

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08999

研究課題名(和文) 肝臓における癌悪性化シグナルを標的とした新規治療法の確立

研究課題名(英文) New therapy for hepatocellular carcinoma

研究代表者

白羽 英則 (Shiraha, Hidenori)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：40379748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓におけるNotchシグナル活性化と癌悪性化メカニズムの関連性を検討した。Notchシグナルの阻害剤である γ -secretase inhibitor (GSI)は、単独では培養肝臓細胞の細胞増殖にほとんど影響を与えなかったが、抗癌剤の細胞増殖抑制作用を倍増させた。肝臓がんの化学療法においてNotchシグナル制御を行うことが抗癌剤耐性化抑制に寄与する可能性が示唆された。抗癌剤耐性化の克服により化学療法の必要な肝臓がん患者の予後を改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cytotoxic agents have been developed to treat advanced hepatocellular carcinoma (HCC). Notch signaling is associated with carcinogenesis, epithelial-mesenchymal-transition (EMT), cancer stem cells (CSC). We investigated the effect of γ -secretase inhibitor (GSI), a Notch inhibitor, in combination with cytotoxic agents in HCC cell lines. GSI exerts an anti-tumor effect via inhibition of EMT and CSC, consequently enhancing cell sensitivity to cytotoxic agents.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝細胞癌 Notch シグナル 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(肝癌)は、5年生存率が50%以下と予後不良である。本邦の癌死亡原因第3位で増加傾向にあり、有効な治療法開発が望まれる。抗癌剤治療抵抗性をもたらす癌の性質に癌幹細胞化があり、肝癌が進展し悪性化が進行する際にも癌幹細胞化が進行し、治療抵抗性を引き起こしている可能性が高い(Dean M et al, *Nature Review Cancer* 5: 275-284, 2005)。これまでの研究成果(肝癌における Notch シグナルをターゲットとした新規腫瘍血管新生抑制療法の開発 2011-2013 年度 基盤研究 C)において腫瘍血管新生を制御する Notch シグナルが肝癌幹細胞化も制御している可能性が高いことが判明した。また、膵癌の研究においては、Notch シグナルが抗癌剤耐性を制御していることも解明している(Horiguchi S, Shiraha H et al, *Molecular Oncology* 7(4):840-9, 2013)。

2. 研究の目的

- Notch シグナル活性化の Twist 発現を介する癌幹細胞化機構の解明
- 癌幹細胞化による抗癌剤耐性化機構の解明
- 癌幹細胞化抑制療法の検討(in vitro での検討)
- 臨床検体を用いた検討(a, b の検討結果について、実際の臨床サンプルにおいて検証)

3. 研究の方法

- 肝癌培養細胞及び遺伝子改変肝癌培養細胞を用いて Notch シグナル活性化が、Twist 発現や癌幹細胞化に与える影響について検討する。
- 肝癌培養細胞を用いて、Notch シグナル活性化による癌幹細胞化が MRP の発現および、5FU, cisplatin に対する抗癌剤耐性化に与える影響について検討する。
- 肝癌培養細胞及び遺伝子改変肝癌培養細胞を用いて、セクレターゼ阻害剤が 5FU, cisplatin に対する抗癌剤耐性化や癌幹細胞化(増殖能、転移能、腫瘍形成能)に与える影響を検討する。
- a, b で検討した項目について、実際の臨床検体で検証する。RUNX3, jagged1-Notch シグナル, Twist, MRP 発現と抗癌剤効果の関連について臨床検体を用いて検証す

