

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15833

研究課題名(和文) 肝がんの再発・転移におけるMYCN陽性肝がん細胞由来エクソソームの役割の解明

研究課題名(英文) Role of circulating MYCN in recurrence and/or metastasis of hepatocellular carcinoma as a biomarker and/or regulator

研究代表者

Qin XianYang (QIN, Xian-Yang)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員

研究者番号：60756815

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)：MYCNを標的とした創薬研究と新規肝がんバイオマーカーとして有用性の評価を行った。1) 網羅的オミクス解析により、MYCN高発現肝がん細胞では不飽和脂肪酸の代謝が亢進し、その増殖は不飽和酵素阻害剤により特異的に抑制された。2) 日本、台湾およびヨーロッパのコホート研究では、MYCNの発現は、非がん部より肝がん組織において有意に高い、術後の肝がん再発率との正の相関がみられた。2) 血清中エクソソームにMYCNタンパク質発現が検出できた。肝がん患者の血清中MYCN量は健常人に比べ有意に高い、外科切除後に有意に減少した。MYCNは、新規肝がんバイオマーカー並びに創薬標的として有用であることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療技術の進歩により、がん全体の死亡率が低下しつつある中、肝がんは逆に死亡率が増加しているがんの1つである。日本において、肝がんの年間罹患数が約40,000人であるのに対し、年度死亡数は約30,000人であり、極めて死亡率の高いがんである(Hori et al. Jpn J Clin Oncol 2015)。本研究の成果とした血中MYCNを指標とした肝がんの診断や予後・薬効予測バイオマーカーを活用し、患者さんの予後の改善につながることを願っている。

研究成果の概要(英文)：Previous genome-wide transcriptome screen identified that MYCN expression marked an EpCAM+ cancer stem cell (CSC)-like subpopulation and was a candidate therapeutic target for the prevention of hepatocellular carcinoma (HCC). By the combination of LC-TOFMS-based metabolome analysis and RNA-seq-based transcriptome analysis, I found that the content of unsaturated fatty acids was increased in MYCN high expression CSC-like HCC cells and inhibition of lipid desaturation suppressed MYCN gene expression and cell/sphere proliferation of HCC cells. In addition, I succeeded in quantitatively measuring MYCN protein levels in both human serum and the isolated exosome samples. I found that serum protein levels of MYCN expression were significantly higher in HCC patients than that in healthy controls, and were significantly decreased after surgical resection of tumors. These findings suggested MYCN might server as a therapeutic target and novel biomarker for HCC.

研究分野：消化器内科学

キーワード：MYCN 肝がん バイオマーカー 代謝 脂質 がん幹細胞 オミクス解析 エクソソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における肝がんの年間死亡者数は約 34,000 人に上り、ステージ I であっても 5 年生存率は 70~80% と極めて予後不良である。通常のリンパ節転移とは違って、肝臓に通っている太い血管によって、肝がんでは「肝内転移」が多く見られ、転移しやすいがんである。がんは沢山の遺伝子の構造的あるいは機能的変異が蓄積した結果として発症する複雑な疾患であり、その病態は著しい個人差がある。また、同じがんであっても同じ治療法を適用することが必ずしも正しくないことは以前より知られてきた。個々の肝がん患者において、肝発がんのリスクおよび抗がん剤の治療効果を予測してから最適な予防・治療計画を行う治療法（いわば「個別化医療」）の開発は、肝がんなどの難治性がんの克服につながる有意義なものだと考えている。非環式レチノイド（ペレチノイン；NIK333）は、肝がん発症に伴う肝ビタミン A 減少を補う目的で細胞内レチノイン酸結合タンパク質 CRABP に対する高親和性を指標としたスクリーニングから得られ、1981 年に当時岐阜大学の武藤泰敏教授により報告されたビタミン A 類縁体の 1 つである。元々栄養補助という目的で肝がん根治治療を受けた患者に投与するとその後の肝がんの再発を強く抑制した（Muto et al. NEJM 1999）。一般的な創薬研究とは全く逆で、先に臨床で効果が示され、その分子機構は不明のままであった。その後日本発・世界初の肝がん再発予防薬としてこれまでに 3 回第 II/III 相臨床試験が実施されたが、未だ承認には至っていない。その理由の 1 つとしてノンレスポンス（不応答者）の存在が想定される。

