



Title	Forkhead Box M1 Transcription Factor Drives Liver Inflammation Linking to Hepatocarcinogenesis in Mice
Author(s)	倉橋, 知英
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76236
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 倉橋 知英		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	竹原、敏中
	副 査 大阪大学教授	南 池 章
	副 査 大阪大学教授	熊 御 淳
論文審査の結果の要旨 肝癌の発症には、慢性肝疾患を背景とした炎症の持続が重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、その分子機構は十分に解明されていない。一方で、Forkhead Box M1 (FoxM1) 転写因子は、様々な肝疾患を背景とした肝癌で発現が亢進することが知られているが、慢性肝疾患における役割は不明である。本論文は、慢性肝疾患における肝細胞FoxM1の役割を、独自に作成した肝細胞特異的FoxM1過剰発現マウス(TGマウス)を用いて解析したものである。<i>in vivo</i>の検討で、慢性肝障害マウスモデルにおいて、肝内FoxM1発現が誘導された。FoxM1発現誘導により、TGマウスにおいてマクロファージの動員を伴う肝障害、肝線維化、肝発癌を自然発症した。<i>in vitro</i>の検討、プロモーター解析の結果、FoxM1が肝細胞においてケモカインCCL2発現を直接制御していることが分かった。FoxM1特異的阻害剤投与により、TGマウス、慢性肝障害マウスモデルの肝障害が軽減した。これらの研究の結果は、FoxM1が肝細胞においてCCL2制御を介した肝内炎症を惹起し、肝発癌を誘導することを明確に示したものであると同時に、FoxM1抑制が、慢性肝疾患の治療や肝癌の予防における新たな治療標的になりうる可能性を示した優れた論文であり、学位に値すると考える。		

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	倉橋 知英
論文題名 Title	Forkhead Box M1 Transcription Factor Drives Liver Inflammation Linking to Hepatocarcinogenesis in Mice (FoxM1転写因子は、マウス肝臓において炎症を誘導し発癌に寄与する)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 慢性肝疾患における持続的な炎症は、結果として、肝硬変さらには肝癌を発症させる。一方で、Forkhead box family転写因子はショウジョウバエForkhead変異体責任遺伝子の哺乳類ホモログで、組織の初期発生、分化、代謝に関与している。Forkhead Box M1 (FoxM1) 転写因子は、細胞周期制御や癌化を担う重要な分子として近年注目されており、肝臓では肝再生時や肝癌組織において発現上昇することが知られている。FoxM1転写因子は、様々な背景肝疾患における肝癌で発現が上昇し、患者の術後予後を規定し得ること、ヒト肝癌細胞において、脂質代謝メバロン酸経路により制御されていることも報告されている。しかしながら、FoxM1の慢性肝疾患における役割については不明である。そこで、今回、慢性肝疾患におけるFoxM1の役割を検討することを目的とした。 〔方法(Methods)〕 8週齢のC57BL/6雄マウスを用い、通常食群、慢性肝障害モデルとして高脂肪高コレステロール食 (HFHC) および、四塩化炭素 (CCl₄) 投与を行い、HFHC 8週負荷後、CCl₄ (0.5mL/kg bw, 2回/週) 4週投与後に、それぞれ肝内FoxM1発現量の検討を行った。遺伝子発現は定量的リアルタイムPCR法を用いて、蛋白発現は免疫染色法を用いて、それぞれ解析した。次に、ドキシサイクリン (DOX) 含有水により時期特異的、肝細胞特異的にFoxM1発現を誘導可能なマウス (<i>Tet07-FoxM1/Rosa26-LSL-rtTA/Alb-Cre</i> (+)、以下<i>TG</i>) を、独自に作製した。対照として、同腹の<i>Tet07-EGFP-FoxM1/Rosa26-LSL-rtTA/Alb-Cre</i> (-)、以下<i>WT</i>) を用いた。<i>WT</i>及び<i>TG</i>より初代培養肝細胞を採取して培地中にDOXを添加し、肝細胞FoxM1発現誘導時の遺伝子発現量、蛋白発現量の変化を検討した。マウス肝細胞株 (BNL CL2、AML12) に対して、<i>FoxM1</i>に対するsiRNAを用いてknockdownし、遺伝子発現量、蛋白発現量の変化を検討した。<i>TG</i>にClodronate Liposome及び、N-アセチルガラクトサミン修飾した<i>Cc12</i>に対するsiRNA (GalNAc-si<i>Cc12</i>) を投与し、<i>TG</i>の表現型におけるマクロファージ、肝細胞CCL2の役割を検討した。<i>TG</i>、HFHC負荷したマウスに対してFoxM1特異的阻害剤thiostrepton投与を行い、肝障害、肝内炎症の変化を評価した。 〔成績(Results)〕 通常食群と比較して、HFHC 8週負荷後、CCl₄ 4週投与後に、肝内FoxM1遺伝子発現、蛋白発現が増加した。<i>TG</i>では<i>WT</i>と比較して、FoxM1発現誘導3日後に血中ALTや、TUNEL陽性細胞数の増加といった肝障害、マクロファージの肝内浸潤を伴う肝内炎症、炎症関連分子の肝内遺伝子発現の増加を認めた。出生時よりFoxM1発現を誘導した<i>TG</i>では13週齢で肝線維化を認め、48週齢で全個体に肝発癌を認めた。<i>TG</i>の初代培養肝細胞では、FoxM1発現誘導後にケモカイン<i>Cc12</i>の遺伝子発現、培養上清へのCCL2産生が有意に増加した。マウス肝細胞株において、FoxM1発現を抑制した結果、肝細胞の<i>Cc12</i>遺伝子発現や、培養上清中へのCCL2産生が低下した。クロマチン免疫沈降法、Luciferase assayの結果、FoxM1が肝細胞においてケモカイン<i>Cc12</i>プロモーター領域へ結合し、CCL2発現を直接制御していることが示唆された。Clodronate Liposomeによるマクロファージ除去や、GalNAc-si<i>Cc12</i>による肝細胞<i>Cc12</i> knockdownにより、DOX投与3日後のFoxM1依存的な肝障害は軽減した。Thiostrepton投与により、FoxM1発現誘導3日後の<i>TG</i>における肝障害は軽減し、HFHC8週負荷後の肝障害も軽減した。 〔総括(Conclusion)〕 慢性肝障害マウスモデルで、肝内FoxM1発現が誘導された。肝細胞特異的FoxM1過剰発現により、肝障害、肝線維化および肝発癌を自然発症した。その機序として、肝細胞におけるFoxM1によるCCL2の発現制御および肝細胞CCL2によるマクロファージの動員が関与していることが示唆された。FoxM1は、炎症制御を介して肝発癌に寄与し、慢性肝疾患に対する新たな治療標的になり得る可能性が示唆された。	