

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670381

研究課題名(和文) Krasの活性化による癌発生と進展過程におけるCTGFの意義と腫瘍・間質相互作用

研究課題名(英文) Significance of connective tissue growth factor (CTGF) and tumor-stroma interaction in Kras-driven hepatocarcinogenesis and HCC progression

研究代表者

竹原 徹郎 (Takehara, Tetsuo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70335355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Kras変異肝発癌モデルマウスの腫瘍部でCTGFの発現上昇を認め、Ras/Mek/Erk経路の活性化によるCTGF発現上昇が示唆された。このマウスから肝細胞特異的にCTGFを欠損させると腫瘍径、腫瘍個数、肝重量体重比は低下し、組織学的分化度は改善した。ヒト肝細胞癌切除検体においても腫瘍部でCTGF発現は上昇し、肝癌の悪性度に関連していた。CTGFを強制発現させた肝癌細胞株は、単独ではcell viabilityやxenograftモデルでの腫瘍体積に変化を認めなかったが、肝星細胞と混合下ではこれらは増加した。CTGFは肝癌細胞と肝星細胞の腫瘍-間質反応に関与して癌の進展を促進すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Connective tissue growth factor (CTGF) was found to be up-regulated in tumor area in a Kras-mutated HCC mouse model by the activation of Ras/Mek/Erk pathway. Hepatocyte-specific knockout of CTGF in this mouse model revealed significant decrease of tumor diameter, number, and liver/body weight ratio and better tumor differentiation degrees. In surgically resected human HCC, CTGF was up-regulated in tumor area in the same way as Kras-mutated HCC mouse model and CTGF expression levels were shown to be associated with the malignant grade of HCC. Although forced expression of CTGF in HCC cell lines did not affect the in vitro cell viability or tumor volume of xenograft models, they significantly increased in CTGF-overexpressing HCC cell lines in the coexistence of hepatic stellate cells. From these results, CTGF was proven to be the molecule that promotes HCC progression via tumor-stroma interaction between HCC cells and hepatic stellate cells.

研究分野：肝臓病学

キーワード：Kras CTGF 発癌

## 1. 研究開始当初の背景

Kras は Raf-Mek-Erk 経路、PI3K-Akt 経路、Rel-GEF 経路を介して細胞の増殖・生存・遊走能を亢進させる癌遺伝子のプロトタイプである。肝癌においては Kras タンパク自体の変異は数%程度にすぎないが、下流の各経路については高頻度に活性化していることが知られており、肝癌においてもこれらの経路が重要な役割を担っている可能性が示唆されている。申請者は、Kras の活性化が細胞外マトリックスタンパクの一つである結合組織増殖因子(connective tissue growth factor; CTGF)の発現を誘導すること、さらに CTGF の欠損により Kras 肝癌が抑制されることを見出している。

CTGF はこれまでに癌を含めた種々の疾患との関連が報告されており、特に膀胱癌では癌細胞から分泌される CTGF が間質の増生に重要であると報告されている。しかしながら、CTGF と肝癌との関連については未だ十分な解析がなされていない。本申請課題では Kras の活性化による癌発生と進展における CTGF 発現の意義について解析する。

## 2. 研究の目的

肝細胞癌 (HCC; hepatocellular carcinoma) は世界の癌による死亡原因の第三位を占める難治癌であり、手術療法、穿刺局所治療、塞栓療法、薬物療法等が行われるが、薬物療法として唯一有効性の示されている Sorafenib の治療効果は十分でなく、新たな治療標的分子が求められている。

本申請課題では肝癌における CTGF の発現制御機構や産生源、肝癌の発生・進展における意義について、特に腫瘍-間質反応に着目して解明することを目的とし、HCC に対する CTGF を標的とした新規治療法の開発につなげることを目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Kras 変異肝癌モデルマウスの表現型解析

肝細胞特異的に変異型 Kras<sup>G12D</sup> 遺伝子を導入した遺伝子改変マウス (Alb-Cre Kras<sup>G12D/+</sup>マウス; Kras<sup>G12D</sup>マウス) を作成し、その表現型について解析するとともに、肝組織中における CTGF の発現量について評価する。

### (2) CTGF の発現制御機構の検討

肝癌における CTGF の発現制御機構について、各種肝癌細胞株を用いて、Ras 経路との関連に着目して検討する。

Kras 野生型肝癌細胞株に対して上皮成長因子(EGF)を添加して Ras を刺激した場合

Kras 変異型肝癌細胞株において siRNA 法により Kras 遺伝子の発現を抑制した場合

Kras 変異型肝癌細胞株において Ras 経路の下流のタンパク(PI3K、Mek、Erk など)

に対する阻害剤を投与した場合それぞれの CTGF の発現変化についてリアルタイム PCR 法、ウエスタンブロッティング法により評価するほか、培養上清中 CTGF 濃度を ELISA 法により測定し、分泌量の変化について評価する。

