

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390200
 研究課題名（和文）
 肝癌に対する複合的免疫遺伝子治療：樹状細胞機能増強による免疫監視システム再構築
 研究課題名（英文）
 Immuno-gene therapy for hepatocellular carcinoma:the arrangement of immunological surveillance system
 研究代表者
 出口 章広 (DEGUCHI AKIHIRO)
 香川大学・医学部・助教
 研究者番号：30380174

研究成果の概要（和文）：

1. 肝癌における血管新生分子の発現

非癌組織、肝癌において増強していた血管新生分子は FGF- β あるいは IL-8 である。正常肝細胞株と比較して肝癌細胞株で増強していたのも FGF- β あるいは IL-8 であった。

2. 肝癌におけるサイトカイン分子の発現

肝癌において増強していたサイトカイン分子は、activin, CD40, FGF, Glut, IL17 and FGF- $\cdot\cdot$ である。

3. 肝癌におけるマイクロ RNA のプロファイリング

マイクロ RNA-527 は肝癌において極めて減弱しており、そのターゲット遺伝子は glypican-3 である。

研究成果の概要（英文）：

Expression of angiogenesis molecules in hepatocellular carcinoma

As compare with nontumorous tissue, enhanced FGF- $\cdot\cdot$ or IL-8 expression was detected in hepatocellular carcinoma. In addition, FGF- $\cdot\cdot$ or IL-8 was also increased in hepatocellular carcinoma cell lines.

Expression of cytokine molecules in hepatocellular carcinoma

Many cytokines enhanced in hepatocellular carcinoma is up-regulated, such as, activin, CD40, FGF, Glut, IL17 and FGF- $\cdot\cdot$.

Profiling of micro-RNA in hepatocellular carcinoma

MicroRNA -527 was down-regulated in hepatocellular carcinoma.

In addition, the target gene of microRNA-527 was glypican-3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器科学

キーワード：肝癌、肝硬変、サイトカイン、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

癌は本邦における死因の第一位を占めているのみならず、癌による死亡者数は増加の一途を辿っており、日本人の3人に1人が癌で死亡する時代を迎えつつある。しかし、現行の外科的治療、化学療法、放射線治療だけでは、癌に対する治療成績は限界に達しており、新たな治療法の開発が切望されている。我々は、癌に対する遺伝子治療の臨床応用を目指した基礎研究を続けており、Hepatology、Gastroenterology、Gut、Hum Gene Ther、Gene Ther、Cancer Res、Int J Cancer、Int J Oncol、Int J Mol Medなどの学術誌に約50篇の遺伝子治療関連の論文を発表している。しかし、癌を対象とした遺伝子治療の臨床治験では、期待されたほどの治療効果が得られておらず新たなブレイクスルーが必要であり、当面は基礎研究の充実が急務と考えられている。

ヒトに自然発生した臨床レベルの癌は、生体の免疫監視システムを回避し、免疫寛容の世界に存在していると考えられるため、癌に対する免疫応答を誘導するには、生体の免疫監視システムの再構築が不可欠である。癌免疫の誘導には樹状細胞が極めて重要な役割を担っており、樹状細胞を利用した免疫遺伝子治療が、癌に対する新たな治療戦略として期待されている。樹状細胞こそがナイーブT細胞を教育し、抗原特異的な免疫応答を誘導する抗原提示のプロフェッショナル細胞であり、癌に対する免疫監視システムを再構築するためには、樹状細胞の機能を増強させることが重要である。しかし、末梢血や骨髄細胞から分離増殖させた樹状細胞を癌抗原や癌ペプチドで刺激し、皮下などに接種する癌ワクチン療法では、十分な抗腫瘍効果を得られないことが臨床治験において報告されている。さらに、樹状細胞にサイトカイン遺伝子などを導入した免疫遺伝子治療の臨床治験においても、現時点での臨床効果は十分とは言えない。そこで本研究においては、樹状細胞の機能増強を誘導する遺伝子を網羅的に見つけ出し、肝癌に対する強力な癌免疫の誘導法を検討する。

