

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	陳 錫
<p>学位論文題目</p> <p>Differential reactivation of fetal/neonatal genes in mouse liver tumors induced in cirrhotic and noncirrhotic conditions</p> <p>(マウス肝腫瘍における胎児・新生児期遺伝子の再活性化: 肝硬変・非肝硬変モデルの比較検討)</p> <p>共著者名</p> <p>山本雅大, 藤井清永, 永瀆康晴, 大塩貴子, 辛氷, 岡田陽子, 古川博之, 西川祐司</p> <p style="text-align: right;">Cancer Science 2015 年 印刷中</p> <p>研究目的</p> <p>肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) は慢性肝炎や肝硬変を背景病変として発生することが多いが、ほぼ正常の肝に出現することも稀ではない。背景肝の状態により HCC の発生メカニズムが異なる可能性があるが、詳細は不明である。今回我々は、マウス肝腫瘍の肝硬変モデルおよび非肝硬変モデルを比較し、遺伝子発現パターンの違いが存在するかどうかを検討した。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 使用動物および肝腫瘍モデル C3H/HeNcr1Cr1j (C3H) × C57BL/6J (C57) F1 または C57 雄性マウス(8-10 週齢)に対し、四塩化炭素 (CCl₄) 投与(オリーブオイルに溶解, 1 mL/kg, 週 3 回, s.c., 24 週)または thioacetamide (TAA) 投与(0.03%水溶液, 飲水, 30 週間)を行い、肝硬変を基盤とする肝腫瘍を形成させた。また、C3H × C57 F1 雄性新生仔マウス(生後 2 週間)に対し、diethylnitrosamine (DEN) を 1 回投与 (5 mg/kg, i.p.) し、肝硬変を伴わない肝腫瘍を誘発させ、生後 46 週で解析した。さらに、C3H 雄性マウスの正常肝に生後 13-15 か月で自然発生する肝腫瘍も解析した。</p> <p>2. cDNA microarray 解析 コントロール肝(オリーブオイル投与), CCl₄ 投与による肝硬変(非腫瘍部), CCl₄ で誘導された肝腫瘍, DEN で誘導された肝腫瘍から, RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い, total RNA を抽出した。これらのサンプルから合成した cDNA を one-color microarrays (3D-Gene Microarray, 東レ)により解析し、遺伝子の発現プロファイルを比較検討した。</p>			

3. mRNA 発現定量解析

上記 cDNA microarray 解析によるスクリーニングで肝腫瘍特異的に発現することが示唆された遺伝子それぞれについて、多数の total RNA サンプルを用いて、SYBR Green 法による定量 RT-PCR を行い、mRNA 発現変化を確認した。内部標準としてハウスキーピング遺伝子である *Gapdh* の発現を用いた。

4. 病理組織学的・免疫組織化学的解析

肝組織や肝腫瘍をホルマリンで固定し、パラフィン切片を作製した。mRNA 発現解析から明らかになった腫瘍関連遺伝子 (*Igf2*, *Tff3*, *Afp*) の産物や増殖マーカー (Ki-67) の発現を特異抗体を用いて免疫組織化学で検討した。また、*H19* mRNA のシグナルを QuantiGene ViewRNA Probe を用いた *in situ* hybridization 法で検出した。

5. ヒト肝腫瘍組織の検討

2007-2015 年に旭川医科大学病院で HCC と診断された 33 症例の肝切除検体のパラフィンブロックを使用し、IGF2, TFF3, AFP の免疫組織化学を行った(旭川医科大学倫理委員会承認番号 14004 号)。33 例中 24 例には背景肝組織に種々の程度に線維化および炎症が認められたが、残り 9 例では肝組織に明らかな異常はみられなかった。なお、海綿状血管腫で切除された非腫瘍部肝組織を対照として使用した。

