

The study on the role of Cell cycle regulatory factor in the development of hepatocellular carcinoma via inflammatory response

柿本, 啓輔

<https://hdl.handle.net/2324/1441170>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



The study on the role of Cell cycle regulatory factor in the development of hepatocellular carcinogenesis via inflammatory response

炎症反応を介した発癌機構に対する細胞周期調節因子に関する研究

薬剤学分野 3PS11005P 柿本 啓輔

【序論】

癌は、日本における死因第1位の疾患であり、世界中でも癌による死者数は増加している。肝臓癌は慢性炎症を原因とし、慢性肝炎、肝硬変を経て発症する。肝臓癌は死亡率や再発率の高い癌であるが、化学療法については肝臓癌が抗癌剤に抵抗性を示しやすいなどの理由から標準的な療法が確立されていないのが現状である。そのため、肝臓癌では画期的な診断薬や新たな治療・予防戦略の開発が求められている。

一方、地球上の多くの生物には、体内時計と呼ばれる生体機能システムが備わっている。時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群による転写・翻訳のフィードバックループ機構によって、様々な生体機能に約24時間周期の変動（日周リズム）が生じている¹⁾。近年、体内時計機構が様々な疾患の発症に関わることが明らかにされている。癌に関しても、体内時計機構が細胞周期やアポトーシスを制御するなどの関与が指摘されている²⁾。しかしながら、体内時計機構が慢性炎症から発癌に至る過程をいかに制御しているかは不明である。

本研究では、炎症反応および発癌の標的分子として細胞周期調節因子に着目をした。第1章では、細胞周期調節因子の炎症反応に対する影響およびマウス肝臓における細胞周期調節因子発現の日周リズム制御機構について解析を行った。第2章では、ジエチルニトロソアミン（DEN）による肝臓癌モデルマウスを用いて、その発癌過程における細胞周期調節因子の影響について解析を行った。

【方法】

急性炎症モデルマウスおよび発癌モデルマウスの作製

5週齢 ICR 雄性マウスを自由摂食・摂水、明暗周期（明期：7:00-19:00）条件下で1週間飼育した後、急性炎症モデルは lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与することにより、発癌モデルは DEN の飲水投与によって作製した。発癌の評価は飲水開始から14週後における foci の形成で行った。発癌予防効果として、all-*trans* retinoic acid (ATRA) を DEN と同時に飲水投与した。

肝初代培養

マウス肝臓をコラゲナーゼ灌流法によって単離し、Williams' medium でプレートに播種した。4時間後に hepatocyte maintenance medium (HMM) に培地交換してその後の実験に用いた。

遺伝子発現解析

各遺伝子のタンパク質の発現量はウエスタンブロット法によって、mRNA の発現量は RT-PCR 法によって測定した。

統計解析

独立2群間の比較には Student's t-test、多群間の比較には分散分析（ANOVA）を用い、有意水準5%以下を有意な差とした。

【結果および考察】

第 1 章 細胞周期調節因子による炎症反応の時刻依存的な変化に関する検討

細胞周期調節因子が炎症反応に及ぼす影響

肝初代培養細胞を用い、細胞の増殖・脱分化に及ぼす細胞周期調節因子の影響について検討した。細胞周期調節因子をノックダウンした結果、細胞の脱分化マーカーの *Afp* および細胞増殖マーカーの *Cyclin D1* の発現が抑制された。これら遺伝子の発現抑制機構を解析した結果、炎症に関連する種々の転写因子のうち、NF- κ B シグナルに影響を及ぼすことが示唆された。さらに細胞周期調節因子の発現を抑制した結果、NF- κ B の転写活性は低下した。これらの結果より、細胞周期調節因子は NF- κ B シグナルを介した炎症反応を制御することによって、細胞の増殖や脱分化を制御していることが示唆された。

細胞周期調節因子の発現リズム制御機構の解析

細胞周期調節因子の発現制御機構は未だ不明である。そこで正常マウスの肝臓を対象に細胞周期調節因子の発現を測定したところ、mRNA、タンパク質レベルともに有意な日周リズムを示していた。さらに、時計遺伝子 *Clock* 変異マウスにおいて mRNA 発現リズムは消失し、発現量も低下した (Fig.1)。これらの結果から、細胞周期調節因子は分子時計によって制御されている可能性が示唆された。そこでルシフェラーゼアッセイ、*in vitro* で日周リズムを再構築させた高濃度血清処理、クロマチン免疫沈降などを解析した結果、細胞周期調節因子発現の日周リズムは RAR/RXR を介して ATRA によって制御されることが明らかになった。

