

論文内容の要旨

論文提出者氏名 横溝 千尋

論文題目

High expression of p300 in HCC predicts shortened overall survival in association with enhanced epithelial mesenchymal transition of HCC cells.

論文内容の要旨

肝細胞癌は世界で頻度の高い癌腫であるがその治療には限界がある。外科的に完全切除された症例でさえ再発率が高く、予後は満足できるものではない。一般に癌腫の進展は、発生の際の上皮間葉転換（EMT）に準えて論じられ、細胞間接着分子 E-cadherin の喪失により細胞易動度が高くなり癌細胞は浸潤・遠隔転移すると論じられている。一方、癌腫の進展には多数の原因がありそのひとつとして低酸素状態が挙げられ、hypoxia induced factor（HIF）を誘導して EMT を起こすことが知られている。

転写補因子である p300 はヒストンアセチル基転移酵素（HAT）活性も有し、また p53 のアセチル化にも関与することが知られているため、細胞の増殖や分化やアポトーシスといった様々な生物学的現象に関与すると言われている。従って p300 の変異による機能喪失が発癌に関与するとして報告や、反対にその過剰発現が大腸癌や前立腺癌の進展に寄与するといった報告も散見される。

そこで我々は実際の肝細胞癌切除標本と肝癌細胞株を用いて、p300 の発現と肝癌進展の関係を調べた。

まずヒト肝癌の切除標本 45 症例において免疫組織化学で検討した結果、p300 は非癌部より癌部の細胞核に高発現しており、p300 高発現は TMN stage や微小血管浸潤や肝内転移と正の相関を示すことが確認された。さらに p300 の高発現群の生存期間は低発現群と比して有意に予後不良であった。

上記の結果を説明するために、まず我々は肝癌細胞株 3 種の p300 と E-cadherin 発現の関係を検討した。一般に浸潤能が高く低分化型肝癌細胞株である HLE は、

高分化型肝癌細胞株である HepG2 や Huh7 と比較して p300 の発現レベルが高いこと、以前に報告されたように E-cadherin の発現が低下していることを確認した。

そこでこの p300 と E-cadherin の負の相関をさらに検証するため、我々は small interfering RNA を用いて肝癌細胞株における p300 の発現を抑制した。すると興味深いことに Huh7 と HLE においては p300 の発現を抑制すると E-cadherin の発現が増加して、一方間葉系マーカーの発現は低下することが確認できた。更に Huh7 と HLE では、p300 の発現抑制で細胞浸潤・遊走能が抑えられ EMT を抑制されることが示唆された。しかし HepG2 ではこうした現象は認められなかった。

一般に EMT では細胞増殖を伴うことが知られており、P300 発現を抑制した肝癌細胞株は β カテニンの核内移行とサイクリン D1 の発現を抑制することで、アポトーシスに関係なく細胞増殖能が抑制されていることが明らかになった。以上から肝癌細胞株において p300 の発現抑制が EMT を抑制することが確かめられた。

さらに p300 による EMT 抑制のメカニズムについて更に検討を加えた。E-cadherin 遺伝子プロモーター領域の転写抑制因子である Snail や Twist の発現が E-cadherin の発現調節をしていることが既知とされており、さらに最近の報告では Twist のプロモーター領域に直接 HIF が転写因子として結合して Twist の発現を調節していることが報告されている。本実験でも Huh7 と HLE で p300 の発現抑制を行うと Snail や Twist の発現が低下することを認めた。また p300 ノックダウンでは HIF-1 の発現も低下しており、HLE では Twist のプロモーター領域の活性も僅かであるが有意に低下していることが示された。

今回の研究において、我々は肝癌検体の p300 発現レベルが微小脈管浸潤や肝内転移、さらに生命予後と強い相関を有することを明らかにした。また肝癌細胞株 Huh7 と HLE の p300 遺伝子の発現抑制を抑制すると Snail や Twist の発現低下を通して、EMT の中心的役割である E-cadherin の発現を回復していた。したがって p300 が肝細胞癌の進展に関与していることが示唆された。