様式第14

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博　士	氏　　名	辛　　氷

学 位 論 文 題 目

Critical role of Myc activation in mouse hepatocarcinogenesis induced by the activation of AKT and RAS pathways.

（AKTおよびRAS経路活性化によるマウス肝発癌過程におけるMyc遺伝子活性化の役割）

共 著 者 名

山本雅大，藤井清永，大塩貴子，陳錫，岡田陽子，渡邉賢二，三代川斉之，古川博之，西川祐司

Oncogene（改訂中）

研 究 目 的

*MYC*遺伝子の活性化はヒトの多くの腫瘍において重要な役割を果たしていることが知られている．ヒト肝細胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）では*MYC*遺伝子の存在する8q24 領域の高度の増幅が認められる症例は4-24%にとどまるが，44%の症例で2～6倍の軽度の増幅が見出されている．また，*MYC*遺伝子の発現はHCC発生初期においてプロモーターの脱メチル化により活性化される．さらに*MYC*遺伝子産物（MYC蛋白）はPI3K-AKT経路やRAS-MAPK経路の活性化により修飾され，安定性が増加することも知られている．しかし，HCCの発生および増殖において*MYC*遺伝子が実際にどのような役割を果たしているかは不明である．

Sleeping Beauty（SB）トランスポゾンシステムとhydrodynamic tail vein injection（HTVi）を組み合わせた癌遺伝子の肝細胞導入によるマウス肝発癌系が最近開発され，肝発癌における種々の癌遺伝子の相互作用を効率的に調べることが可能になった．本研究では活性型*AKT*および変異活性型*HRAS*遺伝子の導入によるHCCの発生および増殖に対し，内因性Myc（ヒトMYCのマウスortholog）と過剰発現させたMycがどのような影響を与えるのかを検討した．

材 料 ・ 方 法

SBトランスポゾンとHTViを組み合わせたマウス肝細胞への癌遺伝子導入系

成熟雄性C57BL/6Jマウスを実験に用いた．*In vivo*において肝細胞特異的に癌遺伝子を安定的に発現させるため，SB13トランスポゾンカセットに組み込んだ癌遺伝子（myristoylated *AKT* [*AKT*]，$HRAS^{V12}$ [*HRAS*], *Myc*）をSBトランスポゼース発現ベクターと混合し，尾静脈から急速静注した．上記の癌遺伝子を種々の組み合わせで導入するとともに，内因性Mycの発癌における役割を検討するため，Myc蛋白

を競合的に阻害するMadMyc蛋白を発現するSB13ベクターも導入した．一部の実験では，doxycyclineにより発現が誘導できるTet-Onシステムを用い，MadMycの発現を腫瘍発生の種々の段階で誘導した．

組織学的・免疫組織化学的検討，定量RT-PCR

肝組織は4% paraformaldehydeで灌流固定し，パラフィン切片を作製した．通常の病理組織学的検討を行うとともに，細胞増殖をKi-67免疫組織化学で，アポトーシスの程度をcleaved caspase-3免疫組織化学で検討した．また，肝組織からRNAを抽出し，種々の遺伝子のmRNA発現を定量RT-PCRで調べた．

cDNAマイクロアレイ解析およびgene set enrichment analysis (GSEA)

MadMycによるMyc阻害が肝腫瘍の遺伝子発現に与える影響を網羅的に調べるため，腫瘍組織から採取したRNAをone-color microarray (3D-Gene Microarray, TORAY)で解析し，得られたデータをさらにGSEAで解析した．

ヒトHCCの検討

旭川医科大学病院で手術されたHCC 33症例のパラフィン切片を病理組織学的に検討し，MYC免疫組織化学を行った（倫理委員会承認番号：14004）．

成　　　　績

***AKT*，*HRAS*，*AKT/HRAS*導入による肝腫瘍誘導および内因性Mycの活性化**

*AKT*単独，*HRAS*単独では導入後20-28週で多発性の肝腫瘍が形成された．組織学的にHCCの像で，腫瘍細胞内に脂肪の蓄積が認められた．*AKT*と*HRAS*を同時に導入すると（*AKT/HRAS*），肝発癌が顕著に促進され，4週間で多発性の腫瘍が形成された．*AKT/HRAS*誘導腫瘍組織には脂肪を蓄積した腫瘍細胞に混在し，脂肪に乏しく増殖性の高い腫瘍細胞が認められ，これらには免疫組織化学的にMyc蛋白の軽度の発現が確認された．

MadMycによる内因性Mycの阻害による肝発癌抑制効果

次に，*AKT/HRAS*腫瘍における内因性Mycの意義を検討した．*AKT*，*HRAS*と同時に*MadMyc*を導入すると，腫瘍形成がほぼ完全に抑制された．また，Tet-Onシステムを用い，*AKT/HRAS*導入後2週間でMadMycを誘導した場合にも腫瘍形成が顕著に抑制された．さらに*AKT/HRAS*導入後4週間でMadMycを2週間誘導すると，腫瘍細胞の脂肪蓄積が増加し，増殖性が有意に低下した．マイクロアレイ解析を行ったところ，MadMycにより肝腫瘍に特徴的な胎児期・新生児期遺伝子の発現が抑制されることが明らかになった．また，GSEAでMadMycがMycの機能を阻害していることが確認されるとともに，脂肪代謝，蛋白合成に強い影響を及ぼすことが明らかになった．