成 績

1. 肝腫瘍で発現する遺伝子のスクリーニング

cDNA microarray による解析の結果、コントロール肝 (control), CCl₄ で誘導した肝硬変 (CCl₄-NT), CCl₄ で誘導した肝腫瘍 (CCl₄-T), DEN で誘導した肝腫瘍 (DEN-T) のそれぞれにおいて特徴的に発現する 1,024 個の遺伝子が抽出された。これらの発現パターンは 4 つのクラスターに分類されたが、CCl₄-T で発現が亢進するクラスターおよび DEN-T で発現が亢進するクラスターに注目し、それぞれで発現レベルの高い 10 種類の遺伝子についてさらに検討を加えた。

2. 定量 RT-PCR による mRNA 発現パターンの確認および *in situ* での発現検討

多数の検体を用いた定量 RT-PCR の結果、*H19*, *Igf2*, *Cbr3*, *Krt20* の mRNA は、control では発現がほとんど認められないが、CCl₄-T において DEN-T に比べ 4 倍以上高いレベルで発現していた。一方、*Tff3*, *Akr1c18*, *Gpc3*, *Afp*, *Abcd2* の mRNA 発現は肝腫瘍で特異的に上昇するが、その発現レベルは DEN-T において CCl₄-T に比べ 4 倍以上高かった。*Ly6d*, *Slpi*, *Spink3*, *Scd2*, *Cpe* の mRNA 発現は CCl₄-T と DEN-T で同程度に認められた。

また、IGF2, *H19* mRNA, TFF3, AFP の腫瘍特異的発現を切片上で確認した。

3. 肝腫瘍関連遺伝子の mRNA 発現レベルと腫瘍細胞増殖性についての検討

CCl₄-T や DEN-T のそれぞれについて、腫瘍関連遺伝子の mRNA 発現レベルと腫瘍細胞の Ki-67 陽性率との関連を調べた。その結果、CCl₄-T において *Cbr3*, *Tff3* の mRNA 発現と Ki-67 陽性率との間に弱い正の相関があったが、他の遺伝子に関しては発現レベルと細胞の増殖性との間に関連が見出されなかった。

4. 肝腫瘍関連遺伝子の胎仔・新生仔マウス肝組織での発現

腫瘍関連遺伝子について、胎仔・新生仔肝組織での mRNA 発現を定量 RT-PCR 法で調べたところ、*Cbr3* と *Cpe* を除くすべての遺伝子は胎児・新生児期に強く発現していることが明らかになった。

5. 肝腫瘍関連遺伝子の他の肝腫瘍モデルでの発現

CCl₄-T, DEN-T で遺伝子の発現パターンが異なることが明らかになり、肝硬変の有無により肝腫瘍の遺伝子発現が影響を受けることが示唆された。他の肝腫瘍モデルで同様の傾向がみられるかを検証するため、TAA による肝硬変を伴う腫瘍 (TAA-T) と正常肝に自然発生する腫瘍 (Spont-T) での遺伝子発現を検討した。その結果、TAA-T では CCl₄-T と同様に *Igf2*, *Krt20* の mRNA が有意に増加し、*H19* mRNA 発現にも上昇傾向が認められた。一方、DEN-T で増加する *Akr1c18*, *Gpc3*, *Afp* の発現は変化しなかった。Spont-T では、CCl₄-T で発現変化する遺伝子には影響がみられなかったが、DEN-T に関連する遺伝子 *Tff3*, *Akr1c18*, *Afp*, *Abcd2* の発現が有意に増加した。CCl₄-T と DEN-T で共通して発現が亢進する遺伝子はいずれも TAA-T で発現が増加した。また、Spont-T でも *Spink3*, *Scd2*, *Cpe* 以外の遺伝子の発現増加が認められた。

6. 肝硬変を伴う肝腫瘍モデルと肝硬変を伴わない肝腫瘍モデルにおける遺伝子発現の二次元階層クラスタリング

4 つの肝腫瘍モデル (CCl₄, DEN, TAA, 自然発生) で、上記の肝腫瘍関連遺伝子および後述する *Igf2bp3* を加えた 15 個の遺伝子の mRNA 発現プロファイルを用いて、二次元階層のクラスタ解析を行った。その結果、正常対照肝、硬変肝、肝硬変を伴う肝腫瘍、肝硬変を伴わない肝腫瘍が別々のクラスタに分類された。また、肝硬変を伴う肝腫瘍には *H19*, *Igf2*, *Igf2bp3* が、肝硬変を伴わない肝腫瘍には *Tff3*, *Akr1c18*, *Abcd2*, *Gpc3* が、両方に共通して *Scd2*, *Slpi* や *Cpe*, *Ly6d* の転写物クラスタが認められた。