2. 研究の目的

申請者は、NIK333 をケミカルプローブとして、網羅的なトランスクリプトーム解析を行い、NIK333 のがん特異的標的遺伝子を同定した。その結果、がん遺伝子 MYCN は、正常肝細胞株では転写されず、未分化肝がん幹細胞（CSC）を多く含む肝がん細胞株でのみ高い転写を受けており、その転写は NIK333 処理によって強く抑制される標的マーカーであることを見出した。さらに、MYCN と肝 CSC マーカーとの関連が確認され、MYCN 高発現肝 CSC は NIK333 処理によって特異的に排除された（Qin et al. PNAS 2018）。それに基づいて本研究では、MYCN 高発現肝がん細胞に着目し、1) MYCN 過剰発現の分子機構解明及びそれに基づいた治療法の開発、2) 新規肝がん診断・予後予測バイオマーカーとしての有用性の検討を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脂質代謝を標的とした MYCN 高発現肝がん細胞の増殖制御

FACS 法により EpCAM 陽性と陰性の肝がん細胞を単離した。nLC-MS/MS を用いたプロテオーム解析、LC-TOFMS を用いたメタボローム解析及び RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析によりタンパク質/脂溶性代謝物質/遺伝子のプロファイルを比較した。IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いてパスウェイ解析を行った。Loss of Function 実験は、siRNA/shRNA や化学阻害剤を用いて行った。

(2) 肝がんの診断と予後予測における組織中・血中 MYCN 発現の臨床的意義

超遠心や miRCURY Exosome Kits を用いて血清中エクソソームを抽出した。ELISA を用いて血中 MYCN のタンパク質発現を定量した。PCR を用いて組織中 MYCN の遺伝子発現を定量した。

4. 研究成果

(1) 脂質代謝を標的とした MYCN 高発現肝がん細胞の増殖制御

プロテオーム解析では、脂質代謝に関するパスウェイは EpCAM 陽性肝 CSC との関与が分かった。具体的に、グルコース代謝酵素の変化が少ないに対し、脂肪酸不飽和化酵素 SCD1 の発現が EpCAM 陽性肝 CSC で有意に亢進した。メタボローム解析では、オレイン酸などの不飽和脂肪酸の量が EpCAM 陽性肝 CSC で著しく高いことが分かった (Figure 1A)。3 次元培養では、MYCN 低発現肝がん細胞はあまり増殖しないのに対し、MYCN 高発現肝がん細胞は活発な増殖が見られ、その増殖は SCD1 阻害剤 CAY10566 により特異的に抑制された。不飽和脂肪酸を添加すると CAY10566 による細胞スフェロイド増殖抑制がブロックされた。同様な効果は飽和脂肪酸処理や MYCN 低発現細胞では見られなかった。siRNA を用いて SCD1 の機能を欠損させると、MYCN の発現が有意に抑制された。肝発がんにおいて不飽和脂肪酸の代謝リモデリングは、MYCN 高発現を引き起こす上流制御因子となることが示唆された。次に RNA-seq 解析を用いて SCD1 シグナルの下流因子を網羅的に探索した。その結果、小胞体ストレス関連シグナル経路との関与が見られた。TCGA データベースを用いた臨床解析並びに 3 次元培養を用いた細胞解析では、小胞体ストレスマーカー ATF3 の遺伝子発現は EpCAM 陽性細胞で低下し、MYCN 遺伝子発現とは有意な負の相関が見られた (Figure 1B)。さらに小胞体ストレス誘導剤 Tunicamycin 投与により MYCN 遺伝子発現が抑制された (Figure 1C)。以上の結果から、肝 CSC において MYCN が遺伝子の持続的活性化の上流制御機構として、不飽和脂肪酸の合成が亢進し、小胞体ストレスシグナル経路を介して MYCN が遺伝子発現を制御することを報告した。脂質代謝リモデリングは、