細胞周期調節因子の発現リズムが炎症反応に及ぼす影響

細胞周期調節因子の発現には日周リズムが認められていたが、その機能の日周リズムは不明である。そこでマウスに対して LPS (15 mg/kg) を 13:00 または 1:00 のいずれかに単回腹腔内投与した。その結果、13:00 投与群における死亡率が 1:00 投与群と比較して有意に高くなっており、肝臓において明期後半に発現が高くなる細胞周期調節因子の発現リズムと対応していた (Fig.2)。

以上の結果から、細胞周期調節因子の発現リズムは RAR/RXR を介して ATRA によって制御されていた。また、この発現リズムに合わせて NF- κ B シグナルを介した炎症反応が時刻依存的に変化することが示唆され、細胞周期調節因子が生体の炎症シグナルの日周リズムに重要な役割を果たしている可能性が示された。

第 2 章 DEN 誘発性肝癌の発癌に対する細胞周期調節因子の機能解析

第 1 章において、細胞周期調節因子が NF- κ B を介した炎症シグナルの日周リズムを制御していることを明らかにしたが、肝臓癌発症との関連は不明である。そこで DEN による炎症および多段階発癌モデルを用いて、細胞周期調節因子と発癌の関連性を解析した。

DEN 誘発性肝癌に対する ATRA の影響

DEN 誘発性肝癌マウスに対して ATRA を同時に飲水投与した結果、すべてのマウスで発癌が抑制された。ATRA によるこの発癌抑制効果は、DEN 投与開始から 2 日目以降の ATRA 投与開始では認

められず、一方で、DEN 投与開始から 2 日目までおよび 7 日目までといった初期段階のみの ATRA 投与で発癌抑制が認められた。これらの結果から、ATRA は発癌初期段階に作用することによって DEN 誘発性肝癌を抑制することが示唆された。

DEN 誘発性肝癌の発癌初期段階における細胞周期調節因子発現の変化

DEN 誘発性肝癌に対する ATRA の発癌抑制効果が DEN 投与開始から 2 日目までに認められたことから、DEN 投与開始から 3 日間の細胞周期調節因子の発現量を測定した結果、投与開始 2 日目における細胞周期調節因子の発現量は ATRA によって有意に低下していた (Fig.3)。この抑制効果は nuclear factor of activated T-cells (NFAT) による転写抑制が原因となっており、投与開始 2 日目の *Nfatc2* 発現量は細胞周期調節因子と逆相関を示していた。

DEN 誘発性肝癌に及ぼす細胞周期調節因子の影響

DEN 投与開始 2 日目に細胞周期調節因子の発現が ATRA によって低下したことから、DEN 誘発性肝癌に及ぼす細胞周期調節因子の影響について検討した。DEN 投与開始前日に、細胞周期調節因子の siRNA を単回尾静脈から前投与することによって、DEN 誘発性肝癌モデルマウスの発癌初期段階における細胞周期調節因子の発現を抑制させた。このとき、発癌初期段階での NF- κ B シグナル (NF- κ B のその応答配列への結合量) が抑制された。さらにこの発癌初期段階における細胞周期調節因子の発現抑制によって、14 週後での発癌も抑制された。

これらの結果から、DEN 誘発性肝癌の初期段階において細胞周期調節因子を介した NF- κ B シグナルの制御が発癌抑制に重要であることが示唆され、細胞周期調節因子が肝臓癌発症の予防標的となりうることが示された。

【総括】

本研究では、細胞周期調節因子に着目をし、体内時計機構による制御および炎症反応、発癌に対する新たな知見を得ることができた (Scheme 1)。本研究で得られた成果や方法論は癌の時間薬物療法の構築のみならず、慢性炎症に起因する生活習慣病など様々な疾患についても応用することができ、新規の治療薬の開発や治療法の構築が期待できると思われる。

【引用文献】

- 1) Ikeda E, Matsunaga N, **Kakimoto K**, et al. *Mol Pharmacol* 83: 959-967, 2013.
- 2) Matsunaga N, Kohno Y, **Kakimoto K**, et al. *Toxicology* 280: 144-151, 2011.