

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04917

研究課題名(和文) Nrf2-p62ダブルノックアウトを用いたオートファジー異常による肝発癌の解析

研究課題名(英文) Analysis of carcinogenesis in hepatocellular carcinoma using Nrf2-p62 double knock out mouse

研究代表者

柳川 徹 (YANAGAWA, Toru)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10312852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレス防御系の転写因子であるNrf2と選択的オートファジーの基質となるp62を掛け合わせたNrf2-p62ダブルノックアウト(DKO)マウスを制作し、NAFLDからNASH、肝臓癌の発癌に至ることを見つけた。また、p62欠損細胞ではアポトーシスシグナルに異常があること、肝Kupffer細胞(マクロファージ)の貪食能に異常があること、臨床検体の健常部でのp62、LC3-A・B発現は有意に生存率が低下し、Cox比例ハザードモデルによる疾患特異的生存率ではLC3-A・Bが有意に予後不良因子であることが解った。以上からp62の欠損にNrf2の酸化ストレスの重積が肝臓癌の発症に至る原因を検討した。

研究成果の概要(英文)：We generated Nrf2-p62 double knock out mouse. Nrf2 is a transcription factor against oxidative stress. p62 is a substrate of selective autophagy. The liver of this mouse showed at first NAFLD and NASH, then finally turn into hepatocellular carcinoma. We found p62 deficient MEF showed resistance to apoptosis. Nrf2-p62 DKO cell showed reduction of phagocytic capacity of hepatic Kupffer cell (macrophage). By using clinical samples, immunohistochemical analysis of p62, LC3-A・B expression in normal tissue with carcinoma was performed. The p62, LC3-A・B expression group showed significantly poor prognosis analyzed by Kaplan mere curve and log rank test. The LC3-A・B expression group showed significantly poor prognosis analyzed by Cox's proportional hazard regression model. From above results we discussed the cause of carcinogenesis of hepatocellular carcinoma by p62 deficiency and oxidative stress accumulation.

研究分野：外科学

キーワード：p62 Nrf2

## 1. 研究開始当初の背景

柳川らは 1997 年に新しい酸化ストレスタンパク質をクローニングし遺伝子配列を決定して A170 (のちに p62) と命名し解析をすすめてきた。2007 年にオートファジー因子である LC3(Atg8)と結合し、選択的オートファジーを行う因子であることを解明し、ユビキチン・プロテオソーム系と異なり元来非選択的なタンパク分解機構と考えられてきたオートファジーが、p62 の発見によって選択的に分解されることが明らかにされた。さらに、細胞はこの原理を利用して、傷害されたミトコンドリアや細胞内での細菌などの認識にも使用されていることを解明してきた。近年、オートファジーの研究が進み、Atg5、Atg7 などのオートファジー関連遺伝子の欠損が、異常タンパク質が細胞内から除去できないため、変異の蓄積をおこし発癌に至ることが次々に報告され、オートファジーは腫瘍形成・進展過程に重要な役割をはたしていることが注目されている。それらの研究の中で p62 の蓄積は酸化ストレス応答をおこなう Nrf2-Keap1 系の活性化を引き起こし、腫瘍を起こすことが示され、口腔癌の領域にとどまらず、癌とオートファジーの関連を研究するには p62 の機能の解析が非常に重要になってきている。前回の研究で、我々は酸化ストレスと口腔癌の生成過程について、この p62 の果たす役割を、Bcl-2 に至るアポトーシスシグナルの観点からの検討をおこない、アポトーシスとオートファジーの接点を見いだしたが、今回、p62 が発癌において、酸化ストレス等で傷害されたタンパク等を回収してくる機能を予測し、酸化ストレスなどの防御機構が低下した Nrf2 ノックアウトを掛け合わせた Nrf2-p62 ダブルノックアウト(DKO)マウスを作ることにより、過度の酸化ストレスを生じさせ、人為的に肝臓癌を発症させることが可能にした。今回、この Nrf2-p62 DKO マウスを利用することにより、p62 の発癌に及ぼすメカニズムを口腔癌を中心に調べると同時に p62 が口腔癌治療の臨床ではどういう意義があるのかを探るため、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

p62(A170)は我々のグループでクローニングした酸化ストレスタンパク質で、傷害されたタンパク質をオートファゴゾームに運んで選択的オートファジーの際の基質となることが判明している。近年、オートファジーと癌の関連が明らかにされ、p62 の蓄積がオートファジーの欠落した細胞での発癌に関わることが示されてきた。本研究では p62 の発癌における役割を明らかにするために、酸化ストレス防御系の転写因子である Nrf2 と p62 を掛け合わせた Nrf2-p62 ダブルノックアウトマウスを制作し、このマウスを用いて、酸化ストレスの累積が肝臓癌の発症に至るメカニズ

