

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16721

研究課題名（和文）革新的治療法開発を目指した肝細胞癌におけるLOXの機能的役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the functional role of LOX in hepatocellular carcinoma with the aim of developing innovative therapies

研究代表者

梅崎 直紀（UMEZAKI, Naoki）

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：00836249

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）：肝細胞癌の再発形式として 多中心性再発、肝内転移再発の2つがあり、早期再発に関して主に寄与していると考えられる肝内転移再発の対策が急務である。我々は肝細胞癌の早期再発に寄与する遺伝子としてLysyl oxidase (LOX) という遺伝子に注目し、この遺伝子の肝内転移の機序を明らかにした。今回の研究では網羅的な遺伝子発現のデータベースを用いた解析を中心に行い、LOX遺伝子がEMTを介して肝細胞癌の早期再発に関与していることが明らかとなり、今後の治療標的として期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究においてLOX遺伝子がEMTを介して肝細胞癌の早期再発に関連していることが明らかとなった。これにより肝細胞癌で根治切除を施行した患者の中でも再発リスクの高い患者を同定することが可能であり、LOX遺伝子が今後の治療標的の遺伝子の一つとして創薬やバイオマーカーなどの発展へ寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Two major types of recurrence in Hepatocellular carcinoma (HCC) are known: multicentric (MC) carcinogenesis and intrahepatic metastasis (IM). There is an urgent need to take measures against recurrence of intrahepatic metastasis, which mainly contributes to early recurrence of HCC.

We focused on the gene names Lysyl oxidase (LOX), as an oncogene which is strongly associated with early recurrence of HCC. We used the exhaustive gene expression database and analyzed the association between the LOX expression and molecular pathways, we revealed that the LOX expression is strongly associated with Epithelial-mesenchymal transition (EMT), suggesting that the LOX regulate early recurrence of HCC.

研究分野：肝胆膵領域における手術を中心とした集学的治療

キーワード：Lysyl oxidase EMT Hepatocellular carcinoma Intrahepatic metastasis Early recurrence HIF-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は根治的な肝切除術後においても高頻度に再発を繰り返す予後不良な疾患である。肝細胞癌の再発形式に関しては 原発巣とは異なる発生による de novo 発癌を来した多中心性発癌、 原発巣が血行性に転移を来した肝内転移再発の2つがあり、多中心性再発に対する治療としては、C型肝炎ウイルスに対するIFNを用いた抗ウイルス療法 (Lancet, 1998, Gastroenterology 2011) レチノイン酸を用いた再発予防効果 (ILCA, 2010) などが報告されている。一方、肝内転移再発に関しては未だ有効な治療法が開発されておらず、新規治療法の開発が急務である。また早期再発に関しては肝内転移再発が主に寄与していることが報告されており、本研究では肝細胞癌における肝内転移の機序を解明し、早期再発に対する効果的な予防/治療薬を創出する事を研究目的とした。

2. 研究の目的

肝細胞癌の再発形式の1つに原発巣が血行性に転移を来した肝内転移再発があり、早期再発に関与していることが知られているが、肝内転移再発に関しては未だ有効な治療法が開発されておらず、新規治療法の開発が急務である。本研究では肝細胞癌の肝内転移再発における治療標的として肝細胞癌症例のマイクロアレイデータベースからLOX (Lysyl oxidase) 遺伝子を抽出した。LOX遺伝子はタンパク質のリジン残基を酸化してアルデヒドにする酵素として生体内に存在する。癌組織においては低酸素腫瘍細胞に多く発現する酵素として知られ、低酸素によって誘導される転移に重要であることが報告されている (2006 Nature)。乳癌においてはLOX遺伝子の発現がHIF-1によって調節され、細胞外マトリックス(ECM)の形成に重要な働きをして転移を助長すると報告されており、その治療標的としての可能性が示唆されている(2009 Cancer Cell, 2016 Cancer Res)。本研究においては、このLOX遺伝子が肝細胞癌の肝内転移再発の治療標的として有用であるか否か、さらにその作用機序解明する事を目的としている。

3. 研究の方法

以下の方法にて肝細胞癌の早期再発に関与する LOX の影響を明らかにする。

肝細胞癌症例のマイクロアレイデータベースから、LOX遺伝子発現とHALLMARK genesetとの相関をGSEAを用いて網羅的解析を行い、LOX高発現と関連の強い因子を同定する

ヒト検体におけるLOX発現と臨床病理学的因子との相関を検討し、予後・再発予測因子としての意義を明らかにする。

肝細胞癌細胞株に対して、LOX発現プラスミドベクターを導入し、LOX遺伝子を標的としたsiRNAを用いて発現抑制を行った細胞株を作成し、LOX遺伝子の機能解析を行う。さらに Invasion assay、Migration Assayを用いて、LOX遺伝子が早期再発・癌進展に必要な浸潤能、遊走能を有しているかを明らかにする。

ヒト癌細胞組織のスライスを用いたex-vivo培養系を用いた、腫瘍微小環境を含んだ状態でのLOX阻害剤のヒト検体における効果を検証する。

4. 研究成果

我々はこれまでに肝細胞癌症例のマイクロアレイデータベースを用いた解析を行い、LOX高発現症例がEMT (Epithelial mesenchymal transition) 関連遺伝子発現と有意に相関しており、ヒト検体における検討においては肝細胞癌術後の早期再発、予後不良に LOX 発

現に関連していることが明らかになった。さらに肝細胞癌細胞株を用いた機能的解析において LOX の上流遺伝子である HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor -1)に着目し、LOX 及び HIF-1 を knock down させたところ、有意に遊走能、浸潤能を抑制されていることが判明し、さらに間葉系マーカーの TWIST、Vimentin、Slug などを有意に抑制していることから、LOX 遺伝子が EMT 関連遺伝子発現を上昇させることで発遊走能・浸潤能を促進させ、肝内転移再発に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umezaki Naoki, Nakagawa Shigeki, Yamashita Yo ichi, Kitano Yuki, Arima Kota, Miyata Tatsunori, Hiyoshi Yukiharu, Okabe Hirohisa, Nitta Hidetoshi, Hayashi Hiromitsu, Imai Katsunori, Chikamoto Akira, Baba Hideo	4. 巻 110(6)
2. 論文標題 Lysyl oxidase induces epithelial mesenchymal transition and predicts intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2033-2043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14010	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中川茂樹、大道清彦、梅崎直紀、小野嘉大、佐藤崇文、林 洋光、今井克憲、井上陽介、山下洋市、伊藤寛倫、高橋 祐、馬場秀夫
2. 発表標題 網羅的遺伝子解析に基づいた肝細胞癌のリスク分類及び治療標的の検索
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅崎 直紀、中川 茂樹、北村 文優、上村 紀雄、中尾 陽佑、伊東山 瑠美、遊佐 俊彦、山尾 宣暢、宮田 辰徳、岡部 弘尚、今井 克憲、林 洋光、山下 洋市、近本 亮、石河 隆敏、馬場 秀夫
2. 発表標題 肝細胞癌におけるLysyl Oxidase高発現はEMTを促進し、早期肝内転移再発及び予後不良に関連する
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Umezaki, Shigeki Nakagawa, Rumi Itoyama, Toshihiko Yusa, Yosuke Nakao, Takanobu Yamao, Tatsunori Miyata, Hirohisa Okabe, Katsunori Imai, Yo-ichi Yamashita, Akira Chikamoto and Hideo Baba
2. 発表標題 Lysyl oxidase induces epithelial-mesenchymal transition and is associated with early recurrence and poor survival in patients with hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy
3. 学会等名 AACR JCA Joint Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------