

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17015016

研究課題名（和文） 核内受容体蛋白を分子標的とした肝癌化学予防に関する研究

研究課題名（英文） Strategy for the chemoprevention of hepatocellular carcinoma by targeting phosphorylated RXR $\alpha$ 

研究代表者

森脇 久隆 (MORIWAKI HISATAKA)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50174470

研究成果の概要（和文）：本研究において、レチノイド核内受容体 RXR $\alpha$ のリン酸化修飾に伴う機能不全が肝発癌に深く関与していること、また RXR $\alpha$ を分子標的とする非環式レチノイドと、RXR $\alpha$ のリン酸化シグナルを阻害する薬剤を併用することで、肝癌細胞の増殖が相乗的に抑制されることが明らかになった。特に増殖因子受容体や、Ras/MAPK、PI3K/Akt といった細胞内シグナルを target とする薬剤が、非環式レチノイドの腫瘍細胞増殖抑制効果を増強したことは、注目すべき研究結果である。非環式レチノイドに関しては、初発肝癌根治術後再発予防を目的とした第 2/3 相臨床試験のデータ解析が進められており、肝発癌予防薬として臨床応用されることが期待されている。さらに今回の基礎研究で、非環式レチノイドを key compound とした併用肝発癌化学予防の可能性が示唆されたことは、今後、包括的な肝発癌予防および治療を実践していく上で、同剤が重要な役割を担うことをあらためて意味するものである。

研究成果の概要（英文）：A malfunction of RXR $\alpha$  due to phosphorylation by activation of the Ras/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways is profoundly associated with the development of HCC and thus may be a critical target for HCC chemoprevention. A phase II/III trial of acyclic retinoid (ACR), which targets phosphorylated RXR $\alpha$ , to test its effectiveness in preventing second primary HCC in hepatitis C virus-positive patients is currently underway in Japan as a large-scale randomized placebo-controlled trial. In the present study, the combination of ACR plus specific agent, which targets growth factor receptors, the Ras/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways, inhibit the RXR $\alpha$  phosphorylation and it may therefore be a promising strategy to prevent the development of HCC. These findings suggest that the inhibition of RXR $\alpha$  phosphorylation and the restoration of its physiological function as a master regulator for nuclear receptors may be a potentially effective strategy for HCC chemoprevention and treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	16,300,000	0	16,300,000
2006 年度	15,600,000	0	15,600,000
2007 年度	15,600,000	0	15,600,000
2008 年度	15,600,000	0	15,600,000
2009 年度	16,400,000	0	16,400,000
総計	79,500,000	0	79,500,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：核内受容体, 分子標的, 化学予防, 肝臓癌, レチノイド

## 1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患を母地とし高率で発癌する肝癌の予防法（予防薬）の開発は、我が国にとって緊急の課題であるが、そのためには肝発癌のメカニズムを解明しなければならない。近年、癌細胞の特性を規定する特定の分子を標的とし、その機能を制御することで癌の治療をめざす分子標的療法が注目されているが、肝発癌過程においてその鍵を握ると考えられる蛋白・遺伝子の機能・発現異常については、いまだ十分に解明されていない。従ってこれらの分子異常を解明することは、肝発癌研究の break through となるとともに、新規肝発癌予防薬および治療薬の開発に繋がる可能性を含んでいる。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞の分化・増殖・死といった幅広い領域に影響をおよぼす核内受容体の修飾・転写活性の変化が、肝発癌機構において重要な鍵を握っていることを明らかにし、その修飾異常を標的分子とした、肝発癌予防薬を開発することを目的とする。特に現在までの研究成果を踏まえ、肝発癌とレチノイド、およびその核内受容体（レチノイド受容体）との関連に注目した研究を展開し、臨床へ translate する。さらに、肝発癌抑制効果が臨床的に期待されている新規合成レチノイドである非環式レチノイドと他剤を用いた「併用肝発癌化学予防」の可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

