

肝細胞におけるがん抑制 遺伝子 p53 の恒常的な 活性化は、逆説的に非細胞 自律的な肝発がんを促進させる

Makino Y, Hikita H, Fukumoto K *et al* : Constitutive Activation of the Tumor Suppressor p53 in Hepatocytes Paradoxically Promotes Non-Cell Autonomous Liver Carcinogenesis. *Cancer Res* 82 : 2860-2873, 2022

疋田隼人, 竹原徹郎

大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学

Point

- 肝細胞における p53 の恒常的な活性化は、非細胞自律的な肝発がんを促進する。
- p53 の恒常的な活性化による肝発がんには、肝前駆細胞集団の出現が関与しており、ペレチノインで抑制される。
- 慢性肝疾患患者の肝臓では p53 の標的遺伝子の 1 つである p21 の活性化が認められ、肝臓における p21 高発現は、その後の肝発がん率が高い。

Keyword

慢性肝疾患, p53 活性化, 肝発がん, 肝前駆細胞, ペレチノイン

* 背景・目的

p53 はゲノムの守護神ともよばれる最も有名ながん抑制遺伝子の 1 つである¹⁾。通常、p53 のタンパク量はつねに Mdm2 によって分解され低レベルで維持されている。DNA ダメージなどのさまざまな細胞ストレスを受けると、p53 はリン酸化され Mdm2 の分解から逃れ、その結果 p53 が蓄積し下流の遺伝子が転写される²⁾³⁾。このような p53 の活性化により、ストレスを受けた細胞は細胞周期抑制や、アポトーシス、細胞老化、DNA 修復が誘導され、細胞自

律的な発がんは抑制される^{1)~3)}。

慢性肝疾患の肝細胞では、さまざまな生体ストレスにより p53 が活性化している^{4)~13)}。しかし、肝細胞における p53 活性化が、慢性肝疾患の肝病態に与える影響は不明である。そこで、本研究では肝細胞 p53 活性化が、慢性肝疾患の肝病態進展に与える影響を明らかにすることを目的とした。

* 方法

肝細胞特異的に p53 が恒常的に活性化するマウス



モデルとして、p53 を分解する Mdm2 を肝細胞特異的に欠損した肝細胞特異的 Mdm2 欠損マウス (Alb-Cre Mdm2^{fl/fl} : LiM) を作製した。また、肝腫瘍形成を促進させるため、肝細胞の Kras が過剰活性する肝細胞特異的 KrasG12D 発現マウス (Alb-Cre Kras^{LSI-G12d/+} : LiK) と交配し、肝細胞特異的 KrasG12D 発現 Mdm2 欠損マウス (LiKM) を作製した。臨床検体として、慢性肝疾患患者の肝生検試料および対照として慢性肝疾患を有していない転移性肝腫瘍や良性腫瘍を有する患者の非腫瘍部などの肝生検試料を用いて検討した。

* 結果

4 カ月齢の時点で、KrasG12D を発現した LiK マウスは 18% しか肝腫瘍形成を認めなかったが、さらに Mdm2 を欠損させた LiKM マウスはすべて肝腫瘍形成を認めた。いずれのマウスの肝腫瘍も、中分化から高分化の肝細胞がん様であった。形成された腫瘍個数、最大腫瘍径は LiKM マウスで有意に大きかった。興味深いことに LiKM マウスの肝腫瘍部では、Mdm2 遺伝子は保持されており、遺伝子改変による p53 活性化を誘導していない Cre 発現陰性細胞からの腫瘍形成であった。

6 週齢の時点で、KrasG12D を発現した LiK マウスにくらべて、さらに Mdm2 を欠損させた LiKM マウスでは肝細胞アポトーシスの増加を認めた。網羅的な解析では、アポトーシスシグナル伝達経路のほか、p53 経路の活性化、サイトカイン・ケモカインシグナル経路の活性化を認めた。単離した肝細胞でも、これらの関連遺伝子の発現亢進を認め、肝組織切片では p53 や p21 陽性肝細胞、TUNEL 陽性肝細胞、細胞老化関連 β -ガラクトシダーゼ染色陽性肝細胞を多数認めた。また、網羅的な解析において肝前駆細胞関連の活性化も認めた。6 週齢のマウスの肝組織切片では pan CK や AFP、CD133 陽性細胞が血管周囲に出現し、4 カ月後にはこれらの細胞が領域をもって拡大し、形成された腫瘍もこれらのマー

カーの発現を認めた。

KrasG12D を発現せずに Mdm2 を欠損させた LiM マウスでは、4 カ月齢で肝腫瘍形成は認めなかったが肝細胞障害の出現や肝前駆細胞の出現、肝細胞の細胞老化を認めた。また、2 年齢の時点で野生型マウスでは肝腫瘍形成は認めなかったが、LiM マウスでは Mdm2 遺伝子が保持された肝腫瘍形成を認め、Mdm2 の欠損は KrasG12D の発現がなくとも、時間を要するが肝腫瘍形成を促進させた。

KrasG12D を発現した LiK マウスと、さらに Mdm2 を欠損させた LiKM マウスからそれぞれオルガノイド培養にて肝前駆細胞集団を単離したところ、LiKM マウスから単離した肝前駆細胞オルガノイドでは染色体不安定性が高く、免疫不全マウスに移植すると造腫瘍性を認めた。ペレチノインは肝前駆細胞を分化誘導およびアポトーシス誘導させることが知られている¹⁴⁾¹⁵⁾。LiKM マウスから単離した肝前駆細胞オルガノイド、もしくは肝前駆細胞オルガノイドを移植したゼノグラフト腫瘍は、ペレチノイン投与で増殖速度は有意に抑制された。そこで、LiK または LiKM マウスにペレチノインを投与した。LiK マウスでは肝腫瘍形成に影響を与えなかった。一方、LiKM マウスでは p53 標的遺伝子発現や細胞老化・炎症関連遺伝子発現は変化を認めなかったが、肝前駆細胞マーカー発現は有意に低下し、腫瘍数、最大腫瘍径も有意に抑制された。

KrasG12D を発現した LiK マウスの p53 を欠損させ、肝細胞特異的 KrasG12D 発現 p53 欠損マウス (LiKP) を作製した。4 カ月の時点でコントロールの LiK マウスでは 13%、LiKP マウスの 46% に肝腫瘍形成を認め、p53 欠損により LiK マウスの肝腫瘍形成は促進された。LiKP マウスで形成された腫瘍の多くは低分化肝腫瘍や胆管細胞がん様の腫瘍を呈した。一方、KrasG12D を発現し Mdm2 を欠損させた LiKM マウスの p53 をさらに欠損させ、肝細胞特異的 KrasG12D 発現 Mdm2 p53 ダブル欠損マウス (LiKMP) を作製した。LiKM マウスにくらべて肝臓内の p53 標的遺伝子発現や細胞老化・炎症関連遺伝

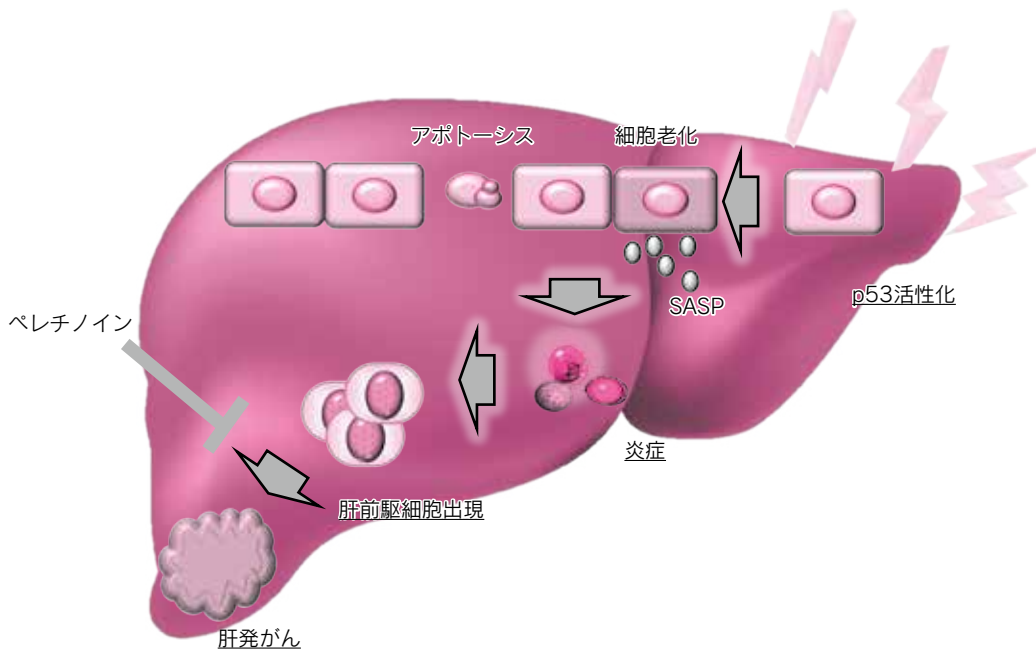


図1 肝細胞における p53 活性化による肝がん誘導

子発現，肝前駆細胞マーカー発現は有意に低下し，4カ月齢の時点では LiKM マウスは全例肝腫瘍形成を認めたと LiKMP マウスは 58%しか肝腫瘍形成を認めず，肝腫瘍形成率は有意に抑制された。LiKMP マウスで形成された腫瘍の多くは低分化肝腫瘍や胆管細胞がん様の腫瘍を呈し，腫瘍部の Mdm2 および p53 遺伝子は欠損しており，Cre 発現陽性細胞からの腫瘍形成であった。総じて，LiKM マウスにおける肝細胞アポトーシス亢進，SASP 増加，炎症増悪，および肝腫瘍形成促進などの表現型は，肝細胞の p53 をさらに欠失させることによって消失し，KrasG12D を発現し p53 を欠損させた LiKP マウスのような表現型に変化した。

慢性肝疾患患者の肝臓では，正常肝とくらべて p53 標的遺伝子の 1 つである p21 の発現量は有意に増加していた。p53 標的遺伝子 (bax)，細胞老化・炎症関連遺伝子 (p16, hgf, tnf, ccl2, cd68)，肝前駆細胞関連遺伝子 (cd90, AFP, l1f, ifng) 発現も慢性肝疾患患者の肝臓で上昇を認めた C 型慢性肝疾患患者の肝臓において p21 発現が高い患者は低い患者とくらべて有意にその後の肝がん率が高かった。

* 考察

活性化した p53 は，肝細胞の細胞周期制御因子として本来の作用を発揮し，アポトーシスと細胞老化を誘導しており，このことは，細胞自律的な肝がん抑制につながる。一方，肝細胞における p53 の恒常的な活性化は，非細胞自律的な肝がんを促進することを明らかにした(図1)。慢性肝疾患患者の肝がん予防という観点からは，肝細胞の p53 活性は消失しても過剰でもがんは促進され，最適化することが重要である。

文献

- 1) Lane DP : Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358** : 15-16, 1992
- 2) Bode AM, Dong Z : Posttranslational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4** : 793-805, 2004
- 3) Wade M, Li YC, Wahl GM : MDM2, MDMX, and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **13** : 83-96, 2013
- 4) Akyol G, Dursun A, Poyraz A *et al* : P53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in nontumoral liver diseases. *Pathol Int* **49** : 214-221, 1999
- 5) Loguercio C, Cuomo A, Tuccillo C *et al* : Liver p53 expression in patients with HCV-related chronic hepatitis. *J Viral Hepat* **10** : 266-270, 2003
- 6) Charni M, Rivlin N, Molchadsky A *et al* : p53 in liver pathologies-

- taking the good with the bad. *J Mol Med* **92** : 1229–1234, 2014
- 7) Kodama T, Takehara T, Hikita H *et al* : Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* **121** : 3343–3356, 2011
 - 8) Shahnazari P, Sayehmiri K, Minucmehr Z *et al* : The increased level of serum p53 in hepatitis B-associated liver cirrhosis. *Iran J Med Sci* **39** : 446–451, 2014
 - 9) Lu W, Lo SY, Chen M *et al* : Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* **264** : 134–141, 1999
 - 10) Kao CF, Chen SY, Chen JY *et al* : Modulation of p53 transcription regulatory activity and posttranslational modification by hepatitis C virus core protein. *Oncogene* **23** : 2472–2483, 2004
 - 11) Derdak Z, Lang CH, Villegas KA *et al* : Activation of p53 enhances apoptosis and insulin resistance in a rat model of alcoholic liver disease. *J Hepatol* **54** : 164–172, 2011
 - 12) Yuan H, Zhang X, Huang X *et al* : NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate FFAs-induced dysfunction and apoptosis of β -cells via JNK, p38 MAPK and p53 pathways. *PLoS One* **5** : e15726, 2010
 - 13) Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T *et al* : p53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *J Biol Chem* **279** : 20571–20575, 2004
 - 14) Zheng YW, Tsuchida T, Shimao T *et al* : The CD133⁺CD44⁺ precancerous subpopulation of oval cells is a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Stem Cells Dev* **23** : 2237–2249, 2014
 - 15) Guan HB, Nie YZ, Zheng YW *et al* : Acyclic retinoid induces differentiation and apoptosis of murine hepatic stem cells. *Stem Cell Res Ther* **6** : 51, 2015