

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390350

研究課題名（和文） 肝細胞癌固有のシグナルと分子を標的とした新規治療法の展開

研究課題名（英文） Development of potential new treatment for the HCC targeting specific signal and molecules

研究代表者

永野 浩昭（NAGANO HIROAKI）

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10294050

研究成果の概要：IFNと5-FUの併用による抗腫瘍効果の機序と効果予測について検討した。

in vivoでの検討では、IFNは5FUと併用すると腫瘍の増大を抑制し、腫瘍内新生血管数を減少させ、その機序としてVEGF、Ang-1、Ang-2の関与が明らかになり、機序の一つとして抗血管新生作用の関与が示された。次に、in vitroでの検討により、血管内皮細胞に対する直接的増殖抑制効果の関与も明らかになった。また、臨床検体を用いたトランスクリプトーム解析により治療効果予測に関与する遺伝子の絞り込みが終了した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝細胞癌、進行癌、門脈内腫瘍栓、インターフェロン、化学療法
IFN受容体、トランスクリプトーム解析、血管新生

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の予後は依然として不良で、胃癌、肺癌に次いで本邦での悪性腫瘍の死亡原因の第3位に位置する。その中でも門脈内腫瘍栓など脈管侵襲をともなう進行肝細胞癌については、たとえ肉眼的には切除可能であっても早期に残肝再発を来し、経動脈的化学塞栓療法

(TAE)や経皮的アルコール注入療法(PEI)などの既存の治療法を繰り返し施行しても、治療効果はまったく期待できない。さらに、難治性腹水などの症状のためにQOLも極めて悪く、多発肝癌病巣をともなう場合などには、ほとんどの症例が6ヶ月以内に死に至る。したがってこのような高度の脈管侵襲をともなう症例に対しては、有

望かつ有効な治療法の開発は不可欠かつ急務である。

我々は、現在までに約100例の門脈内腫瘍栓をとまなう症例に抗ガン剤の肝動注化学療法とインターフェロン- β (IFN- β)の皮下投与(IFN併用化学療法:Sakon M., et al, Cancer, 2002)を応用し、約50%の奏効率(Ota H., et al, BJ Cancer, 2005)を得た。さらに、本療法は肝切除術の術後補助療法としても有用であるとの知見を得た(Nagano H, Hepatogastroenterol, in-press)。これらの結果は、既存の治療法がまったく効を奏さない難治性進行肝細胞癌に対する治療成績としてはきわめてすぐれており、さらに副作用もほとんど無いことについても確認され、本療法が、治療抵抗性進行肝細胞癌に対して有効である可能性が高いとの確信にいたった。

その一方で、本治療法は残念ながら奏効率が約50%程度で、約5割の患者においては全く治療効果を認めない。今後は、この様な無効症例の克服が課題であり、同時にそれが肝癌全体の生存率向上に大きく寄与すると考える。したがって、IFN併用化学療法の機序解明とそれに対する対策が不可欠である。IFNはそのレセプター(IFN- α / レセプター:IFNAR)を介して腫瘍細胞の増殖抑制効果や宿主免疫能の賦活、血管新生抑制効果など、様々な生理活性を發揮することが報告されている。一方、我々は現在までIFNが5-FUの抗腫瘍効果をさらに増強すること、IFNARの発現が重要であることをすでに報告してきた。さらに本研究では、これらの研究成果を発展させ、新規治療法へと応用・展開すべく、作用機序の解明に全力を挙げる。

2. 研究の目的

IFN 併用化学療法の有効性の機序については、IFN レセプター (IFNAR) を介した抗腫瘍効果、免疫賦活作用にともなう抗腫瘍効果、血管新生抑制効果、の 3 つの可能性が考えられる。

については直接的な抗腫瘍効果であり、に関しては、前者は NK 細胞、T細胞などのリンパ球を介した、後者は腫瘍細胞の放出する血管新生促進因子、抑制因子を介した、いずれも間接的な抗腫瘍効果である。

最近、IFN 併用化学療法が奏効した症例では、癌部 IFNAR の発現が強く、逆に IFNAR の発現の無い症例では治療効果は認められなかったことについて報告した(Ota H, et al, BJ Cancer, 2005)。以上の知見より、本療法においては癌部の IFNAR の発現は治療効果の必要条件であり、このことから予想するに、IFN レセプターからのシグナル伝達を介した抗腫瘍効果の機序についての解明が重要なポイントの一つとなる。また、肝臓は人体最大の網内系で、特に NK 細胞などの免疫担当細胞の宝庫である。IFN- α は powerful な免疫賦活因子であり、肝内の網内系の活性化により、抗腫瘍効果をもたらす可能性は高い。また、肝細胞癌は腫瘍内血流がきわめて豊富であり、IFN- α の血管新生抑制作用による抗腫瘍効果についても、期待できる。さらには、最近着目されている網羅的遺伝子解析を施行することで、これらの期待しうる治療効果機序の中での Key 遺伝子、key 分子を同定し遺伝子治療、分子標的治療への展開の可能性について模索する。

3. 研究の方法

(1) IFNARを介したIFN-alpha/5FU併用療法の作用機序の検討

IFNARの発現調節機構及びそのシグナル伝達機構に関する基礎的、臨床的検討。

1) IFNARの遺伝子変異とレセプター機能発現の関係:培養肝癌細胞株を用い、IFN-alpha IFNAR JAK kinase STATといった細胞内シグナル伝達分子の発現や燐酸化の多寡、さらには各stepの発現遺伝子のmutationが本療法の効果に関与するかどうかをRT-PCR法、PCR-SSCP法、Western

blot法にて検討する。

2) IFNARのシグナル伝達制御機構の解明: 培養肝癌細胞株を用い、STATの磷酸化に伴う核内移行とその後のsuppressors of cytokine signaling (SOCS)蛋白によるIFNARシグナル伝達系のnegative feedback機構をRT-PCR およびWestern blot法にて検討する。

death ligand (TRAILやFasLなど)を介した抗腫瘍効果の増強機構の解析。

IFN-alphaと5-FUとの相互作用でdeath ligand (TRAILやFasLなど)を介した腫瘍細胞破壊機構について、IFNARの遺伝子発現及び変異とどのように関連するかについて、in vitroの系と切除肝癌組織を用いて、浸潤する免疫担当細胞上のdeath ligand (TRAILやFasLなど)が発現しているかどうか、また、IFN-alpha/5-FU併用療法施行前後や奏効例と非奏効例でその発現が異なるかどうかを解析する。

(2) apoptosis 関連蛋白の検討

RT-PCR およびWestern blot 法にてapoptosis 抑制蛋白(Bcl-2, Bcl-xL, IAP 等)、促進蛋白 (Bax, Bad, Bid, APAF1, Smac 等)及び実行蛋白(caspase 群)の発現がIFN-alpha/5FU併用療法でどのように変化するかを、in vitro 及び in vivo で検討する。

(3) トランスクリプトーム(網羅的遺伝子)解析に基づくIFN併用化学療法の効果予測法の確立

肝細胞癌株を用いたin-vitroの系での網羅的遺伝子解析に基づくIFN併用化学療法の効果予測

1)肝細胞癌株の中で、IFN/5FUの併用治療により、PLCのように相乗効果を持って抗腫瘍活性を示す株と抗腫瘍活性が相加効果にとどまる株が存在することが明らかになっている。これらの2種類の細胞株を使用し、肝細胞癌に対して30000遺伝子を用いた網羅的遺伝子解析システムを用いて、この2

種類の細胞株の抗腫瘍活性の差をもたらす遺伝子についての検討を施行する。

2)上記の結果をさらに、in-vivoの系に応用する。現在までに我々は、ヌードマウスと上記肝細胞株を用いた皮下腫瘍モデルについては作成済みである。このヌードマウスモデルで作成しえた腫瘍検体を使用し、in-vitroの結果より得た遺伝子についての免疫組織染色、Westernプロット、RT-PCR法を用いた詳細な検討を施行し、抗腫瘍効果の機序についての検討を行う。

4 . 研究成果

肝細胞癌を用いた in vitro の研究

(1) 細胞周期との関連

5FU と IFN の併用効果を調べるため、を検討した。その結果、5FU と IFN を併用により著名な G0/G1 期の蓄積を認め、細胞周期関連蛋白質 (Cyclin D、Cyclin E、p21waf1/cip1、p27kip1)の中で p27kip1 の関与が示唆された。また、IFN レセプターの発現量や、IFN レセプターを介した細胞内シグナル (STAT-1、Bcl-xL) の関与についても明らかにした。

(2) IFN による宿主の免疫賦活作用

TRAIL と IFN との関連について、TRAIL レセプターの発現を確認するとともに、末梢単核球が IFN の刺激によって TRAIL の発現が増強することを証明した。

(3) 血管新生抑制効果

肝細胞癌増殖抑制実験での培養液中の各種血管新生因子の発現が減弱することが確認されている。

肝細胞癌を用いた in vivo の研究

(1) 抗腫瘍効果

肝細胞癌 (HuH7) をヌードマウスに移植した系において、IFN には 5FU と併用すると腫瘍の増大を抑制する効果を認めた。in vitro の結果同様、その効果は IFN 単独、5FU 単独のいずれよりも強いことがわかった。

(2) 抗血管新生効果

腫瘍内の新生血管数を調べたところ、明らかに IFN、5FU 併用群においては、新生腫瘍血管が減少していることが証明され、血管新生抑制効果についても、抗腫瘍効果の重要な機序の一つであることが示された。

(3) 臨床材料を用いた免疫組織学的検討

肝細胞癌の IFN レセプターの発現が、IFN 併用化学療法が治療効果をもたらすための必要条件である可能性が、示唆された。

トランスクリプトーム解析に関する検討

IFN- と 5-FU の併用による抗腫瘍効果の明確な臨床検体を用いてトランスクリプトーム解析を施行し、治療効果予測に関与する 35 遺伝子についての絞り込みが終了した。

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 18 件)

Xu X., Yamamoto H., Liu G., Ito Y., Ngan CY., Kondo M., Nagano H., Dono K., Sekimoto M., Monden M. CDC25A inhibition suppresses the growth and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. 有 Int J Mol Med. 21(2) : 145-152, 2008.

Kittaka N., Takemasa I., Takeda Y., Marubashi S., Nagano H., Umeshita K., Dono K., Matsubara K., Matsuura N., Monden M. Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data Eur J Cancer 有 44 885-897, 2008.

Nakamura M., Nagano H., Marubashi H., Miyamoto A., Takeda Y., Kobayashi S., Wada H., Noda T., Dono K., Umeshita K., Monden M. Pilot study of combination chemotherapy of S-1, a novel oral DPD inhibitor, and interferon- for advanced hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis Cancer 有 112(8) : 1766-1771, 2008.

Uyama H., Nagano H., Nakamura H., Murakami T., Nakamura H., Monden M., Hayashi N. New chemotherapy for patients with advanced hepatocellular

carcinoma: Pilot study of -interferon and doxorubicin one-shot intra-arterial chemotherapy Hepatology Research 有 37(12) : 1018-1025, 2007.

野田剛広、永野浩昭、門田守人 特集 消化器がんの化学療法-外科の立場から.: 無 肝がん Medico 39(1) : 10-14, 2008.

小林省吾、永野浩昭、丸橋繁、武田裕、堂野恵三、梅下浩司、門田守人.: 治療の進歩と問題点 治療後再発予防に関する知見.: 無 外科治療 98(2) : 174-177, 2008.

永野浩昭、門田守人.: 肝細胞癌の集学的治療と化学療法外科治療 無 98 160-165, 2008.

永野浩昭、門田守人.: インターフェロンの併用動注療法 (1) : 無 外科 70(2) : 192-196, 2008.

永野浩昭、丸橋繁、小林省吾、和田浩志、野田剛広、村上昌裕、武田裕、堂野恵三、梅下浩司、門田守人.: 化学療法.: 総合臨床 無 57(6) : 1773-1780, 2008.

永野浩昭、丸橋繁、野田剛広、和田浩志、村上昌裕、小林省吾、武田裕、堂野恵三、梅下浩司、門田守人.: 術前・術後の補助療法.: 消化器外科 無 31(6) : 999-1006, 2008.

野田剛広、永野浩昭、丸橋繁、小林省吾、宮本敦史、武田裕、村上昌裕、堂野恵三、梅下浩司、若狭研一、門田守人.: 肝細胞癌根治切除後 10 年無再発生存例の臨床病理学的因子に関する検討.: Liver Cancer 無 14(1) : 43-47, 2008.

濱直樹、丸橋繁、堂野恵三、小林省吾、金致完、浅岡忠史、武田裕、永野浩昭、梅下浩司、門田守人、土岐祐一郎、森正樹.: 生体肝転移後の肝癌再発に対し集学的治療にて長期生存を得ている 1 例癌と化学療法 無 35(12) : 2092-2095, 2008.

野田剛広、永野浩昭、丸橋繁、小林省吾、武田裕、村上昌裕、富丸慶人、堂野恵三、梅下浩司、中山美加、島俊秀、若狭研一、門田守人、土岐祐一郎、森正樹.: IFN- /5-FU 併用動注化学療法治療後に無効病巣の出現および他臓器浸潤に対して切除術を施行した混合型肝癌の 1 例.: 癌と化学療法 無 35(12) : 2099-2102, 2008.

武田裕、永野浩昭、小林省吾、丸橋繁、種村匡弘、北川透、堂野恵三、梅下浩司、門田守人、森正樹、土岐祐一郎.: 原発性肝癌に対する adjuvant/neoadjuvant chemotherapy.: 臨床外科 無 63(13) : 1715-1723, 2008.

野田剛広、永野浩昭、門田守人.:補助化学療法 肝細胞癌切除後の補助化学療法の適応は？.:消化器癌の外科治療 無 51-56、2008.

野田剛広、永野浩昭、村上昌裕、小林省吾、丸橋繁、宮本敦史、武田裕、堂野恵三、梅下浩司、若狭研一、門田守人.:肝細胞癌の経皮的治療後の腹腔内および穿刺経路播種に対する外科的切除の有効性.:癌と化学療法 無 34(12):2080-2083、2007.

永野浩昭、門田守人.:5FU とインターフェロン.:肝胆膵 無 55(5):823-831、2007.

村上昌裕、永野浩昭、野田剛広、和田浩志、小林省吾、丸橋繁、宮本敦史、武田裕、堂野恵三、梅下浩司、門田守人.:Doxorubicin/IFN- 併用化学療法と肝切除術により長期生存し得た右心房内腫瘍栓を伴う進行肝細胞癌の1例.:癌と化学療法 無 34(12):2087-2089、2007.

[学会発表](計 18 件)

Nagano H.:Current status and problem for surgical treatment to HCC.:The 7th Sino-Japan Joint Conference for Cancer Research, 2008.12.7-.12.10 (China) [シンポジウム]

Tomimaru Y., Nagano H., Kobayashi S., Marubashi S., Man LC., Takeda Y., Tanemura M., Kitagawa T., Dono K., Umeshita K., Monden M.:The laparoscopy-assisted liver surgery -17 cases experiences.:第 11 回世界内視鏡外科学会 (11thWCES), 2008.9.2-.9.5 (横浜)

[一般示説]

富丸康人、永野浩昭、門田守人.:肝癌の集学的治療.:第 37 回日本肝臓学会東部会、2008.12.3-.12.4 (東京)

丸橋繁、永野浩昭、堂野恵三、金致完、浅岡忠史、濱直樹、小林省吾、武田裕、梅下浩司、門田守人、土岐祐一郎、森正樹.:肝細胞癌に対する成人間生体肝移植における再発予測因子と移植適応.:第 70 回日本臨床外科学会総会、2008.11.27-.11.29 (東京)

富丸慶人、永野浩昭、野田剛広、村上昌裕、小林省吾、丸橋繁、武田裕、種村匡弘、北川透、堂野恵三、梅下浩司、若狭研一、門田守人、土岐祐一郎、森正樹.:C 型肝炎関連肝細胞癌切除例における術前インターフェロン治療に関する検討.:第 70 回日本臨床外科学会総会、2008.11.27-.11.29 (東京)

野田剛広、永野浩昭、丸橋繁、小林省吾、武田裕、堂野恵三、梅下浩司、門田守人、

土岐祐一郎、森正樹.:肉眼的胆管内腫瘍栓を伴う肝細胞癌切除例の臨床病理学的因子の検討.:第 70 回日本臨床外科学会総会、2008.11.27-.11.29 (東京)

橘高信義、竹政伊知郎、武田裕、丸橋繁、永野浩昭、梅下浩司、堂野恵三、松原謙一、松浦成昭、門田守人、森正樹、土岐祐一郎.:Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma to gain deeper biological insights from genomic data.:第 67 回日本癌学会学術総会、2008.10.28-.10.30 (名古屋)

丸橋繁、永野浩昭、堂野恵三、金致完、浅岡忠史、濱直樹、小林省吾、武田裕、梅下浩司、門田守人、土岐祐一郎、森正樹.:肝細胞癌に対する成人間生体肝移植:肝癌治療における役割.:第 44 回日本移植学会総会、2008.9.19-.9.21 (大阪)

浅岡忠史、丸橋繁、堂野恵三、小林省吾、武田裕、永野浩昭、門田守人.:肝細胞癌合併非代償性肝硬変に対する肝移植後の再発症例に対する治療.:第 63 回日本消化器外科学会定期学術総会、2008.7.16-.7.18 (札幌)

野田剛広、永野浩昭、村上昌裕、小林省吾、丸橋繁、武田裕、堂野恵三、梅下浩司、門田守人.:進行肝細胞癌に対する補助療法 IFN- /5-FU 併用化学療法の有効性.:第 63 回日本消化器外科学会定期学術総会、2008.7.16-.7.18 (札幌)

村上昌裕、永野浩昭、野田剛広、小林省吾、丸橋繁、武田裕、堂野恵三、梅下浩司、若狭研一、門田守人.:肝細胞癌の外科的切除における術前 TAE と予後との関連.:第 63 回日本消化器外科学会定期学術総会、2008.7.16-.7.18 (札幌)

丸橋繁、永野浩昭、堂野恵三、金致完、浅岡忠史、濱直樹、小林省吾、武田裕、梅下浩司、門田守人.:肝細胞癌に対する成人間生体肝移植:再発予測と再発予防の取り組み.:第 26 回日本肝移植研究会、2008.6.19-.6.20 (横浜)

野田剛広、永野浩昭、門田守人.:肝細胞癌治療の新展開 肝細胞癌に対する IFN 併用化学療法の成績と限界.:第 44 回日本肝臓学会総会、2008.6.5-.6.6 (松山)

永野浩昭、野田剛広、村上昌裕、小林省吾、丸橋繁、宮本敦史、武田裕、山本浩文、堂野恵三、梅下浩司、門田守人.:肝細胞癌に対するインターフェロン- /5-FU 併用化学療法の多角的抗腫瘍効果に対する検討.:第 108 回日本外科学会定期学術集会、2008.5.15-.5.17 (長崎)

野田剛広、永野浩昭、竹政伊知郎、吉岡慎一、和田浩志、村上昌裕、小林省吾、丸橋繁、宮本敦史、武田裕、堂野恵三、梅下浩司、松原謙一、門田守人.:IFN レ

セプター陽性肝細胞癌に対する IFN 併用
化学療法感受性に関する遺伝子発現
解析.:第 108 回日本外科学会定期学術集
会、2008.5.15-.5.17 (長崎)

村上昌裕、永野浩昭、竹政伊知朗、野田
剛広、吉岡慎一、小林省吾、丸橋繁、武
田裕、堂野恵三、梅下浩司、松原謙一、
門田守人.:クリプトーム解析診断によ
る肝細胞癌切除後早期再発予測.:第 108
回日本外科学会定期学術集会、
2008.5.15-.5.17 (長崎)

丸橋繁、宮本敦史、永野浩昭、堂野恵三、
杉田ゆりか、金致完、浅岡忠史、濱直樹、
小林省吾、武田裕、梅下浩司、門田守人.:
肝細胞癌肝切除および肝移植症例にお
ける末梢血中 AFPmRNA 定量の臨床的意
義.:第 108 回日本外科学会定期学術集会、
2008.5.15-.5.17 (長崎)

野田剛広、永野浩昭、丸橋繁、武田裕、
小林省吾、村上昌裕、堂野恵三、若狭研
一、梅下浩司、門田守人.:肝細胞癌根治
切除後 10 年無再発生存例の臨床病理学
的因子の検討.:第 36 回近畿肝臓外科研
究会、2008.2.2 (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 浩昭 (NAGANO HIROAKI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 10294050

(2) 研究分担者

小林 省吾 (KOBAYASHI SYOGO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 30452436
武田 裕 (TAKEDA YUTAKA)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 90397696
丸橋 繁 (MARUBASHI SHIGERU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 20362725
竹政 伊知朗 (TAKEMASA ICHIRO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 50379252
門田 守人 (MONDEN MORITO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 00127309
堂野 恵三 (DONO KEIZO)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 60283769
宮本 敦史 (MIYAMATO ATUSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 00362731