

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15943

研究課題名(和文) 肝臓におけるCTGFの意義の解明と新規治療の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the significance of CTGF in liver cancer for the development of novel therapy

研究代表者

牧野 祐紀 (Yuki, Makino)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60771334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌切除検体において、癌部では非癌部に比しCTGFが高発現しており、CTGFの発現量は肝細胞癌の悪性度に関連していた。

Kras変異肝発癌モデルマウスにおいても癌部でCTGFの発現上昇を認め、同マウスにおいてCTGFを欠損させると肝臓の増大進展が抑制された。

さらに細胞株を用いた検討において、CTGFは肝臓間質に存在する肝星細胞と肝癌細胞の腫瘍間質反応に関与して肝臓に促進的に作用していることが明らかとなった。CTGFを介した腫瘍間質反応はCTGFに対する中和抗体により阻害可能であり、CTGF中和抗体が肝臓に対する新規薬剤に成り得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌は本邦における癌による死亡の第5位を占める難治癌である。薬物療法は肝細胞癌の治療選択肢の一つであるが、現在本邦において使用可能な薬剤の有効性は十分とはいえず、新規薬剤の登場が望まれている。

本研究課題により、CTGFに対する中和抗体が肝臓細胞と肝星細胞の腫瘍間質反応を阻害する作用を有することが明らかとなり、肝細胞癌に対する新規薬剤に成り得ることが示された。CTGF中和抗体は膀胱癌に対して既に臨床試験が行われており、今後肝臓に対しても臨床応用が進められることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In surgically resected hepatocellular carcinoma (HCC) samples, CTGF was up-regulated in tumorous tissues compared with non-tumorous liver tissues. CTGF expression levels were correlated with the malignant grade of HCC.

CTGF was also overexpressed in liver tumors in Kras-mutated HCC model mice. In these mice, CTGF deletion attenuated tumor development.

Cell culture experiments revealed that CTGF mediates tumor-stroma interactions between HCC cells and hepatic stellate cells to promote HCC progression. CTGF-mediated tumor-stroma interaction could be inhibited by an anti-CTGF neutralizing antibody treatment. Therefore, an anti-CTGF neutralizing antibody was shown to be a novel therapeutic agent for HCC.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 CTGF 肝星細胞 腫瘍間質反応 抗体療法

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 (hepatocellular carcinoma; HCC) は本邦における癌の死亡者数の第 5 位を占める難治癌である。HCC に対して手術や穿刺局所療法、カテーテル治療、薬物療法等が行われている。薬物療法としてマルチキナーゼ阻害薬が使用されているが、その治療効果は十分ではなく、新規薬剤の登場が望まれている。

結合組織増殖因子 (connective tissue growth factor; CTGF) は種々の細胞から産生される細胞外マトリックスタンパクの一種であり、細胞レベル・組織レベルで多くの生物学的作用を發揮する分子であることが知られている (図 1)。CTGF は一部の癌との関連も報告されているが、肝癌における役割は十分に解明されていない。一方で CTGF は種々の臓器の線維化に関与する分子であることがよく知られてきた。

申請者はこれまでの検討において、総胆管結紮術 (Bile Duct Ligation; BDL) による線維化刺激を行ったマウスにおいて、CTGF を欠損させると肝線維化が軽減することを見出し、CTGF が肝線維化に促進的に作用することを明らかにしている。肝線維化は主に肝星細胞 (hepatic stellate cells) により誘導されるが、申請者は CTGF の刺激により肝星細胞の活性化が生じることを見出し、CTGF が肝星細胞に作用して肝線維化を促進していることが示唆される。

肝星細胞は肝臓におけるコラーゲンの主要な産生源であり、肝線維化形成における中心的存在であるが、 $\alpha$ SMA 陽性細胞として肝癌組織中にも存在していることが知られている (Coulouarn C, et al. J Hepatol. 2014 ほか)。しかしながら、肝癌における肝星細胞の役割についてはこれまで十分に解明されていない。

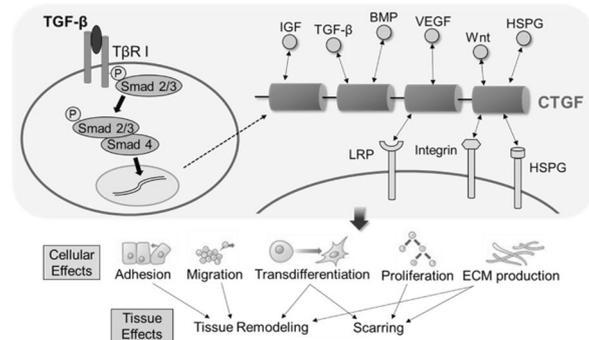


図 1 結合組織増殖因子 (Connective tissue growth factor; CTGF)

## 2. 研究の目的

申請者は CTGF が肝癌組織中の肝星細胞を刺激することにより、肝癌の病態形成に何らかの影響を与えている可能性を考えた。そこで本研究課題は、HCC における CTGF の意義について、肝星細胞との関連に着目して検討することを目的とした。さらに CTGF の新規治療標的分子としての可能性について検討し、新規薬剤の開発へと繋げることを目的とした。

## 3. 研究の方法

HCC 切除検体 93 例を用いて、臨床検体における CTGF の発現とその臨床的意義について検討した。

肝細胞特異的 Kras 変異肝発癌モデルマウス (Alb-Cre LSL-Kras<sup>G12D</sup>; Kras<sup>G12D</sup> マウス) において CTGF の発現について検討した。さらに Kras<sup>G12D</sup> マウスにおいて肝細胞特異的に CTGF を欠損させた (Alb-Cre LSL-Kras<sup>G12D</sup> CTGF<sup>fl/fl</sup>)。

肝癌細胞株として HepG2 細胞、PLC/PRF/5 細胞を用いた。また肝星細胞株として LX-2 細胞を用いた。

## 4. 研究成果

ヒト HCC 切除検体において、癌部では非癌部に比し CTGF の発現が上昇しており、特に癌細胞において強い発現を認めた。また癌部において CTGF を高発現する症例は血中 PIVKA-II 値、腫瘍個数、腫瘍肉眼型、門脈浸潤陽性率が高く、CTGF の発現量が HCC の病態進展・悪性度に関連していることが明らかとなった。また HCC の組織中には多数の  $\alpha$ SMA 陽性肝星細胞が存在しており (図 2)、CTGF を高発現する肝癌は  $\alpha$ SMA も高発現していた。

Kras<sup>G12D</sup> マウスにおいても、肝癌組織では非癌部肝組織に比し CTGF を高発現しており、特に癌細胞において強い発現を認めた。また臨床検体と同様に、肝癌組織中には  $\alpha$ SMA 陽性肝星細胞が存在しており (図 2)、肝癌組織中において CTGF の発現量は  $\alpha$ SMA の発現量と正の相関を認めた。

次に Kras<sup>G12D</sup> マウスにおいて肝 (癌) 細胞特異的に CTGF を欠損させた (Alb-Cre LSL-Kras<sup>G12D</sup> CTGF<sup>fl/fl</sup>)。その結果、CTGF の欠損により腫瘍径、腫瘍個数、肝重量体重比が減少し、肝癌の増大進展が抑制された (図 3)。肝癌組織中においては  $\alpha$ SMA 陽性細胞が減少するととも

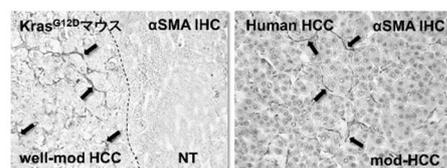


図 2 肝癌組織中の  $\alpha$ SMA 陽性肝星細胞

に、PCNA 陽性肝癌細胞数が減少した。これらの結果から、肝癌細胞から産生される CTGF は肝癌組織中の肝星細胞の活性化および肝癌の増大進展を促進していることが示唆された。

各種肝癌細胞株において CTGF の発現量を比較すると、HepG2 細胞が最も高発現であり、PLC/PRF/5 細胞が最も低発現であった。HepG2 に対して CTGF の阻害実験を行っても、細胞増殖に変化は認めなかった。PLC/PRF/5 細胞に対して CTGF を強制発現させても、細胞増殖に変化は認めなかった。次に HepG2 および PLC/PRF/5 を肝星細胞株 LX-2 と共培養すると、単独培養時に比し HepG2 では細胞増殖が亢進したが、PLC/PRF/5 では変化しなかった。HepG2 と LX-2 の共培養下において CTGF の中和抗体を作用させると、LX-2 との共培養による HepG2 の増殖促進作用は消失した。一方、CTGF を強制発現させた PLC/PRF/5 は、LX-2 と共培養すると細胞増殖が亢進した。これらの結果は HepG2 と LX-2、および PLC/PRF/5 と LX-2 の単独接種/共接種による xenograft モデルにおいても同様であった。

LX-2 との共培養により HepG2 の p-STAT3 の発現が上昇した。そこで次に各細胞について、p-STAT3 の上流分子である IL-6 の分泌能について検討したところ、HepG2 は IL-6 を分泌しておらず、LX-2 のみが分泌していたが、HepG2 との共培養により LX-2 から IL-6 の分泌が亢進した。LX-2 の IL-6 の発現を siRNA により抑制すると、HepG2 と共培養しても HepG2 の p-STAT3 の発現上昇・増殖促進は認められず、LX-2 の産生する IL-6 が HepG2 の細胞増殖を促進していることが示唆された。LX-2 に対し CTGF のリコンビナントタンパクを添加すると、IL-6 の分泌は増加した。さらに HepG2 と LX-2 の共培養下において CTGF 中和抗体を作用させると、LX-2 からの IL-6 の分泌は減少し、HepG2 の p-STAT3 の発現も低下した。

以上の結果から、HCC において CTGF 主に肝癌細胞に強く発現しており、肝星細胞を活性化させ、IL-6 の分泌を促して肝癌細胞の増殖を促進していることが明らかとなった(図4)。これまで肝星細胞は肝線維化を促進する細胞として知られてきたが、HCC の増大進展に対しても促進的に作用していることが示され、その分子機構の一端が明らかとなった。そのため本研究課題で得られた知見は大きな学術的意義を有すると考えられる。

また CTGF を介した肝癌細胞と肝星細胞の腫瘍間質反応は CTGF 中和抗体により阻害可能であり、CTGF 中和抗体が HCC に対する新規薬剤になり得ることが示唆されたため、臨床的意義も大きい。本研究課題で用いた CTGF 中和抗体は肝癌に対して既に臨床試験が行われている薬剤であり、今後 HCC に対しても臨床応用が進められることが期待される。

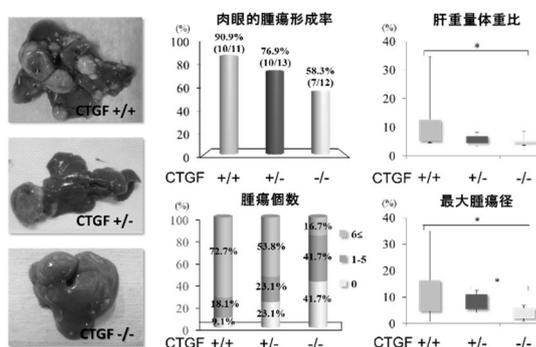


図3 CTGFの欠損による肝癌抑制効果 \**p*<0.05

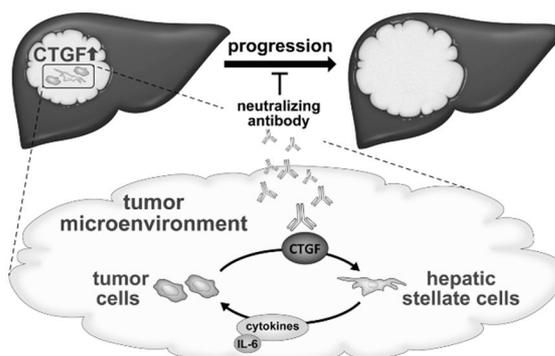


図4 CTGFを介した肝癌細胞と肝星細胞の腫瘍間質反応

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Makino Y, Hikita H, Kodama T, Shigekawa M, Yamada R, Sakamori R, Eguchi H, Morii E, Yokoi H, Mukoyama M, Hiroshi S, Tatsumi T, Takehara T. CTGF Mediates Tumor-Stroma Interactions between Hepatoma Cells and Hepatic Stellate Cells to Accelerate HCC Progression. *Cancer Research* 78(17), 4902-4914, 2018 (査読有) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3844.

〔学会発表〕(計6件)

1. Yuki Makino, Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Minoru Shigekawa, Yugo Kai, Yasutoshi Nozaki, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. Connective tissue growth factor (CTGF) induces IL-6 production from hepatic stellate cells and promotes the progression of hepatocellular carcinoma. American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Liver Meeting, 2018.11.12, San Francisco, USA

2. 牧野祐紀、疋田隼人、竹原徹郎 CTGF による肝癌細胞と肝星細胞の腫瘍間質反応と肝癌の増大進展 第 54 回日本肝癌研究会 ワークショップ 2「肝癌と微小環境の相互作用」 2018 年 6 月 28 日 久留米
3. 牧野祐紀、疋田隼人、竹原徹郎 肝線維化および肝癌進展における CTGF の意義とバイオマーカー・治療標的としての可能性 第 54 回日本肝臓学会総会 2018 年 6 月 14 日 大阪
4. Yuki Makino, Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Minoru Shigekawa, Yugo Kai, Yasutoshi Nozaki, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara Promoting effect of connective tissue growth factor (CTGF) in hepatocellular carcinoma via the interaction with hepatic stellate cells and potential of anti-CTGF neutralizing antibody therapy. American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Liver Meeting, 2017.10.23, Washington DC, USA
5. 牧野祐紀、疋田隼人、竹原徹郎 肝癌に対する CTGF を標的とした抗体療法の可能性 第 21 回日本肝臓学会大会 ワークショップ 22「高度進行肝細胞癌の病態と治療」 2017 年 10 月 14 日 福岡
6. 牧野祐紀、小玉尚宏、竹原徹郎 肝線維化および肝癌進展抑制を目指した CTGF を標的とする新規治療の可能性 第 53 回日本肝臓学会総会 ワークショップ 10「肝硬変のトータルケア・マネジメント」2017 年 6 月 9 日 広島

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

研究代表者

牧野 祐紀 (MAKINO YUKI)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60771334

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。