2. 研究の目的

本研究において樹状細胞を活性化させる可能性のある血管新生分子、レセプター型チロシンキナーゼ、サイトカイン、マイクロRNA

を正常肝細胞と比較し、肝癌細胞に特異的に発現増強あるいは発現減弱している分子を網羅的な解析から見出し、免疫遺伝子治療のための樹状細胞に導入すべき分子を検索することにある。

3. 研究の方法

①正常肝、慢性肝炎、肝硬変、肝癌における血管新生分子の網羅的解析

方法は正常肝2例、慢性肝炎2例、肝癌6例（背景肝は肝硬変）、肝癌細胞株（Alex, Hep3B, HuH7, HLE, HLF, Li-7）と正常肝細胞株 h.VHeps における血管新生分子を19種類の分子が搭載したプロテインチップを用いて解析した。

②肝硬変、肝癌におけるサイトカイン分子の網羅的解析

507分子が搭載されたプロテインチップを用いて、10例の肝癌、肝硬変におけるサイトカイン分子を解析した。

③肝癌、肝硬変におけるマイクロRNAの網羅的解析とマイクロRNA527の標的遺伝子の同定

4例の肝癌とその非癌組織（肝硬変）よりRNAを抽出し、338種類のマイクロRNAが搭載されたチップを用いて解析した。さらに肝癌において極めて減少していた2例のRNA527のターゲット遺伝子を予測し、実験的検証を行った。

4. 研究成果

①各種肝組織、肝癌細胞株における血管新生分子の網羅的解析

正常肝ではおもにアンジオゲニンが産生されていたが、慢性肝炎例ではアンジオゲニンに加え、FGF- α が発現している。さらに肝硬変になると、アンジオゲニン、FGF- α に加えてVEGFが発現していた。肝細胞癌は6症例で実施したが、3症例ずつ、AパターンとBパターンが見られた。Aパターンはアンジオゲニン、FGF- α 、VEGFに加え、IL-8がきわめて増強しているパターンだが、FGF- β の発現は弱い。ところが、もう一方のBパターンではIL-8の発現は見られず、FGF- β が増強している。つまり、肝細胞癌ではIL-8もしくはFGF- β が増強してくると言える。

次に、正常肝細胞株、肝癌細胞株をプロテインチップで解析した。正常肝細胞株の

Chang 細胞と同様、肝癌細胞株ではアンジオゲニンは発現していない。ところが、Alex, Hep3B, HLE, HLF の 4 株のうち、Alex, Hep3B は非常に強く IL-8 を産生しており、一方 HLE, HLF は IL-8 を発現していないが FGF- β は強く発現しているというように 2 つのパターンが見られた。これは組織の 2 パターンとほぼ一致すると思われた。ここまでの結果をまとめると、正常肝、慢性肝炎、肝硬変、肝癌は C 型慢性肝炎の肝硬変に至る 1 つの経路だが、正常肝はおもにアンジオゲニンが発現しており、慢性肝炎になるとそれに加えて FGF- α が発現する。肝硬変ではさらに VEGF が発現してくる。そして、肝癌になるとこれらの 3 つに加え、IL-8 もしくは FGF- β が発現してくると考えられた。

②肝癌進展過程におけるサイトカイン分子の発現の網羅的解析

肝癌進展過程において種々のサイトカインの発現異常が報告されている。肝癌における樹状細胞の活性化を誘導させるサイトカインを同定するため、第一に、慢性肝炎、肝硬変と比較し、肝癌において特異的に発現する分子の同定を 540 種類の分子を搭載した蛋白アレイを用いて解析し、肝癌において特異的に変動する分子を同定した。方法としては、蛋白アレイ (540 分子搭載) 解析には、慢性 C 型肝炎・肝硬変の肝細胞癌 5 例の癌部・非癌部の組織を使用し、肝細胞癌においての分子の発現レベルについて、各スポットのシグナルを数量化させ網羅的に解析した。変化の見られたサイトカインについては、Western blot および、ABC 法を用いた免疫染色により確認した。さらに、階層的分類を用いたクラスター解析もおこなった。非癌部の肝硬変と比較し、肝癌において増強していたのは、Activin \cdot CD40 \cdot FGF \cdot Glut \cdot IL-17 \cdot TGF-beta であり、これらは、Western blot および免疫染色により同様の結果であることが確認された。階層的分類法を用いたクラスター解析の結果、癌部、非癌部におけるサイトカインの発現パターンは異なるプロファイリングを形成していた。また、免疫染色の結果から、非癌部より、癌部において樹状細胞が集積していた。

③肝細胞癌におけるマイクロ RNA のプロファイリング

癌において増強したマイクロ RNA が 16 個、減少したマイクロ RNA が 13 個あった。また、338 種類の網羅的なマイクロ RNA の発現プロファイルから 5 症例と非癌部は異なるプロファイルを形成した。このことから癌化にマイクロ RNA は、強く関与していると考えられた。

次に Human micro RNA Target のデータベースから極めて肝癌において減弱していた

マイクロ RNA-527 の標的分子を検討したところ、Glypican-3 の 3' -UTR とマイクロ RNA-527 と特異的に結合する配列を持っていることが判明した。また、Glypican-3 の発現していない Cos-7 に Glypican-3 の transient expressim の系を用いて、強制発現した系にマイクロ RNA-527 を導入すると Glypican-3 の発現が抑制され、マイクロ RNA-527 が、確かに Glypican-3 の標的遺伝子であることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 41 件)

1. Jian G, Masaki T, and 18 others (last), Use of protein array to investigate receptor tyrosine kinases activated in gastric cancer. *Int J Oncol*, (in press), (査読有)
2. Izuishi K, Masaki T, Suzuki Y, High concentration of lactic dehydrogenase in small volumes of ascites, *J Gastrointest Liver Dis.* (1):105-6, 2010, (査読有)
3. Deguchi K, Masaki T and 7 others (last), The close relationship between life-threatening breathing disorders and urine storage dysfunction in multiple system atrophy. *J Neurol.*, pp. 1-6, 2010, (査読有)
4. Sano T, Izuishi K, Takebayashi R, Masaki T, Suzuki Y, Operative management of solitary intra-abdominal recurrence of hepatocellular carcinoma, *Surgery*, 147 (2), pp. 311, 2010, (査読有)
5. Himoto T, Masaki T, and 13 others (11nd), Cytomegalovirus-associated Acute Gastric Mucosal Lesion in an Immunocompetent Host, *Intern Med* 48: 1521-1524, 2009 (査読有)
6. Masaki T, MicroRNA and hepatocellular carcinoma, *Hepatol Res*, 39(8):751-2, 2009 (査読有)
7. Sano T, Izuishi K, Takebayashi R, Kushida Y, Masaki T, Suzuki Y, Education and imaging. Hepatobiliary and pancreatic: Isolated diaphragmatic metastasis from hepatocellular carcinoma, *J Gastroenterol Hepatol* 24: 1475, 2009 (査読有)
8. Urai Y, Masaki T and 12 others (last), Paraneoplastic necrotizing myelopathy in a patient with advanced esophageal cancer: An autopsied case report. *J Neurol Sci*, 15:280(1-2):113-7, 2009 (査読有)

9. Yurimoto S, Masaki T, and 6 others (6nd), Tokumitsu H, Identification and Characterization of Wolframin, the Product of the Wolfram Syndrome Gene (WFS1), as a Novel Calmodulin-Binding Protein *Biochemistry*, 48: 3946-3955, 2009(査読有)
10. Yoshida S, Kurokohchi K, Ueno T, Yoshino M, Shimada M, Masaki T, Hepatic von Meyenburg complex: a trigger of severe portal hypertension. *Liver Int* 29: 614-615, 2009 (査読有)
11. Kinekawa F, Masaki T and 10 others (2nd), Authors' reply, *J Gastroenterol*, 44 (3), pp. 237, 2009(査読有)
12. Hashimoto N, Masaki T, and 20 others (7nd), Immunohistochemically detected expression of p27 (Kip1) and Skp2 predicts survival in patients with intrahepatic cholangiocarcinomas. *Ann Surg Oncol*.;16(2):395-403. 2009(査読有).
13. Himoto T, Masaki T, Deguchi A and 9 others (5th, 7nd), Clinical characteristics of patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease seropositive for anticentromere antibody, *Dig Dis Sci*, 54(2):360-8, 2009(査読有).
14. Fujiwara M, Izuishi K, Sano T, Hossain MA, Kimura S, Masaki T, Suzuki Y, Modulating effect of the PI3-kinase inhibitor LY294002 on cisplatin in human pancreatic cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 25;27:76. 2008 (査読有).
15. Mohammad SH, Yoneyama H, Deguchi A, Himoto T, Masaki T, and 20 others (12th, last author)., Annexin A2 expression and phosphorylation are up-regulated in hepatocellular carcinoma, *Int J Oncol* 33: 1157-1163, 2008(査読有)
16. Uchida N, Masaki T, and 5 others (4th), How many cytological examinations should be performed for the diagnosis of malignant biliary stricture via an endoscopic nasobiliary drainage tube?, *J Gastroenterol Hepatol*, 23(10):1501-4, 2008 (査読有).
17. Kinekawa F, Masaki T, and 10 others (last author), Esophageal function worsens with long duration of diabetes, *J Gastroenterol*, 43, 338-344, 2008. (査読有).
18. Tanabe K, Deguchi A, and 6 others (2nd), Outer arm fucosylation of N-glycans increases in sera of hepatocellular carcinoma patients, *Biochem Biophys Res Commun*, 374, 219-225, 2008. (査読有).
19. Kurokohchi K, Yoneyama H, Deguchi A, Masaki T, Himoto T, and 6 others (4th, 5th), A combination therapy of ethanol injection and radiofrequency ablation under general anesthesia for the treatment of hepatocellular carcinoma, *World J Gastroenterol*, 14, 2037-2043, 2008. (査読有).
20. Kurokohchi K, Deguchi A, Masaki T, Yoneyama H, Himoto T and 4 others (2nd, 3rd), Comparative study of the effects of percutaneous ethanol injection and radiofrequency ablation in cases treated with a straight or expandable electrode, *Oncol Rep*, 18, 1275-1279, 2007. (査読有).
21. Yasokawa T, Ishimaru I, Kuriyama S, Masaki T, Takegawa K, Tanaka N, A double filtering method for measuring the translational velocity of fluorescently stained cells. *Appl Phys Lett*, 91: 131116(1)-131116(3), 2007(査読有).
22. Himoto T, Deguchi A, Masaki T, and 9 others (4th, 8th), Efficacy of zinc administration in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease, *Scand J Gastroenterol*, 42, 1078-1087, 2007. (査読有).
23. Kurokohchi K, Deguchi A, Masaki T, Himoto T, Yoneyama H and 7 others (2nd, 3rd), Successful treatment of hypovascular advanced hepatocellular carcinoma with lipiodol-targetting intervention radiology, *World J Gastroenterol*, 13, 4398-4400, 2007. (査読有).
24. Ogawa M, Deguchi A, Masaki T, and 5 others (3rd, 5th), Vitamins K2, K3 and K5 exert antitumor effects on established colorectal cancer in mice by inducing apoptotic death of tumor cells, *Int J Oncol*, 31, 323-331, 2007. (査読有).
25. Uchida N, Masaki T, and 8 Others (6nd). Utility of pancreatic duct brushing for diagnosis of pancreatic carcinoma. *J Gastroenterol* 42: 657-662, 2007 (査読有)
26. Tsutsui K, Masaki T, and 11 Others (11th). Usefulness of single and repetitive percutaneous transhepatic gallbladder aspiration for the treatment of acute cholecystitis. *J Gastroenterol* 42: 583-588, 2007 (査読有)
27. Yasokawa T, Masaki T, and 5 others (5th), A method for measuring the three-dimensional refractive-index distribution of single cells using proximal two-beam optical tweezers and a phase-shifting mach-zehnder

interferometer. *Optical Review*, 14: 161-164, 2007(査読有).

28. Iwama H, Masaki T, Kuriyama S. Abundance of microRNA target motifs in the 3'-UTRs of 20527 human genes. *FEBS Lett*. 1;581(9):1805-10. 2007. (査読有)

29. Yasokawa T, Masaki T, and 6 others (6th) Technique for measuring the rotational velocity of a single cell. *Appl Phys Lett*, 90 (5), art. no. 051103, 2007(査読有)

30. Kuriyama S, Deguchi A, Masaki T, and 12 others (8th, 13th), Sequential assessment of the intrahepatic expression of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in hepatofibrogenesis of a rat cirrhosis model, *Int J Mol Med*, 317-324, 2007. (査読有)

31. Yamamoto K, Masaki T, and 6 others (6th), *Appl Phys Lett*, 90: 021110-1-021110-3, 2007(査読有)

32. Nonomura T, Masaki T, Himoto T, and 9 others (2nd), Identification of c-Yes expression in the nuclei of hepatocellular carcinoma cells: Involvement in the early stages of hepatocarcinogenesis, *Int J Oncol*, 105-111, 2006. (査読有)

33. Yoshida M, Masaki T, and 7 others (6th), Displacement measurement of the depth migration of transparent cells. *Appl Phys Letts*, 89(24)241102-1-241102-3, 2006(査読有)

34. Kobayashi H, Masaki T, and 7 others (6th), Three-dimensional phase-contrast imaging of single floating cells. *Appl Phys Letts*, 89(24): 241117-1-241117-3, 2006(査読有)

35. Yamamoto K, Masaki T, and 9 others (11th), Imaging technology of three dimensional distribution for sugar chain on single living cell-membrane, *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 6374, art. no. 63740L, 2006(査読有)

36. Kurokohchi K, Masaki T, Yoneyama H, and 9 others (9th), Successful treatment of large-size advanced hepatocellular carcinoma by transarterial chemoembolization followed by the combination therapy of percutaneous ethanol-lipiodol injection and radiofrequency ablation, *Oncol Rep*, 16, 1067-1070, 2006. (査読有).

37. Masaki T, Morishita A, Kurokohchi K, Kuriyama S, Multidisciplinary treatment of patients with hepatocellular carcinoma, *Expert Rev Anticancer Ther*, 6, 1377-1384,

2006. (査読有).

38. Yasokawa T, Masaki T, and 7 others (5th), Attitudinal manipulation of an optically trapped bacillary probe by controlling the distance between focal points for local dosing in cells. *Appl Phys Lett* 89, (13)131107-1-131107-3, 2006(査読有).

39. Inoue Y, Masaki T, and 7 others (5th), Variable phase-contrast fluorescence spectrometry for fluorescently stained cells. *Appl Phys Lett* 89, (12)121103-1-121103-3, 2006(査読有)

40. Feng H, Masaki T, Deguchi A, and 14 others (2nd, 7th), Activation of c-Yes in hepatocellular carcinoma: A preliminary study, *World J Gastroenterol*, 12, 5743-5745, 2006. (査読有)

41. Ichikawa E, Masaki T, and 5 others (5th), Further resolution of alpha-fetoprotein glycoforms by two-dimensional isoelectric focusing and lectin affinity electrophoresis, *Electrophoresis*, 27, 3480-3487, 2006(査読有)

[学会発表] (計 1 件)

1. Deguchi A, Tumor morphology and prognosis after radiofrequency thermal ablation for small hepatocellular carcinoma. 19th Conference of the APASL 2009. 2.13-16, Hong Kong Convention and Exhibition Centre, Hong Kong, China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出口 章広 (Deguchi Akihiro)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：30380174

(2) 連携研究者

正木 勉 (Masaki Tsutomu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：30335848