

令和元年6月26日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16562

研究課題名(和文)肝発癌を促進する微小環境制御による革新的な癌治療法の開発・研究

研究課題名(英文)The novel anti-cancer therapy by suppression of cancer microenvironment that promotes hepatocarcinogenesis

研究代表者

本村 貴志(MOTOMURA, takashi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50719507

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)：肝組織の癌部・非癌部からの線維芽細胞(cancer-associated fibroblast(CAF)とnormal fibroblast(NF))の単離を行った。CAFのエクソソームと肝癌細胞株を共培養すると、有意に浸潤能が高いことを示した。CAF由来エクソソーム内ではmiRNA150-3pの発現が有意に低下しており、miRNA150-3pを強制発現させた肝癌細胞株は有意に浸潤能が高くなった。miRNA150-3pの負の標的遺伝子をCDH2と特定し、CDH2をノックダウンした肝癌細胞株では有意に浸潤能が低下した。肝癌切除症例でCDH2高発現群で無再発生存率、全生存率ともに有意に予後不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌の再発には炎症性癌微小環境が大きく関わっていることが明らかになっている。また肝・脾におけるマクロファージのphenotypeの相違が肝線維化に関わっているとも考えられている。これら組織間のマクロファージや肝線維芽細胞、肝細胞との関係と各種サイトカインを詳細に検討することで、成因を超えた肝線維化と肝発癌の抑制につながる可能性が高く、かつそうした創薬はこれまでになく我が国独創的である。さらに癌微小環境は各癌腫でも注目されており、今回の検討が臓器を超えた普遍的な癌治療に結びつく可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast was isolated from cancer- and non-cancerous tissue of human resected liver, and defined as cancer-associated fibroblast(CAF) and normal fibroblast(NF), respectively. Hepatoma cell line when co-cultured with exosome derived from CAF showed higher invasion. In the exosome from CAF, miR150-3p was significantly lower compared with NF. Over expression of miR150-3p showed higher invasive capacity of hepatoma cell line. Using the database, the negative target gene of miR150-3p was identified: CDH2. Knockdown of CDH2 in hepatoma cell line showed decreased invasive capacity. Immunohistochemical stain was done. Among patients who underwent hepatectomy for hepatocellular carcinoma, overall- and recurrence free survival rate was significantly worse in high CDH2 group.

研究分野：肝胆膵領域悪性腫瘍

キーワード：肝癌微小環境 癌関連マクロファージ 癌関連線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肝癌罹患患者数は世界で78万人と全癌腫で第6位となっており、かつ死亡数に至っては74万人に達し第2位である。我が国においても死亡数は3万人を超え第5位となっており、重大な医療負担の1つである。肝癌の原因の7割はウイルス性肝炎とされており、感染の制御が肝癌対策の第一であることに疑いはない。近年抗ウイルス療法の進歩には目を見張るものがあり、インターフェロンに頼らない抗ウイルス薬(DAAs; Direct acting agents)の組み合わせでC型肝炎は制圧されつつある。実際にC型肝炎に起因する肝癌新規発生者は漸減傾向にあるが、しかし肝癌全体では横ばいで、近年のメタボリック症候群に関連する脂肪性肝炎・肝硬変症例の増加が注目されている。また前述の抗ウイルス療法も高齢者や肝硬変症例には適応がなく、B型肝炎やアルコール性肝硬変、自己免疫性肝疾患などによる肝癌発癌に対し、有効な手段は皆無である(H27年度 肝がん白書)。

一方、最近腫瘍関連マクロファージ(TAM; tumor associated macrophage)の発現が様々な悪性腫瘍の予後不良因子であるとする報告が相次いでいる。我々もこれまで肝移植後の肝がん再発にこのTAMが大きく関与していることを報告してきた。(Motomura T et al. J Hepatol 2013)。TAMはCD163などM2マクロファージで見られる表面マーカーを発現しており、M2マクロファージの性質をもつと考えられている。経門脈的に肝へ浸入した脾マクロファージがM1からM2へと形質転換し、肝線維化や腫瘍増殖に好都合な微小環境の形成に関与している可能性があるが、その機序の詳細は一切不明である。

## 2. 研究の目的

癌微小環境と炎症性サイトカインには強く関連があると考えられているが、そもそもそのTAMがどこから浸潤してきてどのように形質転換するのかが不明な点である。そこで、摘出脾臓及び肝臓からもマクロファージ及びfibroblastを単離し、肝がん細胞との共培養の中で発現する分子を検討し、肝由来マクロファージとの比較も行いながら、fibroblastの活性化と肝線維化、及び肝がん微小環境がどのように形成されていくかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

摘出された脾臓組織から濃度勾配遠心分離を用いて単核球を単離し肝癌細胞株と共培養する。これら単離した単核球の中には主にNK cell、NKT cell、Macrophage、Monocyte、Fibroblastが存在しNK cell、NKT cellが肝癌への攻撃の中心的な役割を担っていると考えられる。Magnetic Activated Cell Sorting(MACS)を用いて各々Macrophageとfibroblastを除去し肝癌細胞株と共培養することでそれぞれが癌微小環境にどのように寄与するかを調べる。

肝細胞癌患者(6検者)の癌部・非癌部より線維芽細胞を分離・培養し、培養液中のエクソソームを抽出する。抽出されたエクソソーム添加による、肝癌細胞株(Huh7, Hep3B)における増殖・浸潤・EMTの変化を比較する。そこで得られたエクソソームをアレイ解析を用いて発現変化のあるmiRNAを検索する。肝癌患者の血清中に含まれるエクソソームを抽出し、得られたmiRNAが健常人の血清中のエクソソームと比較して増減の有無を確認する。

## 4. 研究成果

肝移植症例の摘出した肝臓及び脾臓からマクロファージと線維芽細胞の単離、また担癌肝臓の癌部・非癌部からの線維芽細胞(cancer-associated fibroblast(CAF)とnormal fibroblast(NF))の単離を行ってきた。またCAFのエクソソームにも注目し、遠心法にてエクソソームを抽出し、肝癌細胞株と共培養してmigration assayしたところ、CAF由来エクソソームで有意に浸潤能が高いことを示した。

今回肝癌切除後の臨床データから、肝切除後に脾臓容量が大きいと再発が多く、脾摘症例では再発が少ないことを報告した。そこで脾臓由来のマクロファージと線維芽細胞、抗腫瘍免疫で特に重要なNK細胞に注目した。肝癌症例の脾臓から線維芽細胞と単球を分離し、さらにNK細胞とマクロファージを単離した。これらと肝癌細胞株を共培養したところ、マクロファージを除くと肝癌増殖能が抑制され、線維芽細胞を除くと増殖能が増

加することがわかった。このことから脾臓由来マクロファージは抗腫瘍免疫に関わるが、線維芽細胞は腫瘍増殖に与ることが考えられた。

CAF 及び NF 由来エクソソーム内の miRNA をマイクロアレイにかけたところ miRNA150-3p の発現が CAF で有意に低下しており、miRNA150-3p を強制発現、または強制発現させた CAF と共培養させた肝癌細胞株は有意に浸潤能が高くなった。miRNA150-3p の負の標的遺伝子をデータベースから CDH2 と特定し、CDH をノックダウンした肝癌細胞株では有意に浸潤能が低下した。実際の肝癌切除症例のパラフィン包埋ブロックで免疫組織染色を行うと、CDH 高発現群で無再発生存率、全生存率ともに有意に予後不良であった。

## 5 . 主な発表論文等

〔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)

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

(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。