

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：17401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25462098
研究課題名(和文) 肝細胞癌進展における TGF-β-Hippo シグナルのクロストークに関する研究

研究課題名(英文) Biological significance of crosstalk between TGF-beta and Hippo pathway in HCC progression

研究代表者
藏元 一崇 (KURAMOTO, Kunitaka)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：10646441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌においてTAZの発現抑制により細胞増殖能が低下、Aktのリン酸化が抑制、強制発現によりAktのリン酸化が促進された。抗がん剤5FU投与下でTAZを発現抑制すると化学療法抵抗性は増大しYAPが発現誘導されていた。この増大した化学療法抵抗性はTAZ/YAPの発現抑制によって改善したため、TAZは肝細胞癌の増殖や予後不良に關与しているが、TAZとYAPは相補的な関係を有し、肝細胞癌の治療戦略においてはTAZ/YAP共に治療標的にすべきと考えた。
一方、TAZの抑制及び強制発現下におけるTGF-β-Smadシグナル変化に関しては明確な変化を認められず、クロストーク存在の可能性は低いと考える。

研究成果の概要(英文)：TAZ expression was associated with worse prognostic outcomes in patients after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. TAZ inhibition reduced cell growth and phosphorylation of Akt. Overexpression of TAZ increased phosphorylation of Akt. Under the treatment with 5-FU, TAZ inhibition enhanced chemoresistance accompanying with YAP expression. Double knockdown of TAZ/YAP diminished the enhanced chemoresistance. Thus, dual targeting of TAZ/YAP is required for effective anti-cancer strategy in HCC. On the other hand, the downregulation or overexpression of TAZ did not show any significant changes in TGF-β-Smad signal. The crosstalk between Hippo-pathway and TGF-β-Smad signal may not be in HCC.

研究分野：消化器外科

キーワード：TAZ YAP Chemoresistance TGF-

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は肝癌の 95%を占め、全癌死の 10%を占める主な癌死因となっている。最近では生活習慣病患者に伴う肝発癌の増加が指摘されており、さらなる肝細胞癌進展の機構解明ひいては新規治療戦略の構築が必要である。TGF-β-Smad シグナルは癌細胞に対しては上皮間葉転換(EMT)を誘導し、癌の浸潤・転移に参与する。

2. 研究の目的

申請者らのこれまでの実験結果に基づき、腫瘍抑制シグナル Hippo pathway の構成成分 TAZ を抑制することで肝細胞癌の進展が抑制される、という仮説を立てた。

3. 研究の方法

Hippo pathway の構成成分 TAZ の発現についてヒト肝細胞癌組織および細胞株を用いて検討した。TAZ の発現抑制系、過剰発現系を作成し、TGF-β-Smad シグナルへの影響ならびに細胞増殖能や化学療法抵抗性に与える影響を検討した。

4. 研究成果

肝細胞癌における TAZ の免疫染色において約半数で TAZ の発現を認め、また癌部の凍結標本から抽出した RNA における TAZ mRNA レベルの高発現が予後不良因子であることを確認している。In vitro の実験においては、TAZ 高発現肝細胞癌株に対して siRNA を用いた TAZ の発現抑制によって細胞増殖能が低下し、western blot により Akt のリン酸化が抑制された。さらに TAZ 低発現肝細胞癌株に TAZ を強制発現させることで Akt のリン酸化が促進されることも確認した。TAZ の化学療法抵抗性における役割を検討したところ、抗がん剤 5FU 投与条件下において TAZ を発現抑制したところ、予想に反して化学療法抵抗性が増す現象を確認した。こ

の化学療法抵抗性の増大に参与する分子機構については、TAZ の発現低下に伴って Hippo-pathway のもうひとつの構成成分であり YAP が発現誘導されており、この化学療法抵抗性は TAZ/YAP の double knockdown によって改善される結果を得ている。すなわち、TAZ は PI3K/Akt pathway を介して肝細胞癌の増殖や予後不良に参与している可能性が示唆されたが、TAZ と YAP は相補的な関係を有し、肝細胞癌の治療戦略においては TAZ/YAP とともに治療ターゲットにすべきと考察された。

一方で、TAZ の抑制および強制発現下において、TGF-β-Smad シグナルの変化を検討したが明らかな変化を認めるまでには至らず、クロストークが存在する可能性は低いと考えられた。

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 2 件)

Hayashi H, Higashi T, Yokoyama N, Kaida T, Sakamoto K, Fukushima Y, Ishimoto T, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Oki E, Beppu T, Baba H. An Imbalance in TAZ and YAP Expression in Hepatocellular Carcinoma Confers Cancer Stem Cell-like Behaviors Contributing to Disease Progression. *Cancer Res*, 75(22):4985-97, 2015.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0291.

Higashi T, Hayashi H, Ishimoto T, Takeyama H, Kaida T, Arima K, Taki K, Sakamoto K, Kuroki H, Okabe H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Beppu T, Baba H. miR-9-3p plays a tumour-suppressor role by targeting

TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 14;113(2):252-8, 2015
doi: 10.1038/bjc.2015.170.

〔学会発表〕(計 18 件)

東孝暁、林洋光、甲斐田剛圭、有馬浩太、高城克暢、岡部弘尚、新田英利、橋本大輔、近本亮、別府透、馬場秀夫、「スタチンはTAZを抑制して肝細胞癌に対する抗腫瘍効果を発揮する」、第24回日本がん転移学会学術集会・総会、2015年7月23日、シティプラザ大阪(大阪府・大阪市)

坂本慶太、林洋光、東孝暁、甲斐田剛圭、武山秀晶、岡部弘尚、新田英利、近本亮、別府透、馬場秀夫、「肝細胞癌におけるYAP/CXCL12を軸とした腫瘍間質反応」、第70回日本消化器外科学会総会、2015年7月15日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

黒木秀幸、林洋光、中川茂樹、東孝暁、橋本大輔、新田英利、近本亮、石河隆敏、別府透、馬場秀夫、「TSP-1を介したTGF- β 活性化機構抑制による肝切除術後の肝再生促進療法」、第27回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2015年6月13日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA(東京都・港区)

林洋光、東孝暁、坂本慶太、武山秀晶、甲斐田剛圭、新田英利、橋本大輔、近本亮、別府透、馬場秀夫、「肝細胞癌におけるTAZ/YAPによる化学療法抵抗性獲得機構の解明」、第27回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2015年6月12日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA(東京都・港区)

Takaaki Higashi, Hiromitsu Hayashi, Hideaki Takeyama, Takayoshi Kaida, Kota Arima, Katsunobu Taki, Hirohisa Okabe, Hidetoshi Nitta, Daisuke Hashimoto, Akira Chikamoto, Toru Beppu, Hideo Baba. "miR-9-3p plays a tumor-suppressor role by targeting TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma cells." AACR Annual Meeting 2015, 2015年4月21日, Pennsylvania Convention Center (Pennsylvania, USA)

東孝暁、林洋光、井上梨沙、武山秀晶、甲斐田剛圭、有馬浩太、高城克暢、坂本慶太、坂田和也、新田英利、橋本大輔、

近本亮、別府透、馬場秀夫、「肝細胞癌における予後因子であるTAZを制御するmicroRNAの同定」、第25回日本消化器癌発生学会総会、2014年11月13日、ホテル日航福岡(福岡県福岡市)

坂本慶太、林洋光、東孝暁、武山秀晶、新田英利、近本亮、石河隆敏、別府透、馬場秀夫、「肝細胞癌におけるYAP/CXCL12を軸とした腫瘍間質反応」、第25回日本消化器癌発生学会総会、2014年11月13日、ホテル日航福岡(福岡県福岡市)

東孝暁、林洋光、甲斐田剛圭、有馬浩太、高城克暢、坂本慶太、黒木秀幸、新田英利、橋本大輔、近本亮、別府透、馬場秀夫、「TAZを制御するmicroRNAの同定」、第73回日本癌学会学術集会、2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

坂本慶太、林洋光、東孝暁、武山秀晶、新田英利、橋本大輔、近本亮、吉田直矢、石河隆敏、別府透、馬場秀夫、「HCCにおけるCXCL12/CXCR4を介したYAPとCAFとの関連」、第73回日本癌学会学術集会、2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

林洋光、黒木秀幸、東孝暁、横山奈緒美、坂本慶太、阿部真也、新田英利、橋本大輔、近本亮、別府透、馬場秀夫、「肝細胞癌進展におけるHippo-pathwayの転写活性化補助因子TAZの役割」、第26回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014年6月12日、和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市)

黒木秀幸、林洋光、中川茂樹、東孝暁、橋本大輔、新田英利、近本亮、石河隆敏、別府透、馬場秀夫、「LSKL peptide投与によるTGF- β 活性化を介した肝再生抑制機構をターゲットとした肝再生療法の開発」、第26回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014年6月11日、和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市)

Hiromitsu Hayashi, Hideyuki Kuroki, Shigeki Nakagawa, Takaaki Higashi, Keita Sakamoto, Naomi Yokoyama, Takatoshi Ishiko, Toru Beppu, Hideo Baba. "TAZ (WWTR1), a key transcription co-activator of hippo-pathway, promotes hepatocellular carcinoma progression via PI3K/Akt/mTOR pathway." AACR Annual Meeting 2014, 2014年4月8日, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

Takaaki Higashi, Hiromitsu Hayashi, Hideyuki Kuroki, Shigeki Nakagawa, Keita Sakamoto, Hidetoshi Nitta, Akira Chikamoto, Toru Beppu, and Hideo Baba. "Integrin- 6 is correlated with transforming growth factor (TGF)- mediated epithelial-mesenchymal transition (EMT) and promotes the disease progression of intrahepatic cholangiocellular carcinoma." AACR Annual Meeting 2014, 2014年4月8日, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

Hideyuki Kuroki, Hiromitsu Hayashi, Shigeki Nakagawa, Keita Sakamoto, Takaaki Higashi, Hidetoshi Nitta, Daisuke Hashimoto, Akira Chikamoto, Toru Beppu, Hideo Baba. "LSKL peptide inhibits thrombospondin-1-mediated TGF- signal activation and accelerates liver regeneration after hepatectomy in mice." AACR Annual Meeting 2014, 2014年4月7日, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

東孝暁、林洋光、黒木秀幸、中川茂樹、坂本慶太、横山奈穂美、新田英利、近本亮、別府透、馬場秀夫、「Integrin beta6はTGF betaによる上皮間葉転換を促進し肝内胆管癌の進展に關与する」第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

黒木秀幸、林洋光、中川茂樹、東孝暁、橋本大輔、阿部真也、新田英利、近本亮、石河隆敏、別府透、馬場秀夫、「TSP-1を介したTGF-活性化による肝再生抑制機構をターゲットとした新規肝再生促進療法の開発」第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

林洋光、黒木秀幸、美馬浩介、中川茂樹、新田英利、今井克憲、蔵元一崇、近本亮、別府透、馬場秀夫、「TGF-活性化による肝再生抑制機構の解明と活性化阻害peptideを用いた肝再生促進療法開発」第25回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2013年6月12日、ホテル東日本宇都宮（栃木県・宇都宮市）

林洋光、黒木秀幸、美馬浩介、中川茂樹、新田英利、今井克憲、蔵元一崇、近本亮、別府透、酒井尚雄、馬場秀夫、「TGF活性化機構による肝再生抑制

機構の解明と新戦略の構築」第113回日本外科学会学術集会、2013年4月11日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蔵元 一崇 (KURAMOTO, Kunitaka)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：10646441

(2) 研究分担者

今井 克憲 (IMAI, Katsunori)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60555746

別府 透 (BEPPU, Toru)
熊本大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号：70301372

橋本 大輔 (HASHIMOTO, Daisuke)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80508507

林 洋光 (HAYASHI, Hiromitsu)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：80625773