### <基礎的研究>

レチノイド核内受容体 RXR $\alpha$  のリン酸化による機能不全が、細胞の脱分化・増殖抑制に及ぼす影響について、リン酸化型・非リン酸化型 RXR $\alpha$  を発現する肝癌細胞株を用いて検討する。特に、リン酸化型 RXR $\alpha$  を発現する ES 細胞を作製し、RXR $\alpha$  の修飾異常が細胞の未分化性維持や形態、レチノイド関連シグナルの異常に及ぼす影響について検討する。

また同時に、RXR $\alpha$  のリン酸化を抑制する薬剤とレチノイドの併用処理による肝発癌抑制効果、すなわち「併用肝発癌化学予防」の可能性について検討する。具体的には、RXR $\alpha$  をリン酸化する増殖因子受容体、Ras/MAPK、PI3K/Akt を標的分子とする薬剤と非環式レチノイドを併用し、相乗的に肝癌細胞の増殖が抑制されるか検討する。また、肝発癌抑制の可能性が臨床の場において期待されているインターフェロンやビタミンK製剤、あるいはヒストン脱アセチル酵素（HDAC）阻害剤や conventional な抗癌剤と非環式レチノイ

ドの併用効果についても、*in vitro*、*in vivo* の系で検討する。

### <臨床介入試験>

初発肝癌根治術後の再発抑制に対する、非環式レチノイドの第2/3相試験を、全国規模多施設（岐阜大学医学部附属病院を含む23施設）で展開する。具体的には、術後3ヶ月の観察期間をおき局所残存再発のないことを確認後、非環式レチノイド（300ないし600mg/日、経口投与）あるいはプラセボを1年間投与する。試験は二重盲検試験で行い、エンドポイント（二次発癌）の中間代理指標として、AFP-L3 や PIVKA2 といった肝癌特異的な血清マーカーの使用の可能性も検討する。

## 4. 研究成果

リン酸化型および非リン酸化型 RXR $\alpha$  mutant を用いた実験で、RXR $\alpha$  がリン酸化修飾を受けることで RAR $\beta$  とのヘテロ二量体形成能を著明に低下させること、すなわち転写調節機能を喪失することが明らかになった。また、リン酸化型 RXR $\alpha$  を ES 細胞に強制発現させると細胞の未分化性の維持（正常分化の抑制）と、RXR/RAR および RXR/PPAR によって制御される標的遺伝子群の発現抑制が観察されることも明らかになった。

また、ヒト肝癌細胞株を非環式レチノイドとビタミン K、受容体型チロシンキナーゼに属する Her2 (erbB2) の monoclonal 抗体である trastuzumab、HDAC 阻害剤である valproic acid でそれぞれ併用処理したところ、相乗的な apoptosis の誘導と、癌細胞の増殖抑制効果が認められることを明らかにした。これらの増殖抑制効果において、RAR $\beta$  や p21 といった標的遺伝子の発現誘導や、Ras/MAPK および PI3K/Akt の活性化（リン酸化）と RXR $\alpha$  のリン酸化の抑制が重要であることも確認された。レチノイドを key compound とし、RXR $\alpha$  のリン酸化修飾の解除と、その機能回復による腫瘍細胞の増殖抑制効果は、大腸癌細胞株（レチノイドと PPAR $\gamma$  アゴニスト）、膵臓癌細胞株（レチノイドと gemcitabine）においても認められたことより、RXR $\alpha$  を中心とした核内受容体 network の機能を複合的に回復することで、肝癌のみならず様々な臓器における発癌が予防および治療できる可能性が示唆された。また、非環式レチノイドの新しい抗腫瘍メカニズムとして、同剤が MAPK/ERK を阻害し、血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）の活性を抑制することで、血管増生を制御する作用を有することも明らかになった。肝癌進展には血管増生（新生）が強く関与していることより、この研究結果は、非環式レチノイドが肝発癌予防薬（治療薬）として大きな

可能性を持つことをあらためて証明するものと考えられた。

最後に、非環式レチノイドを用いた初発肝癌根治術後再発予防を目的とした第2/3相臨床試験については、平成22年3月現在、データの解析が進められており、その結果が期待されている。

#### 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19件)

- ① Komi Y, Moriwaki H, Kojima S (他4名). Acyclic retinoid inhibits angiogenesis by suppressing the MAPK pathway. Lab Invest, 査読有, 90, 2010, 52-60
- ② Tatebe H, Shimizu M, Moriwaki H (他4名). Acyclic retinoid synergises with valproic acid to inhibit growth in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Lett, 査読有, 285, 2009, 210-217
- ③ Nakagawa T, Shimizu M, Moriwaki H (他4名). Synergistic effects of acyclic retinoid and gemcitabine on growth inhibition in pancreatic cancer cells. Cancer Lett, 査読有, 273, 2009, 250-256
- ④ Shimizu M, Moriwaki H (他6名). EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor (IGF) / IGF-1 receptor axis in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Lett, 査読有, 262, 2008, 10-18
- ⑤ Shimizu M, Moriwaki H (他6名). (-)-Epigallocatechin gallate suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. Cancer Prev Res, 査読有, 1, 2008, 298-304
- ⑥ Shimizu M, Moriwaki H. Synergistic effects of PPARgamma ligands and retinoids in cancer treatment. PPAR Res, 査読有, 2008, 2008, 181047
- ⑦ Shimizu M, Moriwaki H (他7名). Green tea extracts for the prevention of metachronous colorectal adenomas: a pilot study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 査読有, 17, 2008, 3020-3025
- ⑧ Kanemura N, Shimizu M, Moriwaki H (他3名). Retinoid X receptor alpha is highly phosphorylated in retinoic acid-resistant HL-60R cells and the combination of 9-cis retinoic acid plus MEK inhibitor induces apoptosis in the cells. Leuk Res, 査読有, 32, 2008, 884-892
- ⑨ Tatebe H, Shimizu M, Moriwaki H (他2名). Synergistic growth inhibition by 9-cis-retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells. Clin Cancer Res, 査読有, 14, 2008, 2806-2812
- ⑩ Yoshimura K, Shimizu M, Kojima S, Okano Y, Moriwaki H (他5名). Phosphorylated retinoid X receptor alpha loses its heterodimeric activity with retinoic acid receptor beta. Cancer Sci, 査読有, 2007, 98, 1868-1874
- ⑪ Moriwaki H, Shimizu M (他2名). Chemoprevention of liver carcinogenesis with retinoids: Basic and clinical aspects. Hepatol Res, 査読有, 37, 2007, S299-S302
- ⑫ Yamazaki K, Shimizu M, Kojima S, Moriwaki H (他6名). Synergistic effects of RXR alpha and PPAR gamma ligands to inhibit growth in human colon cancer cells--phosphorylated RXR alpha is a critical target for colon cancer management. Gut, 査読有, 56, 2007, 1557-1563
- ⑬ Kanamori T, Shimizu M, Kojima S, Moriwaki H (他3名). Synergistic Growth Inhibition by Acyclic Retinoid and Vitamin K2 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. Cancer Sci, 査読有, 98, 2007, 431-437
- ⑭ Muto Y, Moriwaki H, Nishiguchi S (他9名). Overweight and obesity increase the risk for liver cancer in patients with liver cirrhosis and long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules inhibits liver carcinogenesis in heavier patients with liver cirrhosis. Hepatol Res, 査読有, 35, 2006, 204-214
- ⑮ Suzui M, Moriwaki H (他3名). Acyclic retinoid, a novel synthetic retinoid, induces growth inhibition, apoptosis, and changes in mRNA expression of cell cycle and differentiation-related molecules in human colon carcinoma cells. Int J Oncol, 査読有, 28, 2006, 1193-1199
- ⑯ Lim JT, Shimizu M (他4名). Sulindac sulfide and exisulind inhibit expression of the estrogen and progesterone receptors in human breast cancer cells. Clin Cancer Res, 査読有, 12, 2006, 3478-3484
- ⑰ Einbond LS, Shimizu M (他7名). Actein and a fraction of black cohosh potentiate antiproliferative effects of chemotherapy agents on human breast

cancer cells. *Planta Med*, 査読有, 72, 2006, 1200-1206

- ⑱ Takai K, Moriwaki H (他 7 名). Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patients with hepatocellular carcinoma. *Intervirology*, 査読有, 48, 2005, 39-45
- ⑲ Sano T, Kojima S, Moriwaki H, Tanaka T (他 11 名). Prevention of rat hepatocarcinogenesis by acyclic retinoid is accompanied by reduction in emergence of both TNF- $\alpha$ -expressing oval-like cells and activated hepatic stellate cells. *Nutr Cancer*, 査読有, 51, 2005, 197-206

[学会発表] (計 8 件)

- ① 森脇久隆. シンポジウム 肝がん予防の総合戦略と化学予防. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008 年 10 月 29 日. 名古屋
- ② 清水雅仁, 森脇久隆. シンポジウム 6 「肝癌の分子標的治療」 Retinoid 核内受容体 RXR $\alpha$  を標的分子とした Acyclic retinoid による肝癌化学予防. JDDW2008. 2008 年 10 月 1 日. 東京
- ③ 建部英春, 清水雅仁, 森脇久隆. レチノイドと Trastuzumab の併用処理による相乗的な肝癌細胞増殖抑制効果の検討. 第 44 回日本肝臓学会総会. 2008 年 6 月 5 日. 松山
- ④ 清水雅仁, 森脇久隆. パネルディスカッション 8 「肝癌再発進展阻止を目指して」レチノイド核内受容体 RXR $\alpha$  を標的分子とした肝細胞癌化学予防-非環式レチノイドと clonal deletion-. 第 94 回日本消化器病学会総会. 2008 年 5 月 9 日. 福岡
- ⑤ Tatebe H, Shimizu M, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition by 9-cis-retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells. 99<sup>th</sup> AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting. 2008 年 4 月 15 日. アメリカ
- ⑥ Shimizu M. Strategy and mechanism for the prevention of hepatocellular carcinoma (HCC)-Phosphorylated RXR $\alpha$  might be a critical target for HCC chemoprevention-. The 8th Japan-Korea Cancer and Ageing Symposium. 2007 年 8 月 11 日. 岐阜
- ⑦ Tatebe H, Shimizu M, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition by 9-cis-retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells. The 8th Japan-Korea Cancer and Ageing Symposium. 2007 年 8 月 11 日. 岐阜
- ⑧ 金森 堂, 清水雅仁, 森脇久隆. ワーク

ショップ 5 「肝細胞癌根治療法後の再発抑制」非環式レチノイドとビタミン K2 の併用処理による相乗的な肝癌細胞増殖抑制効果の検討. 第 93 回日本消化器病学会総会. 2007 年 4 月 21 日. 青森

[図書] (計 2 件)

- ① 森脇久隆. 改訂第 2 版 認定 病態栄養専門師のための病態栄養ガイドブック. メディカルレビュー社. 2008, 356.
- ② 清水雅仁, 森脇久隆. 医学書院肝硬変のマネジメント. 2007, 321:84-86

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
森脇 久隆 (MORIWAKI HISATAKA)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 50174470

(2) 研究分担者  
岡野 幸雄 (OKANO YUKIO)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 10177066  
田中 卓司 (TANAKA TAKUJI)  
金沢医科大学・医学部  
研究者番号: 40126743  
小嶋 聡一 (KOJIMA SOUICHI)  
理化学研究所・分子細胞病態学ユニット・研究ユニットリーダー  
研究者番号: 10202061  
西口 修平 (NISHIGUCHI SHUHEI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10192246  
清水 雅仁 (SHIMIZU MASAHIITO)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 90402198