小胞体ストレス依存性細胞死の回避並びにがん遺伝子の持続的活性化に伴い正常肝細胞から肝 CSC の性質を持つ細胞への変換を制することが示唆された。

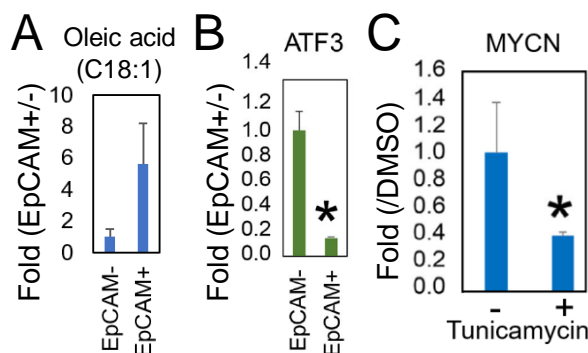


Figure 1. Lipid desaturation regulates MYCN gene expression through endoplasmic reticulum (ER) stress related signaling pathway. (A) Content of oleic acid (C18:1) in sorted EpCAM⁺ and EpCAM⁻ liver cancer cells measured by CE-TOFMS. (B) Gene expression of ER stress-inducible transcriptional repressor ATF3 in EpCAM⁺ and EpCAM⁻ liver cancer cells measured by PCR. (C) Gene expression of MYCN in liver cancer cells treated with 5 μ M ER stress inducer tunicamycin for 4 h. * P <0.05, t -test.

(2) 肝がんの診断と予後予測における組織中・血中 MYCN 発現の臨床的意義
 肝がん組織検体を用いた解析では、NIK333 の低濃度投与群では MYCN の発現に影響がみられなかったのに対し、高濃度投与群では約 7 割の患者において MYCN の発現が抑制され、MYCN が ACR の薬剤反応マーカーであることが示唆された。日本 (102 例)、台湾 (118 例) 及びヨーロッパ (50 例) の肝がん組織検体を用いたコホート研究では、MYCN 発現は、肝がん非がん部より肝がん組織において有意に高く、単発性や非肝硬変の早期肝がん患者において術後再発率とは有意な正の相関が見られた。一方、より汎用性を高めるため liquid biopsy を用いたバイオマーカーの開発を試み、血中 MYCN タンパク質の定量に成功した。肝がん患者 (18 例) の血中 MYCN 量は健常人 (15 例) より有意に高いのに対し、AFP や PIVKA-II など既存肝がんバイオマーカーとの相関が見られなかった。さらに、肝がん外科切除前後の血中 MYCN 量を比較したところ (20 例)、切除後の血中 MYCN 量は術前に比べ有意に減少した ($p=0.013$)。市販 miRCURY Exosome Kits を用いて血清中エクソソームを抽出し、ELISA によって MYCN タンパク質を定量した結果、血清を用いた解析と同様に肝がん患者のエクソソーム中 MYCN タンパク質量は有意に高いことが分かった ($p=0.029$) (Figure 2)。血中 MYCN タンパク質がエクソソーム中に存在する可能性が示唆された。以上の結果から、MYCN が肝がん再発の予測バイオマーカー並びに創薬標的として有用であることを示唆した。

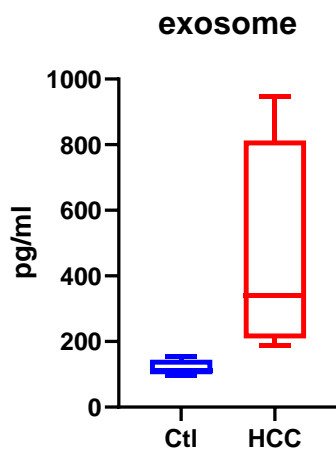


Figure 2. MYCN protein levels in exosome isolated from serum of healthy controls (Ctl; $n = 4$) and hepatocellular carcinoma (HCC) patients ($n = 4$).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Qin XY, Suzuki H, Honda M, Okada H, Kaneko S, Inoue I, Ebisui E, Hashimoto K, Carninci P, Kanki K, Tatsukawa H, Ishibashi N, Masaki T, Matsuura T, Kagechika H, Toriguchi K, Hatano E, Shirakami Y, Shiota G, Shimizu M, Moriwaki H, Kojima S	4. 巻 115
2. 論文標題 Prevention of hepatocellular carcinoma by targeting MYCN-positive liver cancer stem cells with acyclic retinoid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 4969 ~ 4974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1073/pnas.1802279115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Qin Xian-Yang, Dohmae Naoshi, Kojima Soichi	4. 巻 115
2. 論文標題 Reply to Yoshida: Liver cancer stem cells: Identification and lipid metabolic reprogramming	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E6390 ~ E6391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1073/pnas.1808740115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li Mengqian, Qin Xian-Yang, Furutani Yutaka, Inoue Ikuyo, Sekihara Sanae, Kagechika Hiroyuki, Kojima Soichi	4. 巻 504
2. 論文標題 Prevention of acute liver injury by suppressing plasma kallikrein-dependent activation of latent TGF-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 857 ~ 864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Qin Xian-Yang, Lu Jun, Cai Muye, Kojima Soichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Arachidonic acid suppresses hepatic cell growth through ROS-mediated activation of transglutaminase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1703 ~ 1710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1002/2211-5463.12511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Qin Xian-Yang, Kojima Soichi	4. 巻 1
2. 論文標題 Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase-1 Activity Suppressed SREBP Signaling in Colon Cancer Cells and Their Spheroid Growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastrointestinal Disorders	6. 最初と最後の頁 191 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/gidisord1010014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furutani Yutaka, Toguchi Mariko, Shiozaki-Sato Yumi, Qin Xian-Yang, Ebisui Etsuko, Higuchi Shoko, Sudoh Masayuki, Suzuki Harukazu, Takahashi Nobuaki, Watashi Koichi, Wakita Takaji, Kakeya Hideaki, Kojima Soichi	4. 巻 14
2. 論文標題 An interferon-like small chemical compound CDM-3008 suppresses hepatitis B virus through induction of interferon-stimulated genes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0216139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uyama Naoki, Tsutsui Hiroko, Wu Songtao, Yasuda Koubun, Hatano Etsuro, Qin Xian-Yang, Kojima Soichi, Fujimoto Jiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti-interleukin-6 receptor antibody treatment ameliorates postoperative adhesion formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54175-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasukawa Ken, Liew Lee Chuen, Hagiwara Keitaro, Hironaka Mitsuhashi Ai, Qin Xian Yang, Furutani Yutaka, Tanaka Yasuhito, Nakagama Hitoshi, Kojima Soichi, Kato Takashi, Ochiya Takahiro, Gailhouste Luc	4. 巻 111
2. 論文標題 MicroRNA 493 5p mediated repression of the MYCN oncogene inhibits hepatic cancer cell growth and invasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 869 ~ 880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Qin Xian-Yang, Su Ting, Yu Wenkui, Kojima Soichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Lipid desaturation-associated endoplasmic reticulum stress regulates MYCN gene expression in hepatocellular carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2257-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Qin Xian-Yang, Su Ting, Kojima Soichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Prevention of arachidonic acid-induced liver injury by controlling oxidative stress-mediated transglutaminase activation with garlic extracts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1522-1527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2019.8384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Su Ting, Qin Xian-Yang, Furutani Yutaka, Yu Wenkui, Kojima Soichi	4. 巻 597
2. 論文標題 Imaging of the ex vivo transglutaminase activity in liver macrophages of sepsis mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.113654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 秦成陽、小嶋聡一
2. 発表標題 レチノイドによるMYCN陽性肝癌幹細胞の選択排除
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Xian-Yang Qin, Soichi Kojima
2. 発表標題 Multi-omics analyses on the effect of acyclic retinoid in selective depletion of liver cancer stem cells
3. 学会等名 THE FOURTH INTERNATIONAL FASEB CONFERENCE ON RETINOIDS (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秦咸陽、小嶋聡一
2. 発表標題 肝発癌における不飽和脂肪酸の役割に関する検討
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秦咸陽、小嶋聡一
2. 発表標題 非環式レチノイドによる肝癌幹細胞排除における不飽和脂肪酸の関与
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第29回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秦 咸陽、小嶋 聡一
2. 発表標題 細胞と組織レベルにおける肝脂質代謝解析による肝発癌への不飽和脂肪酸関与の検証
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秦成陽、小嶋聡一
2. 発表標題 不飽和脂肪酸の代謝リプログラミングを標的とする肝がん幹細胞の増殖制御
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秦成陽、影近弘之、小嶋聡一
2. 発表標題 非環式レチノイド及びビタミンK2誘導体によるトランスグルタミナーゼの立体構造変化の制御
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第30回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xian-Yang Qin and Soichi Kojima
2. 発表標題 Identification of MYCN as a prognostic biomarker of liver cancer stem cells and therapeutic target for recurrence of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 JDDW2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180424_1/
http://www.riken.jp/en/pr/press/2018/20180424_1/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----