7. 肝硬変を伴う肝腫瘍における *Igf2* と *Igf2* 関連遺伝子の特異的発現亢進

H19 と *Igf2* は隣接した遺伝子で、共通のエンハンサーを持ち、互いに密接な転写調節が行われていることが知られている (1)。実際、これらの発現は肝硬変を伴う肝腫瘍の約半数で亢進しており、両者の mRNA 発現の間に強い正の相関が認められた。*Igf2bp3* の遺伝子産物は *Igf2* や *H19* の転写物と機能的に関連しているとされているが、*Igf2bp3* mRNA 発現レベルは *Igf2* 低発現腫瘍 (*Igf2/Gapdh* <0.01) に比べ、*Igf2* 高発現腫瘍 (*Igf2/Gapdh* ≥0.01) で有意に高かった。

8. ヒト HCC での IGF2, TFF3, AFP の発現

以上の結果は肝硬変を伴う肝腫瘍で IGF2 経路が活性化される可能性を示唆している。そこで、ヒト HCC で IGF2, TFF3, AFP の蛋白発現を免疫組織化学により調べ、背景肝の線維化の有無による陽性率の違いを検討した。IGF2 陽性像は線維化を伴う HCC の 54.2%、線維化を伴わない HCC の 11.1% に陽性で、これらの間には有意差が認められた ($p = 0.0466$, Fisher's exact test)。一方、TFF3 や AFP の陽性率は線維化の有無と関連しなかった。

考 案

我々は本研究を通し、マウス肝腫瘍で特異的に発現が増加する遺伝子を見出し、これらの遺伝子発現パターンが肝硬変モデルおよび非肝硬変モデルの間で異なることを明らかにした。興味深いことに、これらの遺伝子の大部分は胎児・新生児期の肝において高レベルで発現していた。発現亢進する時期はマウス胎仔 E16.5 から生後 3 日以内であり、すでに肝細胞の成熟が進行している肝発生の後期に相当していた。これは、肝腫瘍における胎児・新生児期遺伝子の発現が、肝腫瘍細胞の幼若肝芽細胞への脱分化を反映しているものではないことを示唆している。このような遺伝子群が肝腫瘍で再活性化されることの意義は不明であるが、形質転換した腫瘍細胞が、肝細胞の増殖が最も盛んに起こる胎児・新生児期での細胞機構を利用していることが推察される。

TFF3 はさまざまな実験的マウス肝腫瘍やヒトの HCC で発現が亢進することが報告されている (2-4). TFF3 は腸管粘膜修復に重要なポリペプチドとして知られている (5). 肝臓での生理機能や肝発癌における役割は解明されていないが、腫瘍での発現レベルがきわめて高く、*Tff3* mRNA やペプチドは肝腫瘍の特異的マーカーになる可能性がある。

我々の結果は、*Igf2* および *Igf2* 関連遺伝子である *H19* や *Igf2bp3* の発現が肝硬変を伴う肝腫瘍で特異的に亢進することを示している。*Igf2* と *H19* は相反的な刷り込みを受け、*Igf2* 遺伝子は父由来アリル、*H19* 遺伝子は母由来アリルのみから転写されている。CCl₄-T や TAA-T で *H19* と *Igf2* 遺伝子の発現が高度に相関することは、両者の転写調節に共通のメカニズムが存在することが示唆されるが (1), 詳細に関しては今後の検討が必要である。

肝硬変もしくは慢性肝疾患に HCC が発生するメカニズムについては不明の点が多いが、epidermal growth factor (EGF) receptor や c-Met シグナリングを介した持続的な肝細胞の再生性増殖が背景に存在する可能性がある。HBx や SV40 T Ag のトランスジェニックマウス (3, 6) では肝傷害を伴わない肝細胞の持続的増殖が起こり、発生した肝腫瘍に *Igf2* mRNA が発現することが報告されている。さらに、分泌型 EGF を過剰産生するマウス肝腫瘍モデルにおいて、腫瘍発生の過程で EGF 依存状態から IGF2 依存状態への移行が起こることが報告されている (7)。




結 論

マウス肝腫瘍では胎児・新生時期に高度に発現する遺伝子が再活性化され、これらの発現パターンは背景肝における肝硬変や線維化の有無により異なることが明らかになった。特に、肝硬変に伴う肝腫瘍発生過程において IGF2 関連経路の活性化が重要な意義を持っている可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. Leighton PA et al. An enhancer deletion affects both H19 and *Igf2* expression. *Genes Dev* 1995; 9: 2079-2089.
2. Okada H et al. Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2005; 26: 369-377.
3. Sun Q et al. Identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma through pre-cancerous expression analysis in an HBx transgenic mouse. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 1532-1538.
4. Borlak J et al. Epidermal growth factor-induced hepatocellular carcinoma: gene expression profiles in precursor lesions, early stage and solitary tumours. *Oncogene* 2005; 24: 1809-1819.
5. Hoffmann W. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2932-2938.
6. Sáenz Robles MT and Pipas JM. T antigen transgenic mouse models. *Semin Cancer Biol* 2009; 19: 229-235.
7. Stegmaier P et al. Advanced computational biology methods identify molecular switches for malignancy in an EGF mouse model of liver cancer. *PLoS One* 2011; 71:41-56.

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	陳 錫
<p>審査委員長 奥村利勝 </p> <p>審査委員 大崎能伸 </p> <p>審査委員 西川祐司 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Differential reactivation of fetal/neonatal genes in mouse liver tumors induced in cirrhotic and noncirrhotic conditions (マウス肝腫瘍における胎児・新生児期遺伝子の再活性化：肝硬変・非肝硬変モデルの比較検討)</p>			

肝細胞癌（HCC）は肝硬変を背景に発生することが多いが、ほぼ正常の肝に出現することも稀ではない。背景肝の状態により HCC の発生メカニズムが異なる可能性がある。申請者は、マウス肝硬変および非肝硬変モデルにおける肝腫瘍を比較し、遺伝子発現パターンの違いを検討した。加えて HCC33 症例のヒト肝切除検体を用いた解析も行った。得られた結果は以下の通りである。まず cDNA microarray により腫瘍で高発現する 10 個の遺伝子を抽出した。*H19*, *Igf2*, などは CCl₄ による肝硬変を伴う腫瘍において高発現し、*Tff3* などの mRNA 発現は DEN による肝硬変を伴わない腫瘍において高発現していた。CCl₄ による腫瘍において *Cbr3*, *Tff3* の発現と細胞増殖性に指標である Ki-67 陽性率との間に正の相関があった。胎仔・新生仔肝組織では、ほとんどの腫瘍関連遺伝子は強く発現していた。肝硬変を伴う腫瘍では *Igf2* mRNA、*H19* mRNA 発現が上昇していた。遺伝子発現の二次元階層クラスタリングにより、肝腫瘍関連遺伝子の発現パターンが、肝硬変の有無により影響を受けることが示唆された。肝硬変を伴う肝腫瘍における *Igf2* と *Igf2* 関連遺伝子の特異的発現亢進していた。ヒト HCC で IGF2 などの蛋白発現を免疫染色し、IGF2 陽性像は背景肝の線維化を伴う HCC に有意に高率であった。以上の成績より、マウス肝腫瘍で特異的に発現が増加する遺伝子を見出し、これらの遺伝子発現パターンが肝硬変および非肝硬変モデルの間で異なることを明らかにした。更に、マウス肝腫瘍では胎児・新生時期に高発現する遺伝子が再活性化され、これらの発現パターンは背景肝における肝硬変や線維化の有無により異なることが示唆された。特に、肝硬変に伴う肝腫瘍発生過程において IGF2 関連経路の活性化が重要な意義を持っている可能性がある。得られた内容は明快で、その医学的意義も高く、本論文は既に *Cancer Sci* 誌に公表されている。申請者の関連領域の知識も十分で、十分に学位論文にふさわしいと判断した。