

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10576

研究課題名(和文) ストレス応答性転写因子による代謝リプログラミングを標的とした肝癌への革新的治療

研究課題名(英文) The roles of Nrf2 on progression in hepatocellular carcinoma

研究代表者

伊藤 心二 (ITO, shinji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90382423

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)：肝細胞癌切除標本を用いてストレス応答性転写因子のNrf2およびその下流のシグナルのNqo1の発現を検討し、肝細胞癌の悪性度と関連し、予後規定因子であることを見出した。Nrf2阻害剤を肝癌細胞株に投与することにより増殖能、遊走能が低下し、Nrf2ノックダウンにおいても同様の結果を確認した。Keap1ノックダウンによりNrf2が活性化され、増殖能、遊走能が亢進することを確認した。

炎症マーカーと肝細胞癌臨床因子との比較を行い、リンパ球/単球比が予後規定因子であることを明らかとなり、このマーカーは腫瘍免疫および癌微小環境と密接に関連していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性癌の一つである肝細胞癌におけるストレス応答シグナルの意義について研究を行い、このシグナルにおける重要なタンパク質であるNrf2およびNqo1が肝細胞癌患者において高発現し、予後因子の一つであることを見出した。細胞を用いた実験においてNrf2タンパクの発現を変化させることにより、細胞の増殖や遊走能が変化することを明らかにした。採血における白血球分画と肝細胞癌症例の臨床因子を比較すると、リンパ球単球比が予後因子であることを見出した。さらにこの比は癌の微小環境と腫瘍免疫と関連することを発見した。これら研究成果により肝細胞癌のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Analysis of stress response proteins expression, p-Nrf2 and Nqo1, in hepatocellular carcinoma (HCC) was performed. These proteins were correlated with tumor factors and worse prognostic factors. In vitro analyses, Nrf2 knock down inhibited cell proliferation and cell migration in HCC cells. Also, Keap1 knock down induced Nrf2 activation and enhanced cell proliferation and cell migration.

Comparison of inflammatory markers with clinical data in patients with HCC revealed that lymphocyte to monocyte ratio (LMR) was an independent prognostic factor, and LMR was closely related to PD-L1 expression and tumor microenvironment.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 代謝リプログラミング Nrf2 Nqo1 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦において肝癌は死亡者数第3位、罹患率第4位を占めている。肝癌に対する治療は肝切除が唯一の根治的治療である。我々は、安全な肝切除を行い(Itoh S, et al. Surg Today. 2012;42:1176-82)、肝癌に対する生体肝移植の有効性を確立した(Shirabe K, et al. Clin Transplant 2011;25:E491-8)。肝機能不良により肝切除不能となることも多く、切除不能症例に対して局所療法、塞栓療法の有効性が確立しているが、治療後の局所再発が問題となり、治療に抵抗性を示すことも少なくない。このような現況を踏まえると肝癌の治療成績の向上のためには肝切除、局所療法、塞栓療法、肝移植に加え、治療後の局所再発を引き起こす分子的性質を解析し、新たな革新的治療法を開発することが急務であると考えられる。

これまで、我々は分子生物学的観点から肝癌の進展について研究を行い、細胞外マトリックスとインテグリンシグナルで重要な役割を担い、最近癌幹細胞との関連も注目されている Focal Adhesion Kinase(FAK)が肝癌の浸潤に関与し、強力な予後因子であることを解明した(Itoh S, et al. Clin Cancer Res. 2004;10:2812-7)。また、アダプター蛋白である Growth factor receptor bound protein 7(Grb7)が肝癌の浸潤に関与し、Grb7 蛋白発現低下により浸潤が抑制されることを解明した(Itoh S, et al. Mol Cancer Res. 2007;5:667-73)。新規治療の探求として多価不飽和脂肪酸を用いた肝癌の基礎的研究もを行い、投与時に発生する酸化ストレスに应答して特定の酸化関連タンパクが上昇することを発見し、タンパク阻害により抗腫瘍効果の増強を認めた(Itoh S, et al. J Clin Biochem Nutr 2010;47:81-90)。細胞は酸化ストレス、代謝ストレス、細菌の感染などの非常事態に应答して種々の洗練された生体防御機構を発動し劣悪な環境をのりこえる。このような生体防御機構の代表的な例 Keap1-Nrf2 制御系である。この機構は酸化ストレス应答反応、代謝経路、自然免疫などに組み込まれており、その制御の不全は腫瘍の増殖をはじめさまざまな疾患に関与し、腫瘍微小環境内での免疫反応にも重要な役割を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では肝癌における Keap1-Nrf2 制御系の分子生物学的解析、腫瘍免疫と腫瘍微小環境との関係について明らかにすることである。