また NCI より公開されている肝癌症例 225 例の腫瘍部の microarray data を用いて ssGSEA 解析を行い、Ras 経路の活性化レベルと CTGF の発現レベルの相関について検討する。

### (3) Kras 変異肝癌モデルマウスにおける CTGF の肝癌に与える影響の検討

Kras<sup>G12D</sup> マウスと CTGF<sup>flox/flox</sup> マウスを交配することにより、肝細胞特異的に CTGF を欠損した Kras<sup>G12D</sup> マウスを作成し、8 ヶ月齢における表現型について Alb-Cre Kras<sup>G12D/+</sup> CTGF<sup>+/+</sup> マウス、Alb-Cre Kras<sup>G12D/+</sup> CTGF<sup>flox/+</sup> マウス、Alb-Cre Kras<sup>G12D/+</sup> CTGF<sup>flox/flox</sup> マウスの 3 群間で比較する。

### (4) 臨床検体における CTGF の意義の検討

ヒト肝細胞癌切除例 92 例を対象とし、癌部・非癌部における CTGF の発現レベルをリアルタイム PCR 法にて評価し、腫瘍部における CTGF の発現レベルと腫瘍背景因子との関連について検討する。

### (5) CTGF の強制発現が腫瘍細胞や間質細胞との相互作用に与える影響の検討

5 種の肝癌細胞株 (HepG2、Huh7、Hep3B、HLF、PLC/PRF/5) において CTGF の発現量を比較し、最も発現量の低い細胞株に対して CTGF 発現ベクターを transfection し、CTGF を強制発現した安定細胞株を作成する。

In vitro での cell viability や NOG マウスを用いた xenograft モデルにおける腫瘍体積について強制発現株とコントロール細胞で比較検討する。一方、CTGF は細胞外で種々の液性因子や受容体と相互作用を来す分泌タンパクであるため、肝星細胞等の間質細胞との共培養・混合下における cell viability や腫瘍体積について強制発現株とコントロール細胞で比較検討する。

## 4. 研究成果

### (1) Kras 変異肝癌モデルマウスの表現型解析

Kras<sup>G12D</sup> マウスの肉眼的腫瘍形成率は 3 か月齢までは 0%、4-6 か月齢では 72.7%、7-9 か月齢では 94.1%、10 か月齢以降では 100% であり、コントロールマウス (Alb-Cre マウス) では 0% であった。

Kras<sup>G12D</sup> マウスの肝組織においてはコントロールマウスに比し腫瘍部・非腫瘍部とも CTGF の発現上昇を認め、特に腫瘍部において顕著であった。

### (2) CTGF の発現制御機構の検討

Huh7(Kras 野生型)に対し EGF を添加して Ras を刺激すると、CTGF の発現上昇および培養上清中の CTGF の濃度上昇を認めた。

また HepG2(Kras 変異型)において siRNA 法により Kras 遺伝子の発現を抑制すると、CTGF の発現低下を認めた。さらに HepG2 において PI3K, Mek, Erk の各阻害剤を添加すると、Mek, Erk の阻害剤により CTGF の発現低下を認めた。以上の結果から、Ras/Mek/Erk 経路の活性化により CTGF が誘導されていることが示唆された。

NCI データベース上の肝癌症例 225 例の腫瘍部の microarray data を用いた ssGSEA 解析においても、CTGF の発現レベルは Ras/Raf/Mek/Erk 経路の活性化レベルと有意な正の相関を認めた。

#### (3) Kras 変異肝発癌モデルマウスにおける CTGF の肝癌に与える影響の検討

肝細胞特異的に CTGF を欠損した L-Kras<sup>G12D</sup> マウス(L-Kras<sup>G12D</sup> CTGF<sup>-/-</sup> マウス)を作成すると、L-Kras<sup>G12D</sup> CTGF<sup>+/+</sup> マウスに比し腫瘍径、腫瘍個数、肝重量体重比は有意に低下した。また形成された腫瘍も低分化 HCC の割合が減少し、dysplastic nodule の割合が増加し、組織学的分化度の改善を認めた。

以上の結果から肝細胞特異的な CTGF の欠損により肝癌の進展が抑制され、CTGF が肝癌の進展を促進する分子であることが示唆された。

#### (4) 臨床検体における CTGF の意義の検討

Kras 変異肝発癌モデルマウスと同様、腫瘍部では非腫瘍部に比し CTGF の発現上昇を認めた。CTGF を高発現する HCC は PIVKA-II、門脈浸潤陽性率、予後不良の肉眼型の割合が高値であり、高悪性度であることが示唆された。

