

令和元年6月12日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10425

研究課題名(和文) 癌特異性に基づく肝細胞癌根治療法としての移植医療適応拡大に関する研究

研究課題名(英文) Treatments including liver transplantation against hepatocellular carcinoma based on tumor characteristics

研究代表者

梅下 浩司 (Umeshita, Koji)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60252649

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)：癌治療の治療抵抗性の原因とされる癌幹細胞を標的とする治療は、癌制御の点で効率的な治療である。肝細胞癌における癌幹細胞マーカーの1つであるCD13を標的とするUbenimexにて肝癌細胞株を治療したところ、抗癌剤のみ投与した場合に増加するCD13陽性細胞の割合が低いままであった。また、別の幹細胞マーカーであるc-Metと肝動脈化学塞栓療法(TACE)の関係を検討すると、術前TACE施行後に肝切除を施行した症例では、術前TACEを施行しなかった症例と比較して、c-Metの発現陽性症例の割合が有意に高かった。これらの結果より、癌幹細胞を標的とする治療は肝癌再発予防に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、癌幹細胞を標的とする治療は肝癌の治療として論理的に効率的なものであり、実際に有効である可能性が確認された。この結果は、移植後の肝癌再発予防につながる可能性を示唆するものであり、非常に意義深いものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) were reported to be involved in resistance to chemo/radiation therapy. We previously reported that CD13 was both a marker of CSCs and a candidate therapeutic target in hepatocellular carcinoma (HCC). We explored the antitumor effect of a combined therapy, where ubenimex, a CD13 inhibitor, was combined with conventional anticancer drugs. In HCC cell lines, while the expression of CD13 increased after an exposure to each anticancer drug alone, the CD13 expression decreased with ubenimex administration. Next, we focused on c-Met, another CSC marker and transcatheter arterial chemoembolization (TACE). We investigated clinical impact of TACE on c-Met expression. The results showed that c-Met upregulation was observed significantly more frequently in clinical samples of HCC that were treated with preoperative TACE than in samples with no TACE treatment. These results would be useful in treatments against HCC based on tumor characteristics.

研究分野：肝胆膵・移植外科

キーワード：肝細胞癌 癌幹細胞 肝移植 ABO不適合移植

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌に対する根治療法としての肝移植は、癌の完全摘出と病的障害肝の入れ換えという両側面を有する。肝移植症例登録報告によると本邦では臓器移植法改正後、年間の脳死肝移植症例数は50例前後まで増加したものの、最近では横這い傾向で、欧米と比較して生体肝移植症例に頼らざるを得ないのが現状である。従って、本邦における特殊な背景を考慮し、生体肝移植の適応を拡大させる方法と成績をさらに改善する方法も検討されるべきである。生体肝移植の適応を拡大させる方法として ABO 不適合移植がある。特にブレイクスルーとなったのは、抗体産生細胞 (B 細胞) の表面マーカーである CD20 を標的とするリツキシマブの誕生である。ただし、本邦におけるリツキシマブの投与量については各施設により差があり、どの量が必要であると同時に安全であるかについての多施設共同研究はほとんど行われていないのが現状である。我々の教室では本邦の生体肝移植におけるリツキシマブの至適投与方法を確認する多施設共同研究に参画した。免疫抑制剤は、拒絶反応を抑制するために必要であると同時に、腎障害を含む様々な副作用を惹起するため、維持期には必要最小量まで減量する必要がある。通常は、免疫抑制剤の血中濃度のトラフ値を用いているものの、この量が適切かどうかは個々の症例により変化する。免疫モニタリングにより、現時点での免疫抑制レベルが適切か否かを判断することが可能となり、腎障害を最小化したレジメンの効果と安全性を証明することが可能となる方法である。教室では、CD13 が肝細胞癌の癌幹細胞の表面マーカーであると同時に、また治療標的であることも証明した。既存の抗癌剤は、非癌幹細胞を標的としているため、抗癌剤治療で例え一旦腫瘍が縮小しても、癌幹細胞が残存することで再発を来すとする癌幹細胞仮説が存在する。従って癌幹細胞を標的とした新規治療法の確立が急務となっている。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、肝細胞癌の病態や性質に基づいた効率の良い新規治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

【移植症例・切除症例を用いた包括的肝細胞癌再発予測診断式の確立】

1. 肝細胞癌移植術後の臨床病理学的検討肝細胞癌・肝移植例と切除症例の移植後臨床検体を用い、臨床病理組織学的検索を行い、肝細胞癌再発の病態の相違点について解析する (BASE-DATA)。retrospective-study は、過去の教室および関連施設よりの切除標本・臨床病理学データに基づき施行する。

2. 肝細胞癌切除・移植標本における網羅的発現検索と epigenetic 変化に関する検討肝細胞癌における切除・移植標本を用いて網羅的発現解析 (トランスクリプトーム解析: 遺伝子、プロテオーム解析: 蛋白、メタボローム解析: 代謝産物) を行い、再発形式を検討する。さらに、臨床的進行度と予後との解析結果をふまえて、上皮間葉系形質転換誘発との関係も指摘されており、E-CAD、N-CAD、VIMENTIN、SNAIL、FIBRINECTIN などの種々の上皮・間葉系マーカーの発現について解析する。また、上皮間葉系形質転換を示した癌細胞は、他の消化器癌においては、癌幹細胞に特有の階層的複製能を有すると考えられている。この点について、肝細胞癌においても、既存治療抵抗性病巣における癌幹細胞様の変化が認められるかについて、CD133、CD13、などの肝癌特異的な癌幹細胞マーカーの発現について確認する。これらの、分子の発現と予後との関係をもとに、独立した予後因子について、臨床病理学的な結果と併せて KEY-Molecule について解析する。

3. 骨髄および血液中における肝癌細胞の検出

4. 肝切除および肝移植における術直前、手術中 (移植においては肝摘出中、無肝期、肝摘出時)、術後に、骨髄 (Disseminated Tumor Cells: DTCs) および末梢血 (Circulating Tumor Cells: CTCs) を採取、われわれが開発した Light Cycler™ による Real Time PCR 法による AFP 発現を指標とした遺伝子診断を行い、肝癌細胞の存在を調べ、その実態を把握する。

5. 骨髄および血液中における転移形成能を有する肝癌細胞の検出

上記の DTCs および CTCs を採取、さらにはトランスクリプトーム解析による遺伝子診断を行い、DTCs/CTCs 特異的表面分子マーカーを同定し、肝細胞癌再発予測診断の可能性について検索する。肝癌細胞の存在を調べ、その実態を把握する。

【肝細胞癌移植後の包括的再発予測診断】

上記の解析結果をもとに、包括的再発予測診断予測式を確立する。

【包括的予測診断式の基礎的解析】

前項の結果に基づく肝細胞癌移植後再発に関与する特異的表面分子に関する基礎的解析を、肝細胞癌細胞株を用いて行う。

1. 包括的肝細胞癌再発予測診断式をもちいた PROSPECTIVE-STUDY

確立した retrospective-study によってえられた再発予測診断式の Validation を prospective に解析する。

2. 肝細胞癌細胞株を用いた至適免疫抑制法の検索

前項の結果に基づく肝細胞癌移植後再発に関与する特異的表面分子について、これらを Key-molecule として、各種免疫抑制剤 (FK506、CyA、RAPA、など) 至適組み合わせとステロイド使用に関する検索を肝癌特異的分子という点より検索する。

4. 研究成果

肝細胞癌に対する肝移植を考える上で移植後再発は重要な問題である。移植後再発をコントロールするために重要なことは、レシピエントの免疫状態のコントロールと肝細胞癌の再発メカニズムの解明である。まず、新たな免疫抑制剤であるリツキシマブの至適濃度を決定し、ABO不適合移植においても適切な免疫コントロールが可能であるか検討した。更にはリツキシマブを用いて実際の肝細胞癌における肝移植において、術後合併症の発生頻度や、再発頻度などを調査した。さらに肝細胞癌の再発メカニズムの解明および治療について検討を行った。教室ではCD13が肝細胞癌における癌幹細胞マーカーの一つであることを報告してきた(J Clin Invest 2010)。癌幹細胞をtargetにした治療は癌再発の予防につながることで予想される。Ubenimexは競合的、可逆的プロテアーゼ阻害剤であり、CD13の機能を阻害することがわかっている。まず2つの肝癌細胞株(Huh7、PLC)を抗癌剤単独と抗癌剤+Ubenimexで治療し、CD13陽性細胞の推移を調べた。抗癌剤のみを投与した群では、癌幹細胞が治療抵抗性のためより多く残存し、治療後CD13陽性細胞の割合が増えたのに対し、Ubenimexを追加した群ではCD13陽性細胞の増加は有意に抑制されていた。さらにUbenimex投与群では、G0/G0期の細胞割合が有意に減少しており、Ubenimexが癌幹細胞をtargetにした治療薬となりうることを示した。またUbenimexによる治療はCD13を直接targetにしているため、免疫低下状態でも効果を発揮する可能性が十分に考えられ、移植後の免疫抑制状態においても有用である可能性が高い。次に、癌幹細胞をtargetにした治療は、癌幹細胞が治療抵抗性の原因である可能性があることから、癌の再発予防につながり、ひいては移植後の肝癌再発予防につながることで期待されると考え、肝細胞癌における癌幹細胞をtargetとした治療法の開発を目指すこととした。また、別の幹細胞マーカーとされるc-Metおよび肝細胞癌に対する代表的治療である肝動脈化学塞栓療法(TACE)に着目した。TACEは、癌細胞を低酸素状態にすることで抗腫瘍効果を示す治療法であるが、施行することで治療に対する反応性が悪くなる場合がある。このような「TACE不応」と呼ばれる治療抵抗性はTACE治療における問題点であるが、その機序は明らかにされていない。今回、TACEによって誘導される環境とc-Metの発現に注目し、c-Met発現状況の解析に基づくTACE不応の機序を解明することを目的とした。実際、術前TACE施行後に肝切除を施行した症例(TACE群)および術前TACEを施行せずに肝切除を施行した症例(非TACE群)における癌部切除標本におけるc-Metの発現を比較し、TACEによる癌部におけるc-Metの発現への影響を検討した。更に、TACE不応病変に対して肝切除を施行した症例の癌部切除標本におけるc-Metの発現も評価した。結果、TACE群においてc-Met高発現を示す症例の割合は61%で、非TACE群(27%)と比較して有意に高かった。TACE不応症例においてc-Met高発現症例の割合は93%であり、非常に高値であった。これらの結果は、TACEによるc-Metの発現誘導がTACE不応の機序の1つである可能性を示唆するものであった。この結果は、c-Metの発現状況を調整することで肝癌の治療抵抗性を克服し、ひいては移植後の肝癌再発予防につながることを示唆するものであり、非常に意義深いと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計14件)

- 1) Matsuura Y, Wada H, Eguchi H, Gotoh K, Kobayashi S, Kinoshita M, Kubo M, Hayashi K, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Noda T, Kawamoto K, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Exosomal miR-155 Derived from Hepatocellular Carcinoma Cells Under Hypoxia Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells. *Dig Dis Sci*. 査読有. 2019;64(3):792-802.
- 2) Marubashi S, Ichihara N, Kakeji Y, Miyata H, Taketomi A, Egawa H, Takada Y, Umeshita K, Seto Y, Gotoh M. "Real-time" risk models of postoperative morbidity and mortality for liver transplants. *Ann Gastroenterol Surg*. 査読有. 2018;3(1):75-95.
- 3) Okumura Y, Noda T, Eguchi H, Sakamoto T, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Kobayashi S, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Hypoxia-Induced PLOD2 is a Key Regulator in Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Biliary Tract Cancer. *Ann Surg Oncol*. 査読有. 2018;25(12):3728-3737.
- 4) Shirabe K, Eguchi S, Okajima H, Hasegawa K, Marubashi S, Umeshita K, Kawasaki S, Yanaga K, Shimada M, Kaido T, Kawagishi N, Taketomi A, Mizuta K, Kokudo N, Uemoto S, Maehara Y; Japanese Liver Transplantation Society. Current Status of Surgical Incisions Used in Donors During Living Related Liver Transplantation-A Nationwide Survey in Japan. *Transplantation*. 査読有. 2018;102(8):1293-1299.
- 5) Kogiso T, Egawa H, Teramukai S, Tani M, Hashimoto E, Tokushige K, Sakisaka S, Sakabayashi S, Yamamoto M, Umeshita K, Uemoto S. Risk factors for recurrence of primary biliary cholangitis after liver transplantation in female patients: A Japanese multicenter retrospective study. *Hepatol Commun*. 査読有. 2017;1(5):394-405.
- 6) Kasahara M, Umeshita K, Sakamoto S, Fukuda A, Furukawa H, Uemoto S. Liver

- transplantation for biliary atresia: a systematic review. *Pediatr Surg Int*. 査読有. 2017;33(12):1289-1295.
- 7) Okumura Y, Noda T, Eguchi H, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Marubashi S, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Short- and Long-term Outcomes of De Novo Liver Transplant Patients Treated With Once-Daily Prolonged-Release Tacrolimus. *Transplant Direct*. 査読有. 2017;3(9):e207.
 - 8) Hyuga S, Wada H, Eguchi H, Otsuru T, Iwagami Y, Yamada D, Noda T, Asaoka T, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Expression of carbonic anhydrase IX is associated with poor prognosis through regulation of the epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 査読有. 2017;51(4):1179-1190.
 - 9) Toshiyama R, Noda T, Eguchi H, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Morii E, Umeshita K, Mori M, Doki Y. Two cases of resectable pancreatic cancer diagnosed by open surgical biopsy after endoscopic ultrasound fine-needle aspiration failed to yield diagnosis: case reports. *Surg Case Rep*. 査読有. 2017;3(1):39.
 - 10) Egawa H, Umeshita K, Uemoto S. Optimal dosage regimen for rituximab in ABO-incompatible living donor liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 査読有. 2017;24(2):89-94.
 - 11) Eguchi S, Furukawa H, Uemoto S, Umeshita K, Imamura H, Soyama A, Shimamura T, Isaji S, Ogura Y, Egawa H, Kawachi S, Kasahara M, Nagano H, Ku Y, Ohdan H, Maehara Y, Sato S, Inomata Y. Outcomes of Living Donor Liver Transplantation Alone for Patients on Maintenance Renal Replacement Therapy in Japan: Results of a Nationwide Survey. *Transplant Direct*. 査読有. 2016;2(6):e74.
 - 12) Yamashita M, Wada H, Eguchi H, Ogawa H, Yamada D, Noda T, Asaoka T, Kawamoto K, Gotoh K, Umeshita K, Doki Y, Mori M. A CD13 inhibitor, ubenimex, synergistically enhances the effects of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 査読有. 2016;49(1):89-98.
 - 13) Umeshita K, Inomata Y, Furukawa H, Kasahara M, Kawasaki S, Kobayashi E, Kokudo N, Sakisaka S, Shimada M, Tanaka E, Uemoto S; Japanese Liver Transplantation Society. Liver transplantation in Japan: Registry by the Japanese Liver Transplantation Society. *Hepatol Res*. 査読有. 2016;46(12):1171-1186.
 - 14) Marubashi S, Nagano H, Eguchi H, Wada H, Asaoka T, Tomimaru Y, Tomokuni A, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Minimum graft size calculated from preoperative recipient status in living donor liver transplantation. *Liver Transpl*. 査読有. 2016;22(5):599-606.

〔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)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。