

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07443

研究課題名（和文）Sleeping Beautyマウス肝発がんモデルを用いた新規肝がん治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for liver cancer using the Sleeping Beauty mouse model

研究代表者

山本 雅大（Yamamoto, Masahiro）

熊本大学・大学院生命科学研究部（保）・教授

研究者番号：30431399

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では遺伝子導入による肝がんモデルにおいて、新規治療法の開発を行った。複数の肝がんモデルを解析することで、NotchシグナルとMyc、シグナル分子A、幹細胞性の3種類の治療標的を明らかにした。試験管内での検討により、それらを標的とした治療の有効性が確認された。動物モデルを用いた検討では、Mycを分子的に阻害することで、強い治療的な効果が確認された。しかしながら、薬剤による検討においては、幹細胞性を標的とした治療方法において部分的に効果が見られたものの、それら治療の動物モデルによる前臨床段階での明らかな治療効果を証明するには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は有効な分子標的治療薬に乏しく治療に難渋することの多い肝がんに対する新規分子標的治療のシーズ探索を目的とした。特に、前臨床段階の遺伝子導入動物モデルによる治療効果の証明までを目標としていたが、残念ながら動物モデルで治療効果を証明するまでには至らなかった。しかしながら、今回検討した3種類の治療方法は試験管内や動物モデルで部分的に治療効果が証明され、その作用点も明らかにすることができた。今後、薬剤の種類や投与方法を工夫し、生体内での有効性を検討するとともに、これらの作用点を患者検体で検討することで、本研究成果をシーズとして新規治療戦略へと発展させていきたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, new treatment methods were developed using gene-introduced liver cancer models. By analyzing multiple liver cancer models, three therapeutic targets were identified: Notch signaling and Myc, signal molecule A, as well as stem cell properties. In vitro studies confirmed the efficacy of treatments targeting these factors. In animal model studies, significant therapeutic effects were observed by molecularly inhibiting Myc. However, while partial effects were seen in treatments targeting stem cell properties in drug studies, clear therapeutic effects in preclinical stages using animal models could not be demonstrated.

研究分野：実験病理学

キーワード：肝癌 肝細胞癌 胆管細胞癌 Sleeping Beautyトランスポゾン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 肝がんは、主に肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) と肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) の2種類の組織型からなる。肝がんは膵がんに次いで予後が悪い腫瘍であるが、その原因のひとつは進行例に対して高い有効性を示す分子標的治療がないことである。HCC に対しては、マルチキナーゼ阻害剤が用いられるが、それらはバイオマーカーに基づくものではなく、十分な効果があるとは言い難い (引用文献)。また、ICC に対しては FGFR 遺伝子異常に対する FGFR 阻害剤が用いられているが、その有効性はまだ十分に証明されていないことに加え、FGFR に異常のない ICC も多数存在している ( )。

(2) 本研究代表者は、Sleeping Beauty (SB) トランスポゾンを用い、複数のがん関連遺伝子をマウス肝細胞に生体内で導入することで肝腫瘍を誘導し、肝腫瘍の病理学的解析を通してがん関連遺伝子の肝発がんにおける役割を明らかにしていた。特に、1 ミリスチル化 AKT (myrAKT) と恒常活性化型 YAPS127A により誘導される ICC モデル (AKT/YAP モデル) ( )、2 myrAKT と恒常活性化型 HRAS (HRASV12D) により誘導される高分化型 HCC モデル (AKT/HRAS モデル) ( ) および 3 HRASV12D と c-Myc により誘導される幹細胞性を示す HCC モデル (HRAS/Myc モデル) ( ) の3つの異なる特徴を示す ICC および HCC モデルを確立していた。

(3) SB トランスポゾンによるマウス肝発がんモデルを用いた分子標的治療の開発が行われてきており、一定の成果を挙げていた。本研究代表者がこれまでに確立してきた SB トランスポゾン肝がんモデルにおいて、導入遺伝子の組み合わせに特異的かつその発がんに重要な役割を果たすシグナル伝達経路がその下流で複数活性化してくることを見出していた。それら背景を踏まえて、「シグナル伝達経路の活性化をバイオマーカーとしそれを標的とした新規治療法を開発できる」という発想を得ていた。

### 2. 研究の目的

本研究は、SB 誘導性マウス肝腫瘍を前臨床モデルとして使用し、臨床的に応用可能な肝がんのバイオマーカーに基づく有効な分子標的治療薬の組み合わせを見つけることを目的とする

### 3. 研究の方法

#### (1) SB トランスポゾン肝発癌モデル

SB13 トランスポゼース発現プラスミドとトランスポゼースにより認識されるがん遺伝子等を含むプラスミドを用いた。SB13 と遺伝子を含むプラスミドのモル比は 1:2 で、2つの遺伝子を同時に導入する際は総量 25 µg を 2.5 mL のリンゲル液に融解した。肝細胞にプラスミドを導入するために、雄性 C57BL/6J マウスの尾静脈より 5 - 8 秒でプラスミド液を注射した。

#### (2) 肝腫瘍の組織学的な解析

マウスを、毎週体重を計測しつつ、腹部膨満等の肝腫瘍形成の兆候がないか継続的に観察した。深麻酔したマウスから、門脈から肝臓を ice-cold PBS で灌流した後に、肝組織および肺組織を採取した。組織は、一部を未固定のまま RNA 抽出用に -80°C で保存し、4%リン酸緩衝ホルマリンで固定後パラフィン包埋し、薄切切片を作成した。切片を用いて、形態観察の為にヘマトキシリン・エオジン染色と蛋白質発現検討の為に免疫染色を行った。

#### (3) 肝腫瘍細胞株の樹立

SB トランスポゾンで肝腫瘍を誘導したマウスより肝腫瘍組織を採取し、無菌的にハサミにて細切し、コラゲナーゼにて 37°C、1 時間処理後、セルストレーナーを通した後 10%FBS 添加 DMEM 培地で培養し、肝腫瘍細胞株を樹立した。

#### (4) 肝腫瘍細胞株を用いた薬剤スクリーニング

SB トランスポゾン誘導肝腫瘍より樹立した細胞株を 96 well plate に 1 ウェルあたり 1,000-2,000 個播種し、播種 1 日後より 3 日間スクリーニングに用いる薬剤を複数の濃度で処理した。生細胞数は WST-8 法にて評価した。

#### (5) SB トランスポゾン肝発癌モデルを用いた薬剤効果の評価

SB トランスポゾンによる肝発癌誘導直後または 3 週間後より、薬剤を経口または腹腔内投与し、経時的に体重計測および健康状態観察、in vivo イメージングによる腫瘍量の評価を行った。SB トランスポゾンに用いるプラスミドは、ルシフェリン遺伝子も発現する様に設計されているので、in vivo イメージングによる腫瘍量の評価では、ルシフェリンによる化学発光を IVIS in vivo イメージングシステムで検出・定量した。

投与実験終了時には、肝重量および体重を計測し、肝/体重比を算出し、薬剤の腫瘍サイズに対する効果の評価を行った。また、肝組織は、一部を未固定のまま RNA 抽出用に -80°C で保存し、4%リン酸緩衝ホルマリンで固定後パラフィン包埋し、薄切切片を作成した。切片を用いて、形態

観察の為にヘマトキシリン・エオジン染色と蛋白質発現検討の為に免疫染色を行った。

#### (6) 組織学的腫瘍細胞サイズの評価

組織学的な腫瘍細胞のサイズの評価は、HE 染色標本の顕微鏡画像を撮影し、ImageJ にて腫瘍細胞のサイズを計測した。

### 4. 研究成果

(1) AKT と YAP により誘導される ICC に対する治療法に関して検討を行った。活性化型 AKT と活性化型 YAP を組み合わせると ICC が誘導され、その際に Notch 経路と Myc が活性化することを報告していた( )。そこで、Notch 経路を抑制する  $\gamma$  セクレターゼ阻害剤 R04929097 (RO) と c-Myc の働きを抑制する BET 阻害剤 OTX-015 (OTX) の組み合わせ効果を検討した。まず、AKT と YAP で誘導したマウス ICC より、細胞株を樹立した。RO と OTX の組み合わせは、AKT/YAP 細胞株に対し増殖抑制効果を示した。この発癌過程における c-Myc 阻害の影響を検討するために、c-Myc の転写活性を阻害する蛋白質 MadMyc を AKT と YAP とともに SB でマウス肝細胞に導入した。MadMyc の導入は、AKT/YAP 腫瘍の発癌を著しく抑制し、AKT/YAP 誘導 ICC において c-Myc は重要な役割を果たしていることが明らかになった。AKT と YAP で腫瘍を誘導したマウスに RO と OTX を投与したが、それら薬剤による腫瘍抑制効果は明らかではなかった。

(2) 病理組織標本を使用した検討により、AKT と YAP で誘導した ICC 組織において、シグナル A が活性化していることを明らかにした。AKT/YAP 細胞株を用いた薬剤スクリーニングで、薬剤 A がシグナル A を抑制することを明らかにした。更に、AKT と YAP の組み合わせで ICC を誘導したマウスに遺伝子導入後 3 週間より薬剤 A を投与し薬剤 A の生体内での効果を検討した。in vivo イメージングで、薬剤 A 投与による腫瘍量の評価を行ったが、薬剤非投与群と差がみられなかった。また、屠殺時の肝重量および肝/体重比いずれも薬剤 A の投与で変化がみられなかった。更に、組織学的な検討も行ったが、薬剤 A は腫瘍の組織像に影響を及ぼさなかった。