Myc過剰発現による肝発癌促進およびその量的効果

*Myc*を*AKT/HRAS*とともに導入すると，肝発癌の過程が短縮され，わずか2週間で肝全体が低分化なHCCにより置換された．Mycを過剰発現させた腫瘍では，脂肪の蓄積が減少し，核小体が明瞭になる傾向が認められた．定量RT-PCRにより，特にHRASとMycが同時に活性化されると，脂肪酸合成およびβ酸化に関連した酵素の遺伝子発現が低下することが明らかになった．また，*Myc*の導入量を3分の1に減らしても腫瘍形成に影響はみられなかったが，3倍に増加させた場合，アポトーシスの増加を伴い腫瘍形成が有意に抑制された．

ヒトHCCの組織像とMYC蛋白発現の関連

ヒトHCCの約3分の1において腫瘍細胞核におけるMYCの発現が確認された．MYC陽性HCCには腫瘍

細胞内に脂肪の蓄積しているものは認められず，核小体が顕著に腫大しているとともに，MYC非発現HCCに較べ，増殖性が有意に高かった．

考　　　　案

PI3K-AKT経路とRAS-MAPK経路の活性化により誘導されたマウスHCCの発癌過程において内因性Mycが重要な役割を担っていることが明らかになった．Mycは発癌過程の初期により深く関わっていると推察されるが，腫瘍細胞の増殖においてもMycは重要な意義を持つことが示唆された．また，Mycの効果は腫瘍細胞の代謝機能，特に脂質代謝，蛋白代謝と深く関わっていると考えられた．

Mycが腫瘍促進効果を発揮するためには比較的低い発現レベルで十分であり，一定の閾値を超えて高発現した場合には，アポトーシスを誘導し，腫瘍形成が抑制されることが明らかになった．

さらに，マウスHCCモデルで得られた結果の少なくとも一部はヒトHCCにも外挿できることが示唆された．今後，ヒトHCCの治療においてもMYCの活性制御が重要なアプローチとなると考えられる．

結　　　　論

本研究によりHCCの発生および増殖において比較的低いレベルのMYC（Myc）の発現および活性化が重要な意義を持っていることが示唆された．

参　考　文　献

1. Nagahama Y, Sone M, Chen X, Okada Y, Yamamoto M, Xin B, Matsuo Y, Komatsu M, Suzuki A, Enomoto K, Nishikawa Y. Contributions of hepatocytes and bile ductular cells in ductular reactions and remodeling of the biliary system after chronic liver injuries. Am J Pathol 184:3001-3012, 2014.

2. Chen X, Yamamoto M, Fujii K, Nagahama Y, Ooshio T, Xin B, Okada Y, Furukawa H, Nishikawa Y. Differential reactivation of fetal/neonatal genes in mouse liver tumors induced in cirrhotic and non-cirrhotic conditions. Cancer Sci. 106:972-981, 2015

3. Yamamoto M, Tanaka H, Xin B, Nishikawa Y, Yamazaki K, Shimizu K, Ogawa K. Role of the BrafV637E mutation in hepatocarcinogenesis induced by treatment with diethylnitrosamine in neonatal B6C3F1 mice. Mol Carcinog 2016 Jun 2. doi: 10.1002/mc.22510. PMID: 27253992

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	辛　冰

審査委員長　谷口 隆信　㊞

審査委員　大崎能伸　㊞

審査委員　奥村利勝　㊞

学　位　論　文　題　目

Critical role of Myc activation in mouse hepatocarcinogenesis induced by the activation of AKT and RAS pathways.

（AKT および RAS 経路活性化によるマウス肝発癌過程における Myc 遺伝子活性化の役割）

共　著　者　名

山本雅大，藤井清永，大塩貴子，陳錫，岡田陽子，渡邉賢二，三代川斉之，古川博之，西川祐司

申請者らは癌遺伝子導入による肝発癌における Myc の役割について報告している。AKT、HRAS 及び AKT/HRAS 遺伝子をマウスに導入すると、それぞれ 25 週、20 週、4 週で肝癌の発生が認められ、Myc を加えた 3 重導入ではさらに早い 2 週で発癌が誘導された。そこで Myc の競合阻害蛋白である MadMyc を用いて Myc の機能を阻害したところ、AKT 及び HRAS による発癌誘導は顕著に抑制され、Myc は発癌の初期段階において重要な機能を担っていると考えられた。Myc の阻害は増殖抑制以外にも細胞内脂肪蓄積を促進しており、マイクロアレイ解析において Myc は脂肪酸の合成やたんぱく質代謝にも影響を与え、いわゆる癌細胞における Warburg 効果の発現にも関わっていることが示唆された。また、Myc は胎児期遺伝子の発現も促進していて肝癌の脱分化にも関わっていることが示唆された。最後に、ヒト肝癌組織の免疫組織学的検討からも、Myc の発現は肝癌の脱分化/増殖昂進に寄与していることが示された。これらは肝発癌の分子機構を理解する上で重要な知見であり、これらに基づき Myc 阻害から肝発癌の予防あるいは治療に道を拓くものである。 本論文の論旨は明確であり、委員の質問に対しても具体的かつ明快な説明がなされ充分な知識を有していた。以上の結果を総合し、本委員会は本論文を博士論文として相応しいものと判定する。