263
5. Emi Imamura, Masahiro Yamamoto, Masaaki Miyakoshi, Satoshi Honmo, Atsuko Ozaki, Masumi Yoshie, Susumu Tamakawa, Yuji Yaginuma, Shinichi Kasai, Katsuhiko Ogawa. Different growth capacity between infant and adult mouse hepatocytes *in vitro* correlates to the cyclin D1 level without relation to oxidative DNA damage. *Liver Int* 2005;25:1036-1043

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	山本 雅大
<p>審査委員長 谷口隆信 ㊞</p> <p>審査委員 小川勝洋 ㊞</p> <p>審査委員 奥村利勝 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Neoplastic Hepatocyte Growth Associated with Cyclin D1 Redistribution from the Cytoplasm to the Nucleus in Mouse Hepatocarcinogenesis</p> <p>(マウス前癌肝細胞における cyclin D1 の細胞質から核への移行と増殖の活性化)</p> <p style="text-align: center;">共 著 者</p> <p style="text-align: center;">玉川 進, 吉江 真澄, 柳沼 裕二, 小川 勝洋</p>			
<p>cyclin D1 の過剰発現は肝癌でしばしば観察され、予後不良因子の一つとされている。しかし、cyclin D1 の過剰発現が発癌過程のどの段階から生じ、どのように肝発癌に関わっているかは十分解明されていない。一方、肝発癌過程においては、まず前癌肝細胞が生じてコロニーを形成し、コロニー内に新たな癌関連遺伝子の変異を持つ細胞が生じるという、変異と選択の多段階的なモデルが考えられている。本研究では、マウスにおける肝化学発癌モデルを用い、肝発癌初期過程における cyclin D1 の発現とその役割について検討している。</p> <p>diethylnitrosamine はマウスにおいて、2週齢時単回投与にて肝癌を発生させることが知られており、ここでは前癌状態と考えられる腺腫形成が認められる、投与半年後のマウスを用いて検討を行った</p>			

先ず、肝腺腫と正常肝組織で細胞周期関連タンパク質の発現を比較したところ、cyclin D1 と cyclin E は腺腫特異的に発現しており、cdk2, cdk4, p27 は肝腺腫と正常肝組織でともに発現していた。免疫組織的には cyclin D1 は主に腺腫細胞の細胞質に局在しており、cyclin E は核に発現していた。しかし、この状態での腺腫細胞では S 期細胞を示す BrdU の取り込みは約 5% と低かった。

次いで肝細胞に対する増殖刺激を加えるために、腺腫を持つマウスに 2/3 部分肝切除を行った所、腺腫細胞の BrdU 標識率は 48 時間で 30 % とピークに達し、正常肝細胞に比べて高値を示した。また、腺腫細胞では増殖刺激に伴って細胞質の cyclin D1 が核内に移行し、再生終了に伴って再び細胞質に局在するという現象が観察された。この現象は同様な処理を行って得られた肝癌細胞株においても確認され、無血清培地では細胞はほとんど増殖せず cyclin D1 は細胞質に局在したが、血清を加えて増殖を刺激すると cyclin D1 の局在は細胞質から核に変化した。また、cyclin D1 のパートナーである cdk4 キナーゼの活性は、血清添加に伴って核において強い活性上昇が観察された。

更に、肝癌細胞株において、増殖刺激から cyclin D1 の発現増強および核内移行に至る経路を、種々の阻害剤を用い PI3K, MAPK および mTOR 経路について検討した。その結果、PI3K 経路が cyclin D1 の核内移行に最も深く関わっており、その抑制により細胞増殖が強く抑制されることが明らかになった。

これまで正常肝細胞に比べて前癌肝細胞が高い増殖能を備えている理由は十分解っていなかったが、本研究の結果から、正常肝細胞では cyclin D1 の発現には増殖刺激が持続的に作用することが必要であるのに対し、前癌肝細胞では cyclin D1 が恒常的に発現し、それが核内に移行することにより容易に増殖を開始できることが明らかになり、本研究は肝癌発癌の機序を理解する上で価値あるものと考えられる。

申請者に対して査問を行い、当該分野に関する申請者の知識／経験／見識は課程博士に相応しいものであると判断しました。以上、論文／査問による審査の結果、博士に値すると判定したことを御報告致します。

平成18年2月10日