ムを、酸化ストレス～オートファジー～アポトーシスのネットワークの中から探ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vitro* の解析

①酸化傷害の定量化 (DCFH-DA による活性酸素の定量) : UVB 照射によって細胞傷害を与え、p62(-/-)MEF および野生型のアポトーシス DCFH-DA と FACS で定量した。使用試薬と器具は Annexin V-FLUOS Staining Kit (Roche Diagnostic. Co., Tokyo)

FACSCalibur; Becton Dickinson Co., Tokyo

②アポトーシスシグナルの検討 : p62(-/-)MEF で増殖能の異常が知られているため、p62(-/-)MEF と p62 を siRNA でノックダウンした細胞について、Bcl-2 ファミリーの異常をウェスタンブロットで調べた。

③ゲノム編集による変異細胞の制作 : CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を用いて Caco-2、Raw264.7 細胞に対して Nrf2、p62 欠損細胞を製作した。20 bp の target single guide RNA 配列は CRISPR Design online software (<http://crispr.mit.edu/>) を用いて p62 および Nrf2 mRNA 配列から選定した。annealing ののち、short double-strand DNA は pX330 plasmid に組み込み、Caco-2 および RAW264.7 細胞に導入した (Neon Transfection System)。

④肝 Kupffer 細胞の食食能の測定 : 腹腔マクロファージを採取し、蛍光ラテックスビーズの取り込みによる食食能を測定した。ラテックスビーズ (1.0  $\mu\text{m}$  diameter, carboxylate-modified; FluoSpheres®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を体重あたり 0.57  $\mu\text{l/g}$  注入し、肝 Kupffer 細胞の表面マーカー F4/80 で染色し FACS で定量した。

⑤腹腔中の炎症性サイトカインの測定 : Raw264.7 細胞における TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の mRNA レベルの測定を RT-PCR によりおこなった。

⑥門脈からの LPS の透過性の亢進を調べるため、Raw264.7 細胞を用い、CRISPR/Cas9 システムにより、p62、Nrf2 欠損細胞を作成し単層培養して細胞膜抵抗値を測定した。

### (2) *in vivo* の解析

①Nrf2-p62 DKO マウスの製作:Nrf2 と p62 の単独欠損ノックアウトマウスを交配し、Nrf2(-/-) p62(-/-)ノックアウトマウスを選別し肝臓を採取して肝臓癌の発生率を確認した。

②病理学的評価 : Nrf2-p62 DKO マウスおよび Nrf2、p62 ノックアウトマウスの肝臓を採取し、病理学的に線維化を数値化して評価した。

### (3) 臨床の解析

①免疫染色によるオートファジー因子の臨床サンプルでの発現の確認 : 口腔扁平上皮癌の

臨床検体 (70 例) を選択し、p62, LC3-A, B の抗体を用いて酵素標識ポリマー法で染色を行い、臨床検体での発現と、臨床病態 (TNM 分類、pN、局所再発、後発転移、生存率など) との比較を行った。脱パラフィン後、マイクロウェーブ処理 (5 min 95° C) 後、使用抗体と濃度は以下の通りとした。LC3A (1:100, EP1528Y, ab52628, Abcam, Cambridge, UK), LC3B (1:200, Polyclonal, ab48394, Abcam) and p62 (1:100, SQSTM1, ab56416, Abcam)。

②統計解析：

統計解析は、染色と臨床指標についての関係は  $\chi^2$  乗検定を用いた。無再発生存率 (Recurrence-free survival)、疾患特異的生存率 (Disease-specific survival) について Kaplan-Meier 法 log-rank 検定を用いた。また、Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析によって解析を行った。解析ソフトは JMP Version 13 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。

4. 研究成果

(1) *in vitro* の解析

①酸化傷害の定量化 (DCFH-DA による活性酸素の定量)：UVB 照射によって細胞傷害を与え、p62<sup>-/-</sup>-MEF および野生型の酸化ストレスを DCFH-DA と FACS で定量したところ、活性酸素が p62<sup>-/-</sup>-MEF では減少していることが解った。図 1 は蛍光顕微鏡による活性酸素の検出と定量 (図 1)。

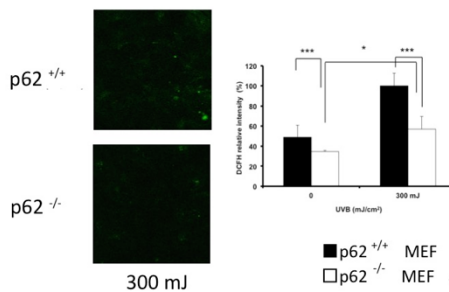


図 1 p62<sup>-/-</sup>-MEF における活性酸素の定量

②アポトーシスシグナルの検討：

p62<sup>-/-</sup>-MEF で増殖能の異常が知られているため、p62<sup>-/-</sup>-MEF と p62 を siRNA でノックダウンした細胞について、Bcl-2 ファミリーの異常を調べたところ Bcl-2 の上昇と BAX の低下が認められた (図 2)。以上からアポトーシス抵抗性が増大していることが考えられた。

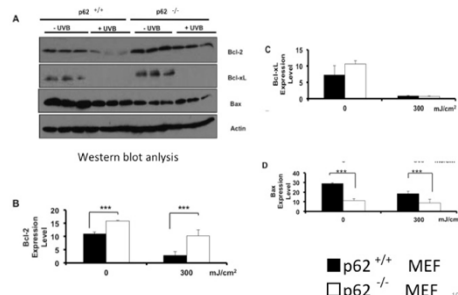


図 2 p62<sup>-/-</sup>-MEF におけるアポトーシスシグナルの異常

③ゲノム編集による変異細胞の制作：

CRISPR/Cas システムによるゲノム編集を用いて Raw264.7、Caco-2 細胞に対して p62 欠損細胞を製作した。

④肝 Kupffer 細胞の食食能の測定：

肝クッパー細胞の食食能を検討するため、腹腔マクロファージを採取し、蛍光ラテックスビーズの取り込みによる食食能を測定したところ、Nrf2 ノックアウト (KO)、Nrf2-p62 DKO マクロファージで有意に低下を認めた (図 3)。

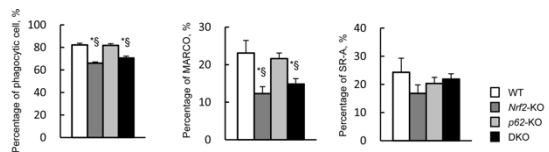


図 3 p62<sup>-/-</sup>-DKO マクロファージの食食能の評価

さらに TNF  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$  など炎症性サイトカインの mRNA の発現も有意に減少していた (図 4)。門脈からの LPS の透過性の亢進を調べるため、ゲノム編集により、p62、Nrf2 欠損細胞を作成し単層培養して細胞膜抵抗値を測定したところ Nrf2 欠損細胞では有意に他の細胞に比べて低下していた (図 5)。

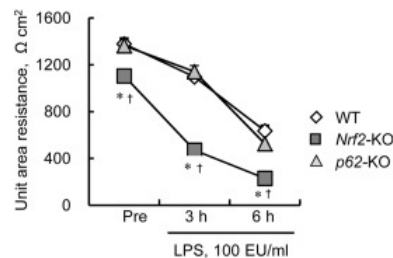


図 4 p62DKO マウスの炎症性サイトカインの mRNA 発現レベル

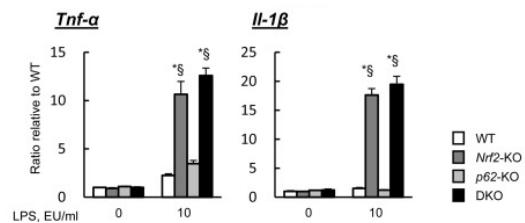


図 5 p62<sup>-/-</sup>, Nrf2-KO 細胞の膜抵抗値

(2) *in vivo* の解析

①Nrf2-p62 DKO マウスの製作:Nrf2 と p62 の単独欠損ノックアウトマウスを交配し、Nrf2<sup>-/-</sup> p62<sup>-/-</sup>ノックアウトマウスを選択し肝臓を採取して肝臓癌の発生率を確認したところ、Nrf2-p62DKO マウスの肝臓癌の発症

率は50週齢のマウスでは12% (8/66)であったが、Nrf2単独欠損、p62KO、Nrf2KOマウスでは発生は認められなかった(図6)。病理学的に肝臓の異常の部位を検討したところ、DKOではThe steatosis, activity, and fibrosis (SAF) scoresが8週齢、30週齢とも有意に大きく線維化の割合が増大していた(図7)。

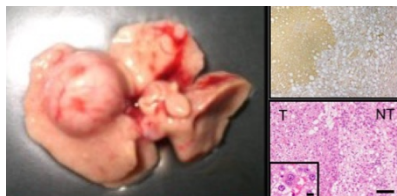


図6 Nrf2-p62DKO自然発症の肝細胞癌の肉眼像と組織像

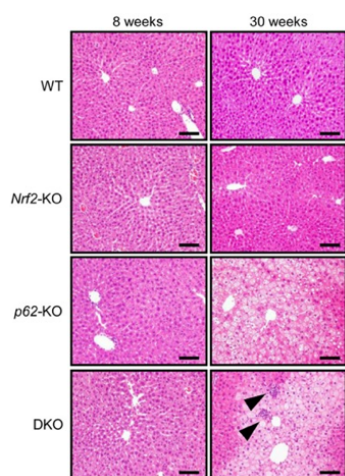


図7 Nrf2-p62DKOおよび野生型、p62,Nrf2欠損マウスの肝臓の組織像

### (3) 臨床の解析

①免疫染色によるオートファジー因子の臨床サンプルでの発現の確認: 口腔扁平上皮癌の臨床検体(70例)を選択しp62, LC3-A, LC3-B, の抗体を用いて切除標本における腫瘍部分を除く腫瘍周囲の健常部分の免疫染色を行い、おのおの発現の状態、臨床病態(TNM分類、分化度、局所再発、生存率など)との比較をおこない統計学的にカプランマイヤー法で解析し、log-rank検定ではp62, LC3-A・Bとも陽性例において無再発生存率(Recurrence-free survival)、疾患特異的生存率(Disease-specific survival)とも有意に予後不良であった(図8)。また、Cox比例ハザードモデルによる疾患特異的死亡率ではLC3-A・Bが有意に予後不良であることが示唆された(表1, 2)。

以上によって、肝臓癌の発がんについてp62欠損によるマクロファージ機能の低下、アポトーシス能の低下、腸管でもLPS透過性の亢進による炎症反応の増大などが脂肪肝に作用し炎症を惹起して線維化からp62の発癌に至

る可能性が示唆された。

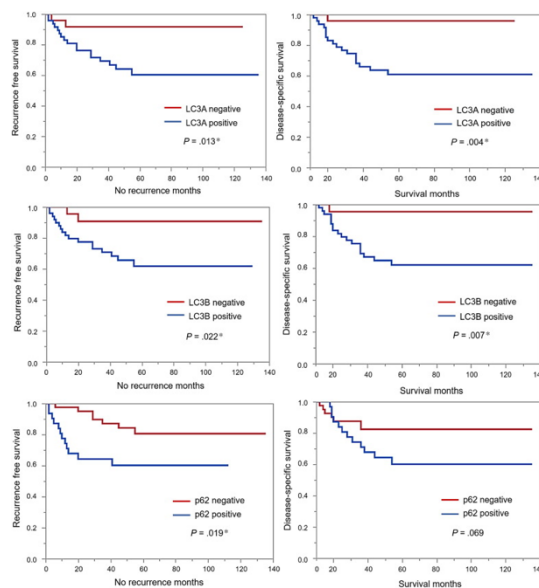


図8 カプランマイヤー法によるp62,LC3-A,Bの発現と無再発生存率、疾患特異的生存率

Variable	HR	95% CI	P
LC3A expression	Positive vs negative	5.21 1.49-32.9	0.007*
LC3B expression	Positive vs negative	2.16 1.20-4.04	0.009*
p62 expression	Positive vs negative	2.91 1.17-7.86	0.022*
T grade	III IV vs I II	1.21 0.47-3.01	0.676
Preoperative treatment	No vs yes	1.52 0.69-3.77	0.37
Histologic grade	G2/G3 vs G1	1.65 0.63-5.09	0.231
Alcohol	Yes vs no	1.34 0.67-5.39	0.529
Smoking	Yes vs no	1.11 0.43-2.74	0.826

\* P < 0.050.

表1 Cox比例ハザードモデルによるp62,LC3-A,Bの発現と無再発生存率

Variable	HR	95% CI	P
LC3A expression	Positive vs negative	10.86 2.24-94.9	0.001*
LC3B expression	Positive vs negative	1.78 1.10-3.17	0.042*
p62 expression	Positive vs negative	2.31 0.93-6.21	0.072
T grade	III IV vs I II	2.04 0.82-5.12	0.123
Preoperative treatment	No vs yes	3.7 1.49-9.97	0.012*
Histologic grade	G2/G3 vs G1	2.7 1.09-6.98	0.033*
Alcohol	Yes vs no	2.26 0.92-5.85	0.076
Smoking	Yes vs no	1.28 0.51-3.17	0.594

\* P < .050.

表2 Cox比例ハザードモデルによるp62,LC3-A,Bの発現と疾患特異的生存率

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Akiyama K, Warabi E, Okada K, Yanagawa T, Ishii T, Kose K, Tokushige K, Ishige K, Mizokami Y, Yamagata K,

Onizawa K, Ariizumi SI, Yamamoto M, Shoda J.

Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously results in the development of nonalcoholic steatohepatitis.

Exp Anim 査読有 2018 Vol.67, No.2. pp201-218. doi: 10.1538/expanim.17-0112.

- ② Terabe T, Uchida F, Nagai H, Omori S, Ishibashi-Kanno N, Hasegawa S, Yamagata K, Goshō M, Yanagawa T, Bukawa H.

Expression of autophagy-related markers at the surgical margin of oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and tumor recurrence.

Hum Pathol 査読有 2018 Vol.73, pp156-163. doi: 10.1016/j.humpath.2017.11.019.

- ③ Ito S, Kimura S, Warabi E, Kawachi Y, Yamatoji M, Uchida F, Ishibashi-Kanno N, Yamagata K, Hasegawa S, Shoda J, Tabuchi K, Sakai S, Bukawa H, Sekido M, Yanagawa T.

Corrigendum to "p62 modulates the intrinsic signaling of UVB-induced apoptosis" [Journal of Dermatological Science 83 (2016) 226-233].

J Dermatol Sci. 査読有 2017 Vol.86, No.3, pp259-260. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.02.284.

- ④ Ito S, Kimura S, Warabi E, Kawachi Y, Yamatoji M, Uchida F, Ishibashi-Kanno N, Yamagata K, Hasegawa S, Shoda J, Tabuchi K, Sakai S, Bukawa H, Sekido M, Yanagawa T.

p62 modulates the intrinsic signaling of UVB-induced apoptosis.

J Dermatol Sci. 査読有 2016 Vol.83, No.3 pp226-33. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.05.005.

- ⑤ 柳川 徹

外傷歯における生体のストレスと p62 の機能 p62 とストレス応答・オートファジーの観点から

日本外傷歯学会雑誌 査読有 2015, Vol. 1, No. 1, pp1-8

[学会発表] (計 3 件)

- ① 寺邊 健人、内田 文彦、柳川 徹、長井宏樹、大森 翔英、菅野 直美、長谷川正午、山縣 憲司、武川 寛樹：  
口腔がん切除断端における酸化ストレス

関連タンパク p62/SQSTM1、LC3-A、LC3-B の発現と腫瘍再発、生存率の関連性の検討。

第 70 回 N P O 法人日本口腔科学会学術集会 2016 年 4 月千葉

- ② 長井 宏樹、内田 文彦、長谷川 正午、齋藤 輝樹、長尾 徹、小牧 完二、馬場 脩、山縣 憲司、柳川 徹、武川 寛樹：  
口腔白板症における p62 の発現に関する病理組織学的検討。

第 60 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 2015 年 10 月名古屋

- ③ Ito S, Yanagawa T, Yamagata K, Hasegawa S, Sasaki K, Adachi K, Sekido M, Bukawa H:

p62 modulate intrinsic apoptosis signal of UVB induced skin cancer in head and neck region.

The Joint Meeting of 4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology & 39th Annual Meeting of Japan Society for Head and Neck Cancer 2015 年 6 月、神戸

[その他]

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柳川 徹 (YANAGAWA, Toru)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：10302852

### (2) 研究分担者

田淵 克彦 (TABUCHI, Katsuhiko)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号：20546767

蕨 栄治 (WARABI, Eiji)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：70396612

内田 文彦 (UCHIDA, Fumihiko)  
筑波大学・附属病院・医員  
研究者番号：70736008

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし