

論 文 内 容 要 旨

題目 Poly-(ADP-Ribose) Polymerase-1 Promotes Prothrombin Gene Transcription and Produces Des-Gamma-Carboxy Prothrombin in Hepatocellular Carcinoma.

(肝細胞癌における Des-gamma-carboxy prothrombin の産生は poly-(ADP-ribose) polymerase-1 によりプロトロンビン遺伝子の転写が亢進することによっておこる)

著者 Tatsuya Taniguchi, Kazuhiro Kishi, Tadahiko Nakagawa, Hironori Tanaka, Takahiro Tanaka, Tetsu Tomonari, Koichi Okamoto, Masahiro Sogabe, Hiroshi Miyamoto, Toshiya Okahisa, Naoki Muguruma, Mayumi Kajimoto, Ikuko Sagawa, Tetsuji Takayama

平成 29 年 4 月発行 Digestion 第 95 巻第 3 号
242 ページから 251 ページに発表済

内容要旨

Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP) は、 α -fetoprotein(AFP)と並んで肝細胞癌の腫瘍マーカーとして広く臨床応用されている。DCP は、プロトロンビン前駆体のグルタミン酸がカルボキシル化されていない異常プロトロンビンである。これまで DCP 産生の機序として、細胞内のビタミン K の欠乏、 γ -グルタミルカルボキシラーゼの変異などが提唱されているが、未だ一定の見解は得られておらず詳細は不明である。そこで本研究では、肝癌細胞株を用いて DCP 産生の機序を検討した。

まず初めに、7 種類の肝癌細胞株における DCP 産生とプロトロンビン発現の関係を調べたところ、DCP 産生肝癌細胞株 (Huh-1, Huh-7, HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5) では DCP 非産生肝癌細胞株 (HLF, HLE) に比べて有意にプロトロンビン mRNA 発現量が高かった。そこで、プロトロンビン遺伝子のプロモーター領域より種々の長さの欠失変異体を作成し、SEAP reporter gene assay により転写活性を評価した。Huh-1 細胞に-2985~+27 の欠失変異体を含む SEAP ベクター (P-2985) を遺伝子導入したところ非常に高い転写活性を認めたが、P-2955 で

様式(8)

は著明に低下し、P-2485, P-1259, P-952, P-424 では軽度低下した。一方、HLF 細胞ではいずれの欠失変異体もほとんど転写活性を示さなかった。これらの結果から、Huh-1 細胞においてプロトロンビン遺伝子の-2985~-2955(31bp)に転写活性化の責任領域があると推測した。-2985~-2955 領域に結合する転写因子を同定するため、この 31bp DNA と Huh-1 細胞核蛋白質をインキュベートし、結合蛋白質を抽出して質量分析を行った。その結果、31bp DNA に結合する蛋白質として Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) が検出された。次いで、Huh-1 細胞における PARP-1 発現を siRNA で knockdown したところ、P-2985 の転写活性は著明に低下した。更に、プロトロンビン遺伝子の 31bp DNA をプローブとして Huh-1 細胞の核蛋白質を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、DNA プローブに PARP-1 が結合していることが示された。DCP は c-MET を介した autocrine により細胞増殖を促進することが報告されていることから、最近 抗腫瘍薬として注目されている PARP-1 阻害剤は DCP 産生腫瘍に高い抗腫瘍活性を示すことが期待される。そこで、種々の肝癌細胞株の PARP-1 阻害剤 (iniparib) に対する感受性を調べたところ、DCP 産生肝癌細胞株 (Huh-1, HepG2) が DCP 非産生肝癌細胞株 (HLF, HLE) に比べて有意に高い感受性を示した。

以上の結果より、肝癌細胞株における DCP 産生機序は、PARP-1 によりプロトロンビン遺伝子の転写活性が亢進し、プロトロンビン前駆体が過剰産生することにより DCP が産生されることが示唆された。また、DCP 産生肝癌に対する PARP-1 阻害剤の有効性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1339 号	氏名	谷口 達哉
審査委員	主査 島田 光生 副査 六反 一仁 副査 井本 逸勢		

題目 Poly-(ADP-Ribose) Polymerase-1 Promotes Prothrombin Gene Transcription and Produces Des-Gamma-Carboxy Prothrombin in Hepatocellular Carcinoma.

肝細胞癌における Des-gamma-carboxy prothrombin の産生は poly-(ADP-ribose) polymerase-1 によりプロトロンビン遺伝子の転写が亢進することによっておこる

著者 Tatsuya Taniguchi, Kazuhiro Kishi, Tadahiko Nakagawa, Hironori Tanaka, Takahiro Tanaka, Tetsu Tomonari, Koichi Okamoto, Masahiro Sogabe, Hiroshi Miyamoto, Toshiya Okahisa, Naoki Muguruma, Mayumi Kajimoto, Ikuko Sagawa, Tetsuji Takayama.

平成 29 年 3 月発行 Digestion

第 95 巻第 3 号 242 ページから 251 ページに発表済

(主任教授 高山 哲治)

要旨 肝細胞癌の腫瘍マーカーとして、Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP) と α -fetoprotein が良く知られており、いずれも肝細胞癌のスクリーニング、診断、治療モニタリングに広く用いられている。このうち、DCP はプロトロンビン前駆体のグルタミン酸がカルボキシル化されていない異常プロトロンビンであり、特異性の高い腫瘍マーカーである。DCP 陽性肝細胞癌は転移・浸潤を来しやすく予後不良であるが、その機序として、DCP は肝癌細胞表面の c-MET に結合して細胞増殖能や転移・浸潤能の活性化に関わることが報告されている。しかし、肝細胞癌における DCP 産生の機序は明らかにされていない。そこで本研究では、肝癌細胞株を用いて DCP 産生の機序を検討した。得られた結果は以下の如くである。

1. 肝癌細胞株における DCP 産生とプロトロンビン mRNA 発現の関係を調べたところ、5 種類の DCP 産生肝癌細胞株はいずれも 2

種類のDCP非産生肝癌細胞株に比べてプロトロンビンmRNA発現が有意に高かった。

2. プロトロンビン遺伝子のプロモーター領域より種々の長さの欠失変異体を作成し、DCP産生肝癌細胞株を用いてSecreted embryonic alkaline phosphatase reporter gene assayを行なったところ、-2985~-2955 (31bp) 領域に転写活性化の責任部位が認められた。
3. -2985~-2955の31bp DNAに結合する核蛋白質を抽出して質量分析を行なったところ、Poly-(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) が同定された。
4. ゲルシフトアッセイにより、PARP-1が31bpDNAに結合することが示された。
5. 最近抗腫瘍薬として注目されているPARP-1特異的阻害剤 (iniparib) は、いずれの肝癌細胞株にも抗腫瘍活性を示したが、とくにDCP産生肝癌細胞株に高い抗腫瘍活性を示した。

以上より、肝癌細胞株におけるDCP産生機序は、PARP-1によりプロトロンビン遺伝子の転写活性が亢進し、プロトロンビン前駆体が過剰産生することによりDCPが産生されること、またDCP産生肝癌に対するPARP-1阻害剤の有効性が示唆された。

本研究は肝細胞癌におけるDCPの発現の機序を明らかにするとともに、予後不良とされているDCP産生肝癌の新規治療薬の開発や肝細胞癌の個別化治療法の発展に寄与すると考えられその臨床的意義は高く、学位授与に値すると判定した。