

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10161

研究課題名(和文) EGFR阻害剤による肝障害進展抑制の機序の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Elucidation and clinical application of the mechanism of inhibition of liver damage progression by EGFR inhibitor

研究代表者

藤井 努 (FUJII, TSUTOMU)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：60566967

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)：研究者らは近年、動物モデルにおいて上皮成長因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR)阻害剤による肝硬変抑制効果を確認し報告した(Hepatology 2014)。本研究ではこの現象の機序を具体的に解明するとともに、ヒトで肝の硬変化を抑制するという新たな視点からの治療法の構築・開発を目指した。ラットにおける肝硬変抑制モデルにおける蛋白発現の検討、Hepatic Stellate Cellのマーカーの発現の検討と単離培養、ヒト肝切除検体における遺伝子・蛋白発現の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：In recent years, researchers reported the effect of inhibiting cirrhosis by epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors in animal models (Hepatology 2014). In this research, we clarified the mechanism of this phenomenon concretely and aimed at the development of a treatment method from a new viewpoint that suppresses cirrhotic changes of the liver in humans. Examination of protein expression in rat cirrhosis suppression model, examination of marker expression of Hepatic Stellate Cell, and isolation culture and examination of gene / protein expression in human HCC specimens, were performed.

研究分野：肝胆膵外科学

キーワード：肝癌 肝障害抑制モデル EGFR阻害剤 ラット

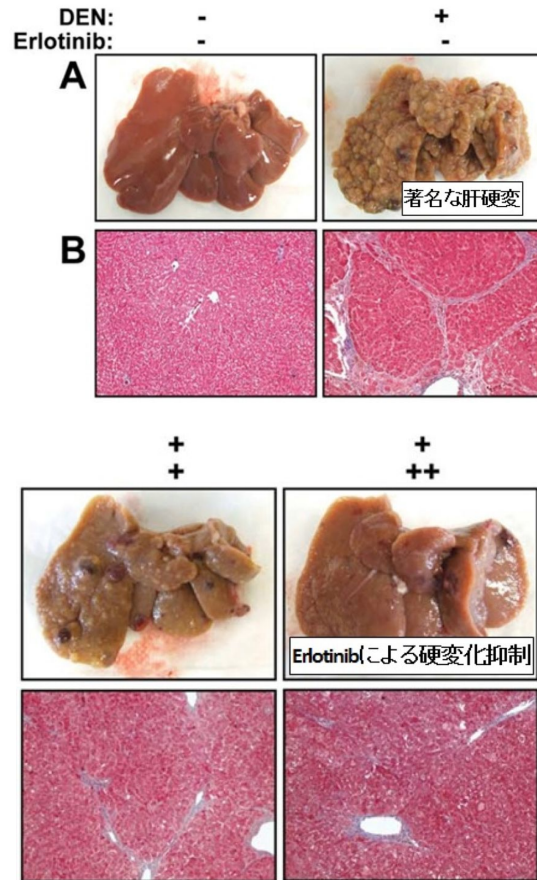
1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は世界で6番目に多い固形癌であり、その患者数は世界的に増加傾向にある。いくつかの集学的治療が行われているが、その長期予後は決して良いとはいえない。研究代表者は、米国 Harvard 大学 Massachusetts General Hospital Cancer Center に 2008 年まで在籍し、この分野の研究活動を積極的に行っていた。その研究成果の一つとして、上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF) の遺伝子多型が肝硬変患者の肝組織中及び血清中の EGF 量に有意に相関し、更に発癌リスクを高めることを報告した (JAMA 2008)。EGF とその受容体である EGFR の遺伝子増幅や遺伝子変異、構造変化が、発癌、および癌の増殖、浸潤、転移などに関与することはすでに明らかになっている。

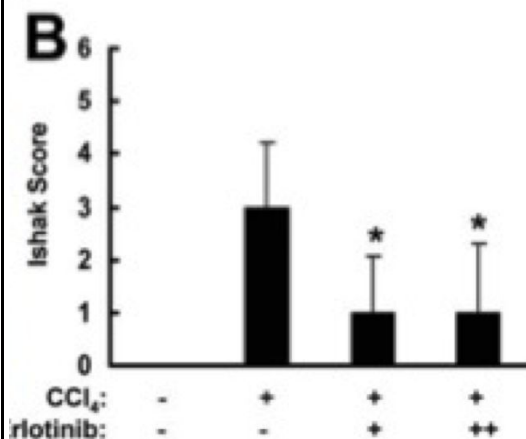
2. 研究の目的

研究代表者らは近年、Diethylnitrosamine (DEN), 四塩化炭素 (Carbon tetrachloride; CCl₄) を用いた肝障害～肝細胞癌発生モデルにおいて、EGFR 阻害剤である Erlotinib は肝細胞癌の発生を抑制するだけでなく、肝硬変～肝線維症をも抑制することを報告した (Fuchs BC, Fujii T (equally contributed) et al, Hepatology 2014)。

ラットへの DEN 投与により肝障害が惹起されるが、Erlotinib を投与することにより、肝細胞癌だけでなく、肝硬変の程度も軽減している (図 1)。Masson トリクローム染色においても、Erlotinib 投与により膠原線維の減少が認められる (図 1)。EGFR 阻害剤により肝細胞癌発生が抑制されることは既知の事実であるが、さらに肝硬変・肝線維化をも抑制することは今まで報告されておらず、非常に興味深い結果である。さらに他の動物、薬剤でも同様の効果が得られるかどうかを検証するため、マウスの CCl₄ モデルでも同様の処理を行った。ラット-DEN モデルと同様に、マウス-CCl₄ モデルにおいても、Erlotinib 投与により線維化が抑制されており、トリクローム染色における Ishak 線維化スコアも有意に低下した。Erlotinib の肝硬変抑制効果は、普遍的である可能性が示唆された。

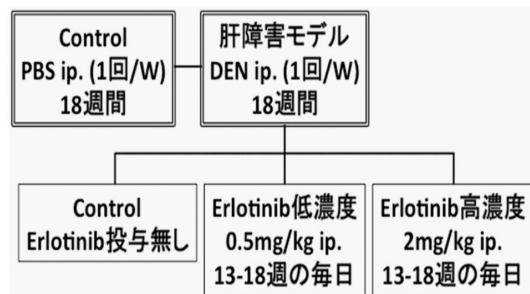


さらに研究協力者である Hoshida (Broad Institute of MIT and Harvard) は肝硬変患者の遺伝子発現プロファイリングから肝細胞癌発生と予後予測遺伝子を報告しているが (N Eng J Med 2008, Gastroenterology 2013)、今回のラットモデルにおける検討で、DEN 投与により Poor-prognosis 遺伝子群の高発現、Good-prognosis 遺伝子群の低発現を認め、これらは、Erlotinib により改善することが示された。



3. 研究の方法

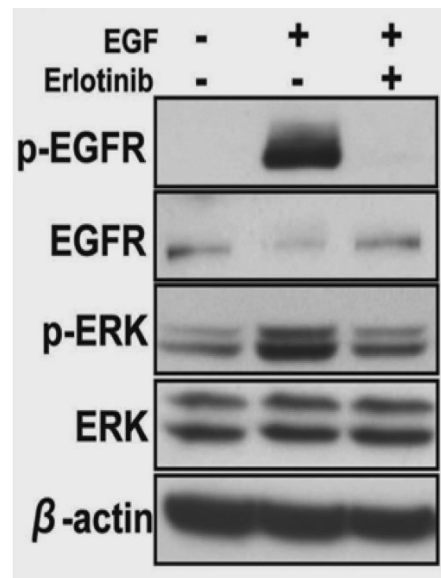
- 1) ラットの DEN 腹腔内投与による肝硬変モデルの作成
- 2) Erlotinib 腹腔投与による肝硬変抑制効果の実証
- 3) 同モデルから採取した肝組織における遺伝子学的背景の解明(特に、p-ERK などの EGFR 関連シグナル伝達系因子の発現を、Western blot 法、定量 PCR 法、免疫染色などで検討)
- 4) HSC のマーカーである α -SMA、Desmin、GFAP の発現
- 5) ヒト肝切除検体で、肝障害の程度別で遺伝子・蛋白発現を同様に検討、ラットモデルと同様の遺伝子学的背景であることを証明



4. 研究成果

- 1) 当該年度では、以下の3点の研究を実施した。(1)ラットにおける肝硬変抑制モデルにおける免疫染色による蛋白発現の検討(2)Hepatic Stellate Cell の単離培養(3)ヒト肝切除検体における遺伝子・蛋白発現の検討
- 2) ラットにおける肝硬変抑制モデルの作成と肝臓の摘出
ラットに Diethylnitrosamine (DEN) の腹腔内投与を週1回、18週間行い、肝障害モデルを作成した。さらにそれらを以下のように3群に分けた。Control 群 (PBS のみ週1回腹腔内投与)、低濃度 Erlotinib 群 (0.5 mg/kg を腹腔内投与、13-18 週の毎日)、高濃度 Erlotinib 群 (2 mg/kg を腹腔内投与、13-18 週の毎日)。摘出した肝臓において、p-ERK などの EGFR-RAS-MAPK シグナル伝達系遺伝子の解析が目的である。定量 PCR 法、Western blot 法はすでにしており、本年度は免疫染色を行い、Western blot 法の結果と合致する結果を得た。
- 3) Hepatic Stellate Cell (HSC) マーカーの発現の検討と HSC の単離培養
肝線維化に關与する HSC のマーカーである α -SMA、Desmin、GFAP の発現が、DEN 投与により増加し、また Erlotinib 投与により減少することは、Western blot 法および免疫染色にて以前に検討している。本年度は HSC の単離培養を試みてきたが、良好な結果を得るこ

とができず、現在も継続して試行中である。
4) ヒト肝切除検体における遺伝子・蛋白発現の検討
肝切除検体 (n=120) を、肝障害の程度別、Erlotinib の前投与有無別での遺伝子・蛋白発現を検討した。p-ERK などの EGFR-RAS-MAPK シグナル伝達系遺伝子の発現を検討した結果、ラットモデルと同様の機序であることを証明できた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 努 (FUJII, Tsutomu)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：60566967

(2) 研究分担者

神田 光郎 (KANDA, Mitsuro)
名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00644668

山田 豪 (YAMADA, Suguru)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：30467287

小寺 泰弘 (KODERA, Yasuhiro)
名古屋大学・医学系研究科(研究院)・教授
研究者番号：10345879