(3) HRAS と Myc により誘導される幹細胞/肝芽細胞様の性質を示す肝腫瘍に対して、過去に腫瘍細胞の幹細胞性を抑制し分化を誘導するはたらきがあることが報告されている薬剤 X の効果を検討した。HRAS/Myc を肝臓に導入したマウスに対し薬剤 X を投与した実験に関して、肝重量、体重および組織標本を用いた形態的な解析を行なった。腫瘍量を反映する肝/体重比においては、非投与群に比べ投与群で有意な減少は認められなかった。薬剤 X の投与により有意な軽度の体重減少(非投与群:  $22.32\text{g} \pm 0.40$  vs 投与群:  $21.35 \pm 0.41$ ) が認められたので、肝重量のみで比較してみたが肝重量の減少傾向がみられたものの有意な差は認められなかった(非投与群:  $6.88 \pm 0.50$  vs 投与群:  $6.50 \pm 1.33$ )。一方で、組織学的な検討においては、非投与群に比べ投与群の腫瘍細胞は大きい傾向がみられた。実際に、腫瘍サイズを計測し比較したところ、投与群の腫瘍細胞は非投与群より有意に大きかった。以上の検討の結果、薬剤 X は HRAS/Myc 腫瘍の腫瘍量に明らかな効果を示さなかったが、腫瘍形態には大きな効果を示すことが明らかになった。

(4) 本研究を通して、AKT と YAP の ICC モデルで Notch 経路、c-Myc、シグナル A が活性化しており、治療の標的となりうることを明らかになった。また、HRAS と Myc による幹細胞/肝芽細胞様の HCC において、薬剤 X が分化を誘導することが示唆された。更に、in vivo における Myc を抑制する MadMyc 遺伝子導入は、明確な腫瘍抑制効果が見られた。しかしながら、3 種類の in vivo での薬剤投与実験では、いずれにおいても明確な腫瘍縮小効果が得られなかった。in vitro での検討、in vivo の遺伝子導入での検討においては、標的分子阻害により腫瘍を抑制する効果がみられ、それら分子標的治療の端緒が得られた。一方で、in vivo での前臨床的な薬剤投与実験では治療効果が得られず、薬剤投与方法等の更なる検討が必要であった。

#### <引用文献>

- Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. N Engl J Med. 2019;380(15):1450.  
Javle M et al. Phase II Study of BGJ398 in Patients With FGFR-Altered Advanced Cholangiocarcinoma. J Clin Oncol. 36(3):276.  
Goyal et al. TAS-120 Overcomes Resistance to ATP-Competitive FGFR Inhibitors in Patients with FGFR2 Fusion-Positive Intrahepatic Cholangiocarcinoma. Cancer Discov. 2019;9(8):1064.  
Yamamoto M, Xin B, Watanabe K, Ooshio T, Fujii K, Chen X, Okada Y, Abe H, Taguchi Y, Miyokawa N, Furukawa H, Nishikawa Y. Oncogenic Determination of a Broad Spectrum of Phenotypes of Hepatocyte-Derived Mouse Liver Tumors. Am J Pathol. 2017;187(12):2711.  
Xin B, Yamamoto M, Fujii K, Ooshio T, Chen X, Okada Y, Watanabe K, Miyokawa N, Furukawa H, Nishikawa Y. Critical role of Myc activation in mouse hepatocarcinogenesis induced by the activation of AKT and RAS pathways. Oncogene. 2017;36(36):5087.  
Watanabe K, Yamamoto M, Xin B, Ooshio T, Goto M, Fujii K, Liu Y, Okada Y, Furukawa

H, Nishikawa Y. Emergence of the Dedifferentiated Phenotype in Hepatocyte-Derived Tumors in Mice: Roles of Oncogene-Induced Epigenetic Alterations. *Hepatol Commun.* 2019;3(5):697.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ooshio Takako, Yamamoto Masahiro, Fujii Kiyonaga, Xin Bing, Watanabe Kenji, Goto Masanori, Okada Yoko, Suzuki Akira, Penninger Josef M., Nishina Hiroshi, Nishikawa Yuji	4. 巻 73
2. 論文標題 Hepatocyte Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 7 Contributes to Restoration of the Liver Parenchyma Following Injury in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 2510 ~ 2526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31565	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 Liu Yang, Xin Bing, Yamamoto Masahiro, Goto Masanori, Ooshio Takako, Kamikokura Yuki, Tanaka Hiroki, Meng Lingtong, Okada Yoko, Mizukami Yusuke, Nishikawa Yuji	4. 巻 112
2. 論文標題 Generation of combined hepatocellular cholangiocarcinoma through transdifferentiation and dedifferentiation in p53 knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3111 ~ 3124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14996	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 Goto Masanori, Ooshio Takako, Yamamoto Masahiro, Tanaka Hiroki, Fujii Yumiko, Meng Lingtong, Kamikokura Yuki, Okada Yoko, Nishikawa Yuji	4. 巻 1869
2. 論文標題 High levels of Myc expression are required for the robust proliferation of hepatocytes, but not for the sustained weak proliferation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166644 ~ 166644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2023.166644	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 Suzuki Shuhei, Okada Masashi, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Seino Shizuka, Sato Atsushi, Yamamoto Masahiro, Kitanaka Chifumi	4. 巻 295
2. 論文標題 Therapeutic targeting of pancreatic cancer stem cells by dexamethasone modulation of the MKP-1/JNK axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 18328 ~ 18342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.015223	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0件

〔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
---------	---------