#### (5) CTGF の強制発現が腫瘍細胞に与える影響の検討

各種肝癌細胞株における CTGF の mRNA 発現量は HepG2 > Huh7 > Hep3B > HLF > PLC/PRF/5 であった。

そこで PLC/PRF/5 に対し CTGF を強制発現した安定細胞株を作成したが、単独培養下では強制発現株とコントロール細胞の cell viability に差は認めなかった。しかしながら、肝星細胞株 LX-2 との transwell を用いた共培養下においては強制発現株のほうが cell viability の上昇を認めた。

また xenograft モデルにおいても、単独接種下では強制発現株とコントロール細胞の間に腫瘍体積に差は認めなかったが、肝星細胞株 LX-2 との混合接種下においては強制発現株のほうが腫瘍体積の増大を認めた。

以上の結果から、CTGF は肝癌細胞と肝星細胞の腫瘍-間質反応に関与し肝癌の進展を促進する分子であることが示唆された。

以上の検討により、CTGF は肝癌組織中にて発現上昇し、肝癌細胞と肝星細胞の腫瘍-間質反応に関与して肝癌の進展に対して促進的に作用する分子であることが明らかとなり、CTGF を標的とした肝癌の新規治療の可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 10 件)

2014 年 5 月 29 日-30 日 第 50 回日本肝臓学会総会 東京

「Ras 経路活性化を介した肝発癌における CTGF の意義」発表日 5 月 29 日

正田隼人 牧野祐紀 巽智秀 川口司 重川稔 小玉尚宏 阪森亮太郎 宮城琢也 竹原徹郎

2014 年 9 月 25-27 日 日本癌学会第 73 回総会 横浜

“Significance of connective tissue growth factor (CTGF) for the oncogenesis and progression of hepatocellular carcinoma” 発表日 9 月 26 日

Yuki Makino, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Yugo Kai, Yasutoshi Nozaki, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

2014 年 11 月 7 日-11 日 The 65th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, Boston USA

“Significance of Ras pathway and connective tissue growth factor in the development of hepatocellular carcinoma” 11 月 9 日

Yuki Makino, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Takahiro Kodama, Minoru Shigekawa, Yugo Kai, Yasutoshi Nozaki, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

2014 年 10 月 23 日-24 日 第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW2014) 神戸

S7 明日の肝癌診療のためのバイオマーカーの探索

「肝発癌・進展における Ras 経路の活性化と CTGF」 発表日 10 月 23 日

牧野祐紀 正田隼人 竹原徹郎

2015 年 4 月 24 日-4 月 25 日 The 3rd JSGE

International Topic Conference, Sendai  
“Significance of connective tissue growth factor in hepatocellular carcinoma.” 4月24日

Yuki Makino, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Takahiro Kodama, Minoru Shigekawa, Yugo Kai, Yasutoshi Nozaki, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

2015年5月21日-22日 第51回日本肝臓学会総会 熊本

W1 肝細胞癌の亜分類と個別化医療

「肝細胞癌における Ras 経路と CTGF の意義・新規治療標的としての可能性」 発表日 5月21日

牧野祐紀 疋田隼人 川口司 甲斐優吾  
野崎泰俊 中堀輔 齋藤義修 田中聡司  
重川稔 小玉尚宏 阪森亮太郎 宮城琢也  
巽智秀 竹原徹郎

2015年10月8日-10日 日本癌学会第74回総会 名古屋

“Role of connective tissue growth factor in hepatocellular carcinoma” 発表日 10月8日

Yuki Makino, Hayato Hikita, Yasutoshi Nozaki, Kenji Ikezawa, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

2015年10月8日-11日 第19回日本肝臓学会大会 (JDDW2015) 東京

IS-S1 Hepatocellular carcinoma: Molecular approaches for diagnosis, prognosis, and therapy (肝細胞癌の分子診断と悪性度評価)

“Significance of connective tissue growth factor with the malignant grade of hepatocellular carcinoma and its potential for therapeutic target.” 発表日 10月8日

Yuki Makino, Hayato Hikita, Tetsuo Takehara

2015年11月13日-17日 The 66th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, San Francisco USA

“Significance of connective tissue growth factor in hepatocellular carcinoma and its potential for therapeutic target.” 11月17日

Yuki Makino, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Takahiro Kodama, Minoru Shigekawa, Yugo Kai, Yasutoshi Nozaki,

Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

2016年2月20日-24日 The 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Tokyo

“Significance of the up-regulation of connective tissue growth factor in hepatocellular carcinoma.” 2月22日

Yuki Makino, Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Minoru Shigekawa, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹原 徹郎 (Tetsuo Takehara)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70335355

### (2) 研究分担者

疋田 隼人 (Hayato Hikita)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20623044

### (3) 連携研究者

牧野 祐紀 (Yuki Makino)  
大阪大学・大学院医学系研究科・医員  
研究者番号：60771334