3. 研究の方法

a) 肝細胞癌切除標本を用いて活性化 Nrf2 タンパク発現を免疫組織化学染色を用いて検討を行い、臨床因子との比較検討を行った。

b) 肝癌細胞株を用いて Nrf2 の役割について分子生物学的手法を用いて検討を行った。

c) Nrf2 シグナルの下流の Nqo1 遺伝子発現を、肝細胞癌切除標本を用いて定量的 PCR 法にて検討を行い、臨床因子と比較検討を行った。

d) 肝細胞癌患者における末梢血中の白血球分画と臨床因子を比較し、切除標本を用いた PD-L1、CD8、CD68 発現との関連について検討を行った。

4. 研究成果

a) 活性化 Nrf2 高発現群は低悪性度、脈管浸潤、腫瘍マーカーと有意な関係を認めた。活性化 Nrf2 高発現群は低発現群と比較して肝外転移陽性症例が多かった。

b) 肝癌細胞株に Nrf2 阻害薬を投与することで増殖能、遊走能が抑制され、細胞死が誘導された。肝癌細胞の遊走能は siRNA を用いた Nrf2 抑制により低下され、Keap1 抑制による Nrf2 活性化で亢進した。また、Nrf2 抑制により肝癌細胞株の活性酸素は上昇した。

c) Nqo1 遺伝子発現は活性化 Nrf2 タンパク陽性例で有意に高かった。Nqo1 遺伝子高発現群は腫瘍マーカーと有意な関係を認めた。活性化 Nrf2 陽性かつ Nqo1 遺伝子高発現は独立した予後規定因子であった。

d) リンパ球/単球比が肝細胞癌の独立した予後因子であった。リンパ球/単球比低値群は有意に PD-L1 発現が高値であり、CD8/CD68 比と関連していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Itoh Shinji, Yugawa Kyohei, Shimokawa Masahiro, Yoshiya Shohei, Mano Yohei, Takeishi Kazuki, Toshima Takeo, Maehara Yoshihiko, Mori Masaki, Yoshizumi Tomoharu. Prognostic significance of inflammatory biomarkers in hepatocellular carcinoma following hepatic resection. 査読有、BJS Open 2019; 10.1002/bjs5.50170

Yugawa Kyohei, Itoh Shinji, Kurihara Takeshi, Yoshiya Shohei, Mano Yohei, Takeishi Kazuki, Harada Noboru, Ikegami Toru, Soejima Yuji, Mori Masaki, Yoshizumi Tomoharu. Skeletal muscle mass predicts the prognosis of patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. 査読有、The American Journal of Surgery 2019; 10.1016/j.amjsurg.2019.03.010

Itoh Shinji, Yoshizumi Tomoharu, Sakata Kazuhisa, Motomura Takashi, Mano Yohei, Toshima Takeo, Harimoto Norifumi, Harada Noboru, Ikegami Toru, Soejima Yuji, Kusaba Ryuichi, Kamishima Takahide, Nishie Akihiro, Maehara Yoshihiko. Slow Gait Speed Is a Risk Factor for Complications After Hepatic Resection. 査読有、Journal of Gastrointestinal Surgery 2018; 10.1007/s11605-018-3993-5

Imai Daisuke, Yoshizumi Tomoharu, Okano Shinji, Uchiyama Hideaki, Ikegami Toru, Harimoto Norifumi, Itoh Shinji, Soejima Yuji, Aishima Shinichi, Oda Yoshinao, Maehara Yoshihiko. The prognostic impact of programmed cell death ligand 1 and human leukocyte antigen class I in pancreatic cancer. 査読有、Cancer Medicine 2017;6:1614-1626

〔学会発表〕(計 9 件)

伊藤心二、吉住朋晴、別城悠樹、間野洋平、本村貴志、戸島剛男、原田 昇、池上 徹、副島雄二、前原喜彦．肝細胞癌における PD-L1 発現の生物学的意義に関する研究．第 16 回日本消化器外科学会大会、2018 年 11 月 1 日-3 日、神戸

下川雅弘、吉住朋晴、伊藤心二、坂田一仁、間野洋平、本村貴志、戸島剛男、原田 昇、池上 徹、前原喜彦．肝細胞癌再発における Nqo1 発現の生物学意義に関する研究．第 73 回日本消化器外科学会総会、2018 年 7 月 11-13 日、鹿児島

伊藤心二、吉住朋晴、下川雅弘、間野洋平、本村貴志、戸島剛男、原田 昇、池上 徹、副島雄二、前原喜彦．肝細胞癌における白血球分画を用いた腫瘍免疫に対する評価の新たなバイオマーカー．第 73 回日本消化器外科学会総会、2018 年 7 月 11-13 日、鹿児島

伊藤心二、吉住朋晴、前原喜彦．肝細胞癌における腫瘍免疫を反映する新たなバイオマーカーの探求．第 54 回日本肝臓学会総会、2018 年 6 月 14-15 日、大阪

伊藤心二、吉住朋晴、前原喜彦．肝細胞癌に対する腫瘍免疫と微小環境をターゲットとした新規治療法の探求．第 104 回日本消化器病学会総会、2018 年 4 月 19-21 日、東京

伊藤心二、吉住朋晴、大平将史、本村貴志、間野洋平、戸島剛男、原田 昇、播本憲史、池上 徹、副島雄二、前原喜彦．白血球分画を用いた肝細胞癌に対する新たなバイオマーカーの探求．第 118 回日本外科学会定期学術集会、2018 年 4 月 5-7 日、東京

Shimokawa Masahiro, Yoshizumi Tomoharu, Itoh Shinji, Mano Yohei, Motomura Takashi, Toshima Takeo, Harada Noboru, Ikegami Toru, Soejima Yuji, Maehara Yoshihiko. The clinical and biological significance of Nrf2 as a redox regulator in hepatocellular carcinoma. 第 76 回日本癌学会学術集会、2017 年 9 月 28-30 日、横浜

Itoh Shinji, Yoshizumi Tomoharu, Shimokawa Masahiro, Mano Yohei, Motomura Takashi, Toshima Takeo, Harada Noboru, Harimoto Norifumi, Ikegami Toru, Soejima Yuji, Maehara Yoshihiko. Impact of lymphocyte-to-monocyte ratio on progression in hepatocellular carcinoma associated with PD-L1 expression. 第 76 回日本癌学会学術集会、2017 年 9 月 28-30 日、横浜

Itoh Shinji, Yoshizumi Tomoharu, Shimokawa Masahiro, Mano Yohei, Motomura Takashi, Toshima Takeo, Harada Noboru, Harimoto Norifumi, Ikegami Toru, Soejima Yuji, Maehara Yoshihiko. Lymphocyte-to-monocyte ratio is associated with PD-L1 expression on tumor progression in hepatocellular carcinoma. 第 28 回日本消化器癌発生学会総会/第 9 回国際消化器癌発生会議(国際学会)、2017 年 11 月 17-18 日、熊本

〔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〕

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：調 憲

ローマ字氏名：SHIRABE, ken

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁): 70264025

研究分担者氏名：内山 秀昭

ローマ字氏名：UCHIYAMA, hideaki

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：共同研究員

研究者番号 (8桁): 70380425

研究分担者氏名：吉住 朋晴

ローマ字氏名：YOSHIZUMI, tomoharu

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：准教授

研究者番号 (8桁): 80363373

研究分担者氏名：副島 雄二

ローマ字氏名：SOEJIMA, yuji

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号 (8桁): 30325526

研究分担者氏名：池上 徹

ローマ字氏名：IKEGAMI, toru

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号 (8桁): 80432938

研究分担者氏名：播本 憲史

ローマ字氏名：HARIMOTO, norifumi

所属研究機関名：群馬大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号 (8桁): 00419582

(2)研究協力者

研究協力者氏名：下川雅弘
ローマ字氏名：SHIMOKAWA, masahiro

研究協力者氏名：湯川恭平
ローマ字氏名：YUGAWA, kyohei

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。