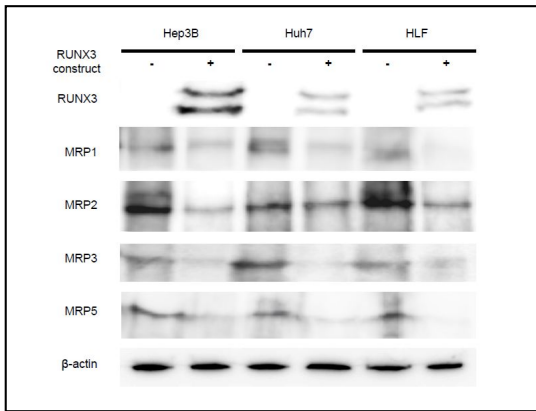
る。

4. 研究成果

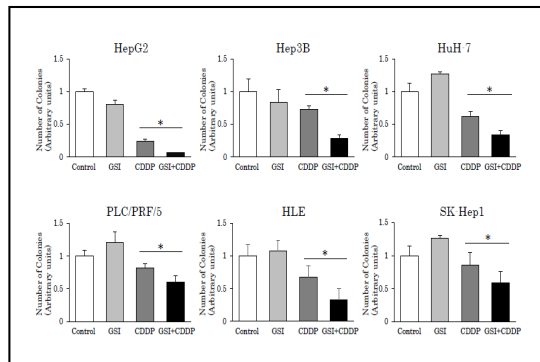
Notch シグナルと他の肝癌悪性化関連転写因子の検討において、肝癌培養細胞 Hep3B, Huh7, HLE, SK-Hep-1 を用いて検討を行い、Notch シグナルの活性化により転写因子 Twist 発現が亢進する事を Western blotting により確認した。癌抑制遺伝子 Runt-related transcription factor 3 (RUNX3)のプラスミド導入により RUNX3 蛋白質の発現は亢進し、RUNX3-siRNA の導入により RUNX3 蛋白質の発現は低下することも Western blotting により確認した、これらの細胞操作により肝癌培養細胞における Notch シグナルを制御することが可能であることが確認された。

また、Notch シグナルの活性化により下流シグナルの Hey, HES が活性化することも Western blotting により確認した。更に肝癌の癌幹細胞マーカーである EpCAM の発現が亢進する事も確認できた。Notch シグナルの活性化は、E-cadherin 発現を低下させ、細胞移動能を亢進させることも確認した。同様に上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)に関連する N-cadherin や vimentin の発現も亢進した。Notch シグナルの活性化が、その下流シグナル伝達分子である NICD, HES, Hey 等の活性化を介して EMT を亢進させるのみならず、肝癌の癌幹細胞化に関わる EpCAM の活性化を制御している事が確認できた。EMT の亢進は、細胞形態の変化、細胞移動能及び EMT の指標となる E-cadherin, N-cadherin, vimentin の変化により確認した。癌幹細胞化については、CD90, CD133, CD44, CD24, EpCAM 等に対する抗体を用いた Western blotting 及びフローサイトメトリーで検討した。その結果、EpCAM 発現が Notch シグナルの活性化により最も大きく変化することが判明した。

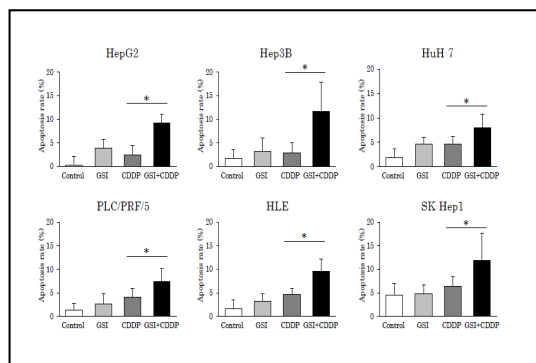
また、Notch シグナルの活性化により EpCAM を発現した細胞は、癌幹細胞としての性質を有しており、抗癌剤の耐性化に關する蛋白群の発現が制御を受けている可能性が高いことが判明した。抗癌剤感受性試験においては、抗癌剤(5-FU, cisplatin)に対する耐性と EpCAM 発現の関連も確認された。更に Notch シグナルの活性化により、抗癌剤の耐性化に關与している MRP(Multidrug Resistance Protein)の発現が制御されていることが確認された。MRP は、MRP 1-5 について Western blotting により発現を検討し、いずれも Notch シグナルの活性化と相関することを確認した。



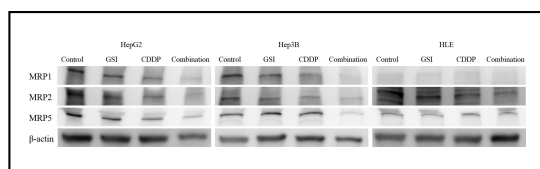
Notch シグナル阻害剤である γ-secretase inhibitor (GSI)は、単独では培養肝癌細胞の細胞増殖にほとんど影響を与えなかったが、cisplatinの細胞増殖抑制作用を倍増させた。



GSI と cisplatin の併用効果について Hoechst33342 を用いた apoptosis assay では、cisplatin により誘導される apoptosis を 2 - 4 倍程度増強する事が判明した。



Notch シグナル阻害による抗癌剤効果増強は、Notch シグナル阻害による癌幹細胞化の阻害が原因となっていることが予測されたため、colony formation assay により癌幹細胞化を評価した。その結果 GSI と cisplatin の併用により特に colony formation の阻害効果が強く認められた。Western blotting で GSI と cisplatin の併用により MRP の発現低下が起こっていることが確認できた。



また、癌幹細胞化と関連ある分子である EpCAM, Twist, ZEB1, Snail, Slug はいずれも GSI と cisplatin の併用により発現低下していることが確認できた。

以上より、Notch シグナルを阻害することにより cisplatin の効果を増強できる可能性が証明できた。

本研究の成果によって、肝がんの化学療法において Notch シグナル制御を行う事が抗癌剤の耐性化抑制に寄与する可能性が示唆された。抗癌剤耐性化の克服により化学療法の必要な肝がん患者の予後を改善できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計8件)

Sawahara H, Shiraha H, Uchida D, Kato H, Kato R, Oyama A, Nagahara T, Iwamoto M, Horiguchi S, Tsutsumi K, Mandai M, Mimura T, Wada N, Takeuchi Y, Kuwaki K, Onishi H, Nakamura S, Watanabe M, Sakaguchi M, Takaki A, Nouso K, Yagi T, Nasu Y, Kumon H, Okada H. Promising therapeutic efficacy of a novel reduced expression in immortalized cells/dickkopf-3 expressing adenoviral vector for hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol. 査読有, 10, 2017, 1769-1777, DOI: 10.1111/jgh.13757.

Nouso K, Kariyama K, Nakamura S, Onishi A, Wakuta A, Oyama A, Ako S, Dohi C, Wada N, Morimoto Y, Takeuchi Y, Kuwaki K, Onishi H, Ikeda F, Shiraha H, Takaki A, Okada H. Application of radiofrequency ablation for the treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol. 査読無, 32, 2017, 695-700, DOI: 10.1111/jgh.13586.

Ako S, Nakamura S, Nouso K, Dohi C, Wada N, Morimoto Y, Takeuchi Y, Yasunaka T, Kuwaki K, Onishi H, Ikeda F, Shiraha H, Takaki A, Okada H. Transcatheter Arterial Chemoembolization to Reduce Size of Hepatocellular Carcinoma before Radiofrequency Ablation. Acta Med Okayama, 査読有, 4(71), 2018, 47-52, DOI: 10.18926/AMO/55662.

加藤 小百合, 竹内 康人, 和田 望, 森元 裕貴, 桑木 健志, 大西 秀樹, 中村 進一郎, 白羽 英則, 高木 章乃夫, 岡田 裕之 Low-dose FP 療法が奏効した切除不能混合型肝癌の 1 例, 日本消化器病学会雑誌, 査読有, 113, 2016, 2050-2056, DOI: 10.11405/nisshoshi.113.2050

Nouso K, Kariyama K, Nakamura S, Onishi A, Wakuta A, Oyama A, Ako S, Dohi C, Wada N, Morimoto Y, Takeuchi Y, Kuwaki K, Onishi H, Ikeda F, Shiraha H, Takaki A, Okada H. Application of radiofrequency ablation for the treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 査読有, 32, 2017, 695-700, DOI: 10.1111/jgh.13586

Dohi C, Nouso K, Miyahara K, Morimoto Y, Wada N, Kinugasa H, Takeuchi Y, Kuwaki K, Onishi H, Ikeda F, Nakamura S, Shiraha H, Takaki A, Okada H. Potential of alpha-fetoprotein as a prognostic marker after curative radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*, 査読有, 1, 2015, 1-2, DOI: 10.1111/hepr.12636

Nagahara T, Shiraha H, Sawahara H, Uchida D, Takeuchi Y, Iwamuro M, Kataoka J, Horiguchi S, Kuwaki T, Onishi H, Nakamura S, Takaki A, Nouso K, Yamamoto K. Hepatic stellate cells promote upregulation of epithelial cell adhesion molecule and epithelial-mesenchymal transition in hepatic cancer cells. *Oncology Reports*, 査読有, 34, 2016, 1169-1177, DOI:10.3892/or.2015.4126

Kataoka J, Shiraha H, Horiguchi S, Sawahara H, Uchida D, Nagahara T, Iwamuro M, Morimoto H, Takeuchi Y, Kuwaki K, Onishi H, Nakamura S, Takaki A, Nouso K, Yagi T, Yamamoto K, Okada H. Loss of Runt-related transcription factor 3 induces resistance to 5-fluorouracil and cisplatin in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 査読有, 35, 2016, 2576-2582, DOI: 10.3892/or.2016.4681

〔学会発表〕(計 11 件)

大山 淳史, 澤原 大明, 内田 大輔, 白羽 英則, 岡田 裕之、難治性肝細胞癌に対する REIC/Dkk-3 を用いた遺伝子治療、第 53 回日本肝臓学会総会、2017 年 6 月 8 日～9 日、広島国際会議場(広島)

大山 淳史, 白羽 英則, 岡田 裕之、進行肝細胞癌治療における最新治療:基礎と臨床の立場から REIC/Dkk-3 遺伝子導入アデノウイルスベクターを用いた肝癌治療、JDDW2017、2017 年 10 月 12 日～15 日、福岡国際会議場(福岡)

竹内 康人, 池田 房雄, 和田 望, 安中 幸, 安中 哲也, 大西 秀樹, 中村 進一郎, 白羽 英則, 高木 章乃夫, 岡田 裕之、DAA 治療による SVR 後発癌、JDDW2017、

2017 年 10 月 12 日～15 日、福岡国際会議場(福岡)

大西 秀樹, 能祖 一裕, 中村 進一郎, 和田 望, 安中 幸, 竹内 康人, 安中 哲也, 桑木 健志, 白羽 英則, 高木 章乃夫, 岡田 裕之肝動注化学療法から分子標的薬への切り替えのタイミング 肝機能と早期治療効果判定の観点から、JDDW2016、2016 年 11 月 03 日～06 日、神戸コンベンションセンター(神戸)

土肥 千紘, 能祖 一裕, 赤穂 宗一郎, 和田 望, 森元 裕貴, 竹内 康人, 桑木 健志, 大西 秀樹, 池田 房雄, 中村 進一郎, 白羽 英則, 高木 章乃夫, 岡田 裕之 乏血性腫瘍における EOB-MRI を用いた肝癌の診断手順、JDDW2016、2016 年 11 月 03 日～06 日、神戸コンベンションセンター(神戸)

澤原 大明, 白羽 英則, 岡田 裕之、肝癌治療の新展開 REIC/Dkk-3 遺伝子導入による肝細胞癌治療の検討、JDDW2015、2015 年 10 月 08 日～11、グランドプリンスホテル新高輪(東京)

足立 卓哉, 能祖 一裕, 和田 望, 森元 裕貴, 竹内 康人, 桑木 健志, 大西 秀樹, 中村 進一郎, 白羽 英則, 高木 章乃夫, 山本 和秀、ソラフェニブ治療による長期生存例の検討、JDDW2015、2015 年 10 月 08 日～11、グランドプリンスホテル新高輪(東京)

大西 秀樹, 能祖 一裕, 中村 進一郎, 和田 望, 竹内 康人, 桑木 健志, 白羽 英則, 高木 章乃夫, 山本 和秀、腫瘍マーカーの推移から見た肝動注化学療法の早期治療効果予測、第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 05 月 21 日～22 日、ホテル日航熊本(熊本)

永原 照也, 白羽 英則, 山本 和秀、セクレターゼ阻害薬による肝細胞癌治療抵抗性の克服、第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 05 月 21 日～22 日、ホテル日航熊本(熊本)

堀口 繁, 白羽 英則, 内田 大輔, 永原 照也, 片岡 淳朗, 岩室 雅也, 加藤 博也, 高木 章乃夫, 能祖 一裕, 山本 和秀、-secretase inhibitor による Notch 経路阻害は膵癌幹細胞を阻害し抗癌剤治療効果を増強する可能性がある、JDDW2015、2015 年 10 月 08 日～11、グランドプリンスホテル新高輪(東京)

内田 大輔, 白羽 英則, 山本 和秀、膵/胆道癌の分子標的・免疫と治療応用 REIC/Dkk-3 遺伝子による膵癌治療、JDDW2015、2015 年 10 月 08 日～11、グランドプリンスホテル新高輪(東京)

〔図書〕(計 1 件)

Hidenori Shiraha, Shigeru Horiguchi, Hiroyuki Okada, Springer,

Encyclopedia of Signaling Molecules,
2018, 4781-4786.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-gastro.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白羽 英則 (SHIRAHA, Hidenori)

岡山大学 大学病院・講師

研究者番号：40379748

(2) 研究分担者

桑木 健志 (KUWAKI, Kenji)

岡山大学 大学病院・助教

(平成 29 年 3 月 27 日退職のため削除)

研究者番号：80643387

大西 秀樹 (ONISHI, Hideki)

岡山大学 大学病院・助教

研究者番号：30595468

中村 進一郎 (NAKAMURA, Shinichiro)

岡山大学 大学病院・講師

研究者番号：70514230

(平成 29 年 10 月 11 日退職のため削除)

能祖 一裕 (NOUSO, Kazuhiro)

岡山大学 医学部・客員研究員

研究者番号：10314668

岩室 雅也 (IWAMURO, Masaya)

岡山大学 大学病院・助教

研究者番号：30645403

堀口 繁 (HORIGUCHI, Shigeru)

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究
科・助教

研究者番号：70761104

(平成 29 年 3 月 27 日追加)

竹内 康人 (TAKEUCHI, Yasuto)

岡山大学 大学病院・助教

研究者番号：70814200

(平成 29 年 10 月 11 日追加)

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし