

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462037

研究課題名(和文) 肝細胞癌特有のc-Met活性化機構に着目した化学療法戦略の構築

研究課題名(英文) Establishment of chemotherapeutic strategy focused on the mechanism of c-Met activation in hepatocellular carcinoma.

研究代表者

唐子 堯(唐偉)(KARAKO (TANG), Takashi (Wei))

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00313213

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)：切除不能症例の予後の悪化や根治術後の高頻度な再発が深刻な問題となっている肝細胞癌の治療においては、新たな化学療法の確立が求められている。本研究では、肝細胞癌細胞に発現するc-Metに着目し、その活性化の阻害が肝細胞癌の増殖や浸潤などに及ぼす効果を検討した。C-Met阻害剤SU11274は、肝細胞癌細胞の増殖及び浸潤をin vitroで阻害する効果を有した。C-Met阻害剤SU11274を作用させた肝細胞癌細胞は、e-cadherinの発現上昇を介して接着性を増強させることを見出した。以上の結果から、c-Metは肝細胞癌に対する化学療法剤開発の標的として有用であると示唆される。

研究成果の概要(英文)：Establishment of new chemotherapy is required for the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) to improve the bad prognosis of patients with unresectable cancer and the frequent recurrence after surgery. In the present study, the effect of c-Met inhibitor on the growth and the invasion of HCC cells was investigated. SU11274, a c-Met inhibitor, was suppressed the proliferation and the invasion of HCC cells in vitro. In addition, the HCC cells treated with SU11274 enhanced its adhesiveness via the up-regulation of e-cadherin. These results suggest that c-Met is a good target for the development of new chemotherapeutic agent.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 c-Met 化学療法剤 転移

1. 研究開始当初の背景

癌による死亡率が上昇し続けている現在の日本において、肝胆膵領域の臓器における癌の患者、なかでも肝細胞癌患者の増加が深刻化している。近年の外科的切除術の進歩によって、切除適応の肝細胞癌症例の予後は肝胆膵外科領域における他の癌疾患と比較して良好だが、術後の再発が非常に高頻度に発生していることが問題となっている。さらに、切除適応外となった症例に関しては依然として予後が悪い。そのため、切除適応外の症例に対する治療や根治術後の補助療法として化学療法が有効となるが、DNA合成阻害剤のような従来の抗癌剤は非特異的な副作用が生じる。それが軽減される化学療法剤として注目されている分子標的治療薬は、肝細胞癌治療においては開発が遅れている。以上のことから、肝細胞癌に対する有効な化学療法の構築が至急の課題となっている。肝癌診療ガイドラインによると、肝細胞癌患者の術後の経過を左右する予後因子として腫瘍数のほか、脈管浸潤が挙げられている。従って、肝細胞癌の化学療法では、腫瘍の増殖抑制のほか、脈管浸潤やそれに伴う肝内転移の抑制を視野に入れた分子標的治療薬の開発が非常に有効であるといえる。

異常プロトロンビン (des-gamma-carboxyprothrombin, DCP) は、主に肝細胞癌細胞から分泌されるタンパク質であり、現在の臨床医療では肝細胞癌の血清学的診断マーカーとして利用されている。一方、最近の研究の成果により、DCPは肝細胞癌細胞の増殖及び浸潤を促進することが見出され、正常プロトロンビンにはない新たな機能を有することが示唆された (Suzuki M et al. J Biol Chem 280,6409-6415,2005)。さらに、DCPによる増殖促進効果は、肝細胞癌細胞膜表面上に発現する肝細胞成長因子受容体 (c-Met) のリン酸化を介して達成されることが示された。また、申請者らによる担癌マウスを用いた *in vivo* 研究では、DCPが腫瘍組織における血管新生の促進に関与することが示唆された (Yue P et al. Eur J Cancer, 47, 1115-1124, 2011.)。従って、DCPとc-Metの相互作用が関係する癌細胞の増殖及び血管新生の促進効果は肝細胞癌組織における特徴的な現象であると考えられ、それを阻害することは肝細胞癌細胞の増殖の抑制のほか、肝細胞癌患者の予後因子である脈管浸潤や肝内転移の発生に必要な血管新生の抑制に有効であることが示唆された。また、DCPは肝細胞癌のマーカータンパク質であるため、DCPによるc-Metの活性化は肝細胞において特異性高く生じる現象といえる。つまり、DCPに基づくc-Metの活性化機構を阻害する薬剤の創出が、肝細胞癌に対して特異性高く作用する分子標的薬の開発につながることを期待される。

我々は近年、ウイルス性肝炎及び肝細胞癌治療に関する新薬開発を目的として、中国・

山東大学と協力し日中間で共同研究体制を築いた。その共同研究体制により設立された山東大学中日新薬スクリーニングセンターを中核として、ターゲットの構造活性相関に基づく新規誘導体の設計を可能にするコンピュータ技術を駆使して新規化合物の合成を行っている。これまでの研究で、申請者らは、癌浸潤において重要な役割を果たす様々な因子をターゲットとした阻害剤を設計・合成し、誘導体ライブラリを構築した。その成果として、*in vivo* 担癌モデルにおいて腫瘍拡大抑制効果を示す抗癌剤候補化合物として複数の化合物を見出した (Qi F et al. Food Chem Toxicol, 50, 295-302, 2012., Gao JJ et al. Microvasc Res, 82, 122-130, 2011., Qi F et al. Cancer Sci, 102, 951-958, 2011.)。しかし、これらの化合物の多くは卵巣癌や消化管癌の細胞に対しては増殖抑制効果を示すものの、肝細胞癌に対しては既存の抗癌剤を超えるような顕著な効果を示さなかった。この結果から、肝細胞癌に対する抗癌剤の開発においては、他の癌種とは異なるメカニズムに着目した標的的探索が求められた。

2. 研究の目的

本研究において我々は、肝細胞癌の脈管浸潤及び肝内転移を抑制し、肝細胞癌患者の術後の予後を改善することができる新規分子標的薬開発を目的として、DCPによるc-Metの活性化機構をターゲットとした新規分子標的薬の開発を行うこととした。加えて、c-Metの活性化機構と肝細胞癌の病態進行との因果関係の解明に関する基礎医学的研究を実施することにより、c-Metの活性化機構に基づく新規化学療法戦略の構築の論理性強化を図ることとした。

3. 研究の方法

3-1. 化合物及び細胞

本研究で使用するc-Met阻害剤SU11274は、Tocris Bioscienceより購入した。その他のc-Met阻害剤は、研究協力者らによって構築された化合物ライブラリから抽出された。

3-2. MTTアッセイ

96ウェルプレートに各種培養細胞を $2-5 \times 10^3$ 個播種し、種々の濃度の化合物を含有させた増殖培地を添加し、37において24-72時間培養した。設定時間経過後、培養液にMTTを添加して4時間培養後、細胞を可溶化して吸光度を測定した。

3-3. 細胞接着解析

6ウェルプレートに各種培養細胞を 1×10^4 個播種し、各種濃度の化合物を勧誘させた増殖培地を添加し、37において24時間培養した。その後、細胞の形態変化を顕微鏡を用いて観察した。

3-4. マトリゲルトランスウェルアッセイ

人工合成マトリゲルへの細胞の浸潤を検討する目的で、BIOCOAT Matrigel invasion chamber を用いた解析を実施した。無血清培地中で 24 時間、37 培養した細胞を各種濃度の化合物と混合し、マトリゲル上に播種した。48 時間、37 培養した後、マトリゲルを除去し、chamber 下部のフィルターに付着した浸潤細胞を Diff-Quick 染色にて検出した。

3-5. ウエスタンブロット解析

c-Met 阻害剤添加条件下で培養した SK-Hep-1 細胞を採取し、タンパク質を抽出した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施しタンパク質を分離後、PVDF 膜への転写を行った。続いて、5%スキムミルクを用いて PVDF 膜をブロッキング処理し、抗 E-cadherin 抗体を 4、overnight で作用させた。2 次抗体を作用させた後、ECL 試薬にて E-cadherin のタンパク質バンドを検出し、解析した。

3-6. 肝細胞癌組織を用いた免疫組織化学的解析

術中採取された肝細胞癌患者由来組織からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、免疫組織化学的染色に供した。抗原賦活化は、クエン酸緩衝液中でマイクロウェーブ処理にて実施した。c-Met 及び DCP の検出には、ウサギ由来抗 c-Met ポリクローナル抗体及びマウス由来抗 DCP モノクローナル抗体を使用した。全ての症例に関して、癌部及び非癌部における DCP の染色像を評価し、その染色性に基づいて症例を群分けした。DCP の発現性と各種臨床病理学的因子との相関性を解析した。

4. 研究成果

4-1. 肝細胞癌細胞の増殖に対する c-Met 阻害剤の効果

各種肝細胞癌細胞に対する c-Met 阻害剤の毒性効果を MTT アッセイ法により解析した。その結果、2.5 μM 以上の濃度において増殖阻害効果がみとめられた(図 1)。未分化細胞である HLE に対する毒性効果は解析した細胞腫の中で最も強く、10 μM においては特に顕著な効果を示した。

4-2. 肝細胞癌細胞の接着性に対する c-Met 阻害剤の効果

肝細胞癌細胞の形態に対する c-Met 阻害剤の効果解析した。肝細胞癌細胞 SK-Hep-1 は、浮遊性を示す形態の細胞と接着性を示す形態の細胞が混在する性質をもつ。その細胞株をモデルとして、c-Met 阻害剤の添加による形態の変化を観察した。その結果、c-Met 阻害剤 SU11274 添加条件下において、接着性を示す形態を有する細胞の割合が増加した(図 2)。以上の結果から、c-Met 阻害剤が肝

細胞癌細胞の接着性を増強させる効果を有することが示唆された。

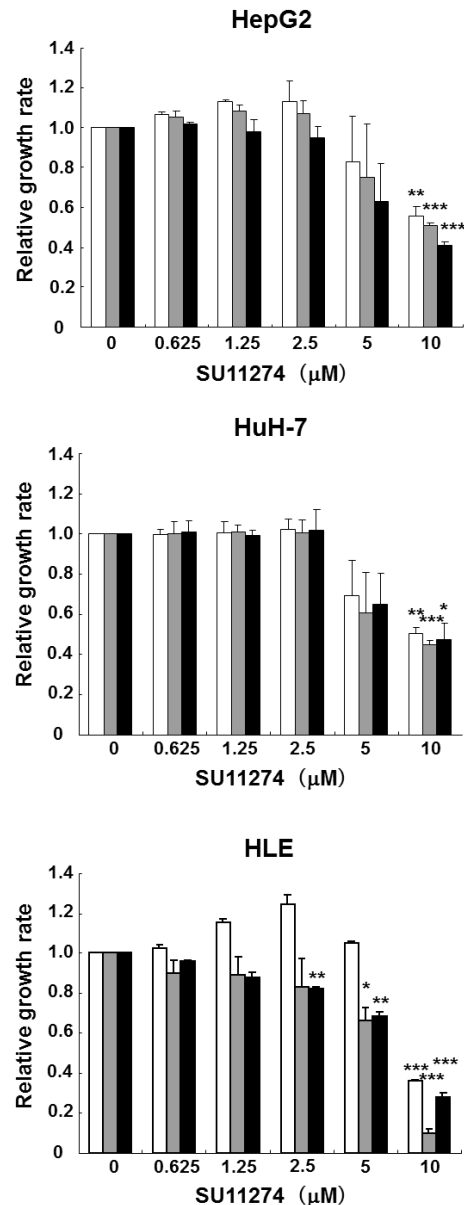


図 1. 各種肝細胞癌細胞に対する c-Met 阻害剤 SU11274 の毒性効果(白: 24 時間培養、灰: 48 時間培養、黒: 72 時間培養)

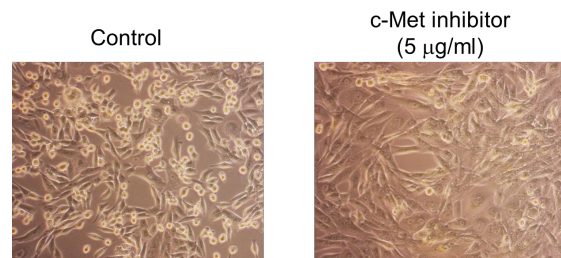


図 2. SK-Hep-1 細胞の形態に対する c-Met 阻害剤の効果

4-3 . 癌細胞の浸潤に対する c-Met 阻害剤

人工コラーゲンゲルを用いたトランスウェルアッセイにより、癌細胞の浸潤に対する効果を解析した。その結果、浸潤細胞数は c-Met 阻害剤濃度 2 μg/mL の条件において有意に減少した(図 3)。この阻害剤濃度では細胞に対する毒性効果はみとめられないことから、浸潤細胞数の減少は細胞の死滅によるものではないと考えられる。前述の通り、c-Met 阻害剤は癌細胞の接着性を増強させる効果を有することから、細胞の接着や移動に關与する分子種が c-Met 阻害剤による作用の影響を受けると考えられる。

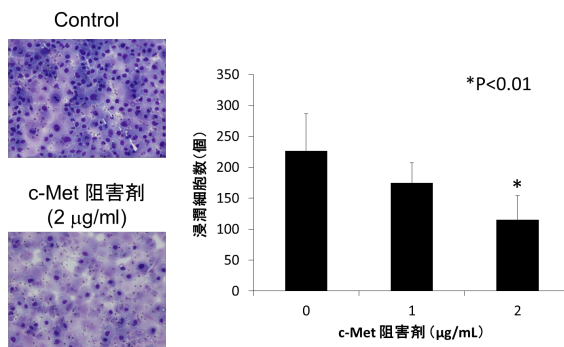


図 3 . 人工コラーゲンゲルを浸潤した細胞の画像と浸潤細胞数

4-4 .c-Met 阻害剤の作用によるタンパク質発現変動の評価

前述の通り、c-Met 阻害剤は癌細胞の接着性や浸潤性に影響を及ぼすことが示された。そこで、これらの減少に關与するタンパク質の発現量をウエスタンブロット法により検討した。その結果、E-cadherin の発現量は c-Met 阻害剤の添加により増大した(図 4)。一方で、上皮間葉転換に關与する twist の発現量は c-Met 阻害剤の添加により減少した。従って、c-Met 阻害剤は、細胞接着分子の発現を増加させて、間葉系への転換に關与する分子の発現量を減少させることから、細胞の接着性を増大させて浸潤を抑制する効果を有すると考えられる。

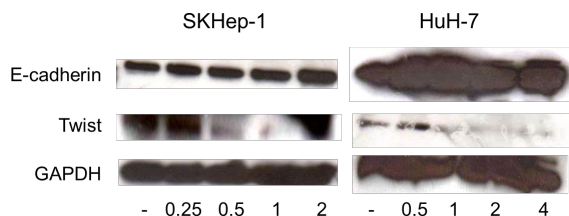


図 4 .c-Met 阻害剤の作用による各種癌細胞の E-cadherin 及び Twist の発現量の変動

4-5 . 肝細胞癌組織における c-Met の発現性と DCP との関連性の評価

153 例の症例から採取された肝細胞癌組織における c-Met 及び DCP の発現性を解析した。その結果、c-Met は 102 例 (66.7%) の組織で癌部での発現陽性がみとめられ、そのうち 36 例 (23.5%) は周辺非癌部においても発現陽性がみとめられた(表 1)。これら癌部での発現陽性症例群、癌部及び非癌部での発現陽性症例群は、それぞれの陰性症例群と比較して有意に肝細胞癌の再発率が低かった(図 5)。また、c-Met のリガンドとして作用することが知られている DCP との発現性を比較したところ、癌部あるいは非癌部において c-Met と DCP が共発現する症例が多く存在することを見出した。以上の結果から、c-Met は多くの肝細胞癌組織において高発現しており、再発率の増大を誘導していると示唆される。c-Met を標的とした化学療法の構築は、肝細胞癌の再発の抑止に有効であると考えられる。

表 1 . 肝細胞癌組織における c-Met 及び DCP の発現性

Sub-group	DCP n (percent)	c-Met n (percent)
C(+)/NC(+)	15 (9.8%)	36 (23.5%)
C(+)/NC(-)	82 (53.6%)	66 (43.1%)
C(-)/NC(+)	5 (3.3%)	8 (5.2%)
C(-)/NC(-)	51 (33.3%)	43 (28.1%)
Total cases	153	153
C(+)	97 (63.4%)	102 (66.7%)
NC (+)	20 (13.1%)	44 (28.8%)

C : 癌部、NC : 非癌部

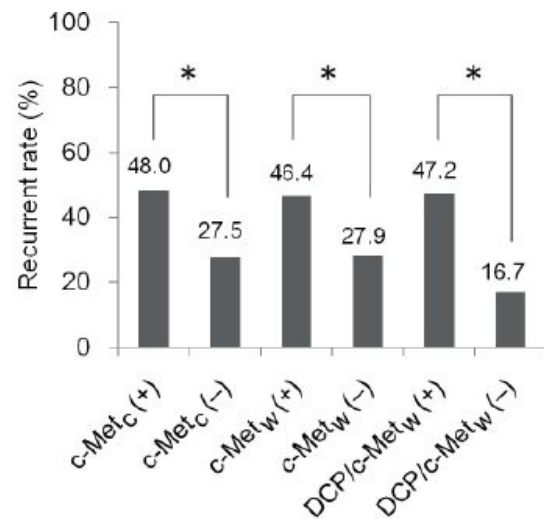


図 5 . 肝細胞癌組織における c-Met の発現性と再発率との関連性

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 10 件)

1 . Song P, Tang Q, Feng X, Tang W.

Biomarkers: evaluation of clinical utility in surveillance and early diagnosis for hepatocellular carcinoma. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2016;245:S70-6.

2. Zhang N, Gui Y, Qiu X, Tang W, Li L, Gober HJ, Li D, Wang L. DHEA prevents bone loss by suppressing the expansion of CD4(+) T cells and TNF α production in the OVX-mouse model for postmenopausal osteoporosis. *Biosci Trends.* 2016;10(4):277-87.

3. Tang Q, Sun Z, Zhang N, Xu G, Song P, Xu L, Tang W. Cost-Effectiveness of Bariatric Surgery for Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Controlled Trial in China. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(20):e3522.

4. Xia J, Gao J, Tang W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Biosci Trends.* 2016;10(1):14-21.

5. Song PP, Xia JF, Inagaki Y, Hasegawa K, Sakamoto Y, Kokudo N, Tang W. Controversies regarding and perspectives on clinical utility of biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2016;22(1):262-74.

6. Sun Z, Tang W, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. A systematic review and meta-analysis of feasibility, safety and efficacy of associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) versus two-stage hepatectomy (TSH). *Biosci Trends.* 2015;9(5):284-8.

7. Song P, Inagaki Y, Wang Z, Hasegawa K, Sakamoto Y, Arita J, Tang W, Kokudo N. High Levels of Gamma-Glutamyl Transferase and Indocyanine Green Retention Rate at 15 min as Preoperative Predictors of Tumor Recurrence in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(21):e810.

8. Han G, Xia J, Gao J, Inagaki Y, Tang W, Kokudo N. Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol. *Drug Discov Ther.* 2015;9(1):1-12.

9. Inagaki Y, Gao J, Song P, Kokudo N, Nakata M, Tang W. Clinicopathological utility of sialoglycoconjugates in diagnosing and treating colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(20):6123-32.

10. Xia JF, Gao JJ, Inagaki Y, Kokudo N, Nakata M, Tang W. Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: recent approaches using HepG2 cell line. *Drug Discov Ther.* 2013;7(1):1-8.

〔学会発表〕(計 9件)

1. Tang W, Song P. Biomarkers: evaluation of screening for and early diagnosis of hepatocellular carcinoma. 15th Bergmeyer Conference Biomarkers in the Diagnosis. 2016年3月7日~9日。Grainau・ドイツ。

2. Tang W, Song P, Kokudo N. Japan-China Collaboration Platform for Medical Research: Promoting Standardized Management of Liver Cancer. 2015年11月28日~29日。上海・中国。

3. Tang W, Song P, Kokudo N. Evidence-based Clinical Practice Guideline for Hepatocellular Carcinoma: Global Frontier Research and Japanese-pattern Experiences. 2015年8月29日~30日。海口・中国。

4. Tang W, Song P, Kokudo N. Evidence-based Clinical Practice Guideline for HCC: Global Frontier Research and Japanese-pattern Experiences. 2015年6月4日~6日。上海・中国。

5. Song PP, Tang W, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N. Clinical utility of simultaneous measurement of DCP and AFP for diagnosis of patients with HCC in China: A multi-center case-controlled study of 1,153 subject. 2014年12月5日~7日。オーストリア・ウィーン

6. Tang W. Perspectives on a combined test of multi serum biomarkers in China: Towards screening for and diagnosis hepatocellular carcinoma at an earlier stage. The 6th Congress of the Chinese chapter of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association. 2014年11月14日~16日。中国・武漢

7. Song PP, Tang W, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N. Hepatocellular carcinoma; The evaluation on standard management and biomarkers in clinical application. Chia-Japan Joint Medical Workshop 2014: Progress in Management on Hepatocellular Carcinoma. 2014年11月14日~16日。中国・成都

8. Song PP, Feng XB, MaKS, Kokudo N, Tang W. Diagnostic value of DCP as HCC marker complementary to AFP in China. The 5th Asia-Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting. 2014年7月11日~13日。台湾・台北。

9. Tang W. Biomarker for Hepatocellular Carcinoma Current Status and Future Perspectives. 2014年7月11日~13日。台湾・台北。

〔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〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

唐子 堯 (KARAKO (TANG), Takashi (Wei))
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00313213

(2) 研究分担者

國土 典宏 (KOKUDO, Norihiro)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：00205361

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし