

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860535

研究課題名(和文) FAPおよびDPP4から見た肝線維化と肝細胞癌のクロストーク

研究課題名(英文) The crosstalk between Liver fibrosis and Hepatocellular carcinoma in the point of FAP and DPP4

研究代表者

仁科 惣治 (Nishina, Sohji)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70550961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：41例のヒトHCC組織を用いてHCC進展とCD26タンパク発現との関係について検討を行った。その結果、CD26高発現群は低発現群に比べ、stage進行例、被膜外浸潤ならびに組織学的中低分化型が多く、細胞増殖能や血管新生が亢進していた。また、CD26/DPP-4発現肝癌細胞を用いたin vitro解析において、DPP-4阻害薬が細胞増殖に影響を与えなかった。一方、ヌードマウスに肝癌細胞(Huh7)皮下移植モデルを用いてDPP-4阻害薬の抗腫瘍効果を検討したところ、DPP-4阻害薬が腫瘍増殖を抑制した。以上よりDPP-4阻害薬はがんの微小環境に対して抑制的に作用することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：CD26 expression was correlated with cell proliferation, angiogenesis and cell differentiation in HCC specimens obtained from patients. DPP-4 inhibitor did not affect cell proliferation or cell cycle in vitro. However in nude mice, DPP-4 inhibitor significantly suppressed the growth of xenograft tumors in dose dependent manner. DPP-4 inhibitor also induced NK cells infiltrations more vigorously and reduced angiogenesis in xenograft tumors, even though body weight and dietary intake through the feeding period, and glucose tolerance determined at the 14th day of feeding were not different among three groups. These results suggested that DPP-4 inhibitor potentially have antitumor activity against HCC.

研究分野：Hepatology

キーワード：CD26/DPP4 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患では肝線維化が進展するとなぜ肝発癌を来し易くなるのかは不明である。一方、肝線維化を引き起こす活性化型肝星細胞は fibroblast activation protein (FAP) を産生し、血管新生等の癌細胞に有利な微小環境を形成する。また、FAP とともに dipeptidyl peptidase のひとつである dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) は FAP と高い相同性を有し、*in vivo* でヘテロ二量体を形成することが報告されている (PNAS 1994)。肝臓における DPP-4 の局在は血管内皮細胞、リンパ球、毛細胆管で確認されているが、HSC での局在は未だ controversial である。しかし、HSC は肝細胞周囲に存在し、DPP-4 は FAP と高い相同性を持つことから肝線維化ならびに肝発癌に何らかの役割を果たすのではないかという作業仮説を持つに至った。肝細胞癌を有するラットおよびヒト肝組織で DPP-4 の発現が増加していたという報告 (J Gastroenterol Hepatol 1993, J Hepatol 1997) は、まさしくこの仮説を支持するものではないかと考えている。さらには肝細胞癌を合併した 2 型糖尿病患者に対して DPP-4 阻害剤を投与したところ、肝細胞癌の動脈血流低下や腫瘍免疫活性化とともに癌の縮小を認めたという興味深い報告も認められる (肝臓 2012)。このように FAP と DPP-4 は肝線維化を背景とする肝発癌において重要な役割を担っていると推察され、両者が肝細胞癌の発生、発育に適した微小環境を形成するの可否を明らかにしたいという発想に至った。

一方、インスリン抵抗性は肝発癌の重要な病態であり、このため肝細胞癌患者は高頻度に糖尿病を合併する。DPP-4 阻害剤は臨床的に広く投与されている抗糖尿病薬のひとつであるが、DPP-4 は CD26 と呼ばれ細胞外ペプチダーゼ機能以外にも、免疫調節作用等の多様な機能を有した膜タンパクである。近年、CD26/DPP-4 の過剰発現が様々な悪性腫瘍の増殖・浸潤に関連することが指摘されているが、肝細胞癌との関係は全く不明である。さらに、DPP-4 阻害剤が肝細胞癌進展に及ぼす影響も不明である。

2. 研究の目的

本研究において、肝線維化と肝発癌を繋ぐ分子として FAP と DPP-4 に注目し、肝線維化がどのようにして癌の成育に必要な微小環境を形成していくのかについて、とくに血管新生、腫瘍免疫の観点から明らかにしようとした。

さらに、肝細胞癌の進展ならびに治療標的分子としての CD26/DPP-4 タンパクの意義を明らかにするとともに、肝細胞癌に対する

DPP-4 阻害剤の抗腫瘍効果とその作用機序を明らかにしようとした。

3. 研究の方法

A. ヒト肝細胞癌組織を用いた FAP および CD26 発現と肝線維化および肝細胞癌進展との関連性についての臨床検討

根治的肝切除術を受けた肝細胞癌患者 41 例を対象に切除肝癌組織標本を用いて、非癌部組織における FAP および CD26 染色強度と肝線維化との関連性を検討した。

さらに、癌部組織における FAP および CD26 染色強度と腫瘍因子(腫瘍最大径、腫瘍個数、脈管侵襲、分化度、UICC stage 分類、被膜形成、被膜外浸潤)、細胞増殖、血管新生、血液生化学所見との関連性を検討した。

B. DPP-4 阻害剤が肝細胞癌の細胞増殖に及ぼす効果についての検討 (*in vitro*)

以下の a) ~ c) について CD26/DPP-4 発現肝癌細胞 (Huh7) に対する DPP-4 阻害剤の効果を検討した。

a) 細胞増殖 (CCK8 assay)、b) 細胞周期 (Hoechst 33342 染色)、c) 細胞周期関連蛋白 (p21, p27-kip1, p-CDK2, p-Rb) 発現 (Western blotting)

C. ノードマウス xenograft モデルを用いた DPP-4 阻害剤の抗腫瘍効果についての検討

6 週齢雄のノードマウス (BALBc-nu/nu) に対し、CD26/DPP-4 発現肝癌細胞 (Huh-7) 1×10^7 cell を皮下移植した。腫瘍径が 100-150mm² となった時点で、

MF 食 (control 群)

DPP-4 阻害薬添加 MF 食 (100mg/kg/day; 低用量群)、

DPP-4 阻害薬添加 MF 食 (300mg/kg/day; 高用量群)

を 21 日間連日で経口投与する 3 群に分け、以下の項目を経時的に検討した。

a) 体重、b) 食事量、c) ブドウ糖負荷試験 (OGTT)、d) 生化学検査、e) 腫瘍組織中の CD26 蛋白発現、f) 血清/腫瘍組織中 DPP-4 活性、g) 腫瘍体積、h) 腫瘍増殖能 (MIB-1 Labeling Index)、i) 血管新生 (CD34 染色陽性 micro vessel density)、j) 腫瘍組織への NK 細胞浸潤 (NKp46 免疫染色)

4. 研究成果

A. ヒト肝細胞癌組織を用いた FAP および CD26 発現と肝線維化および肝細胞癌進展との関連性についての臨床検討

非癌部における肝線維化進展度および FAP, CD26/DPP-4 発現と肝細胞癌進展度との関連性は認められなかった。

また、癌部における FAP 発現と肝細胞癌進展度(stage, 分化度, 被膜外浸潤, 細胞増殖)との関連性も認められなかった。

しかし、癌部組織における CD26 高発現群は低発現群に比べ、stage 進行例、被膜外浸潤ならびに組織学的中低分化型が多く、細胞増殖能(MIB-1 labeling index)が亢進しており、さらに癌部CD26染色強度は血管新生(CD34染色陽性 microvessel density)と関連していることも明らかにした。

B. DPP-4 阻害剤が肝細胞癌の細胞増殖に及ぼす効果についての検討 (in vitro)

今回 CD26/DPP-4 発現肝癌細胞を用いた in vitro 解析において、DPP-4 阻害薬(1 μM, 10 μM, 100 μM) は細胞増殖能(CCK8 assay)、および細胞周期 (Hoechst 33342 染色) に有意な影響を与えなかった。

さらに Western blotting の検討において、DPP-4 阻害薬は細胞周期関連蛋白(p21, p27-kip1, p-CDK2, p-Rb) の蛋白発現にも有意な影響を与えなかった。

C. ノードマウス肝癌細胞皮下移植 xenograft モデルを用いた DPP-4 阻害剤の抗腫瘍効果についての検討

MF 食(control 群)、DPP-4 阻害薬添加 MF 食(100mg/kg/day; 低用量群)、DPP-4 阻害薬添加 MF 食(300mg/kg/day; 高用量群)の3群間において、

(A) 体重推移、(B) 食事量推移、(C) OGTT データ、(D)AUC glucose 0-120 min、(E) 生化学的特徴(空腹時血糖、空腹時インスリン濃度、TG、T-cho、LDL-cho)すべての項目で有意差を認めなかった。

また、皮下腫瘍組織中の CD26/DPP-4 蛋白発現(CD26免疫染色)においても上記3群間では有意差を認めなかった。血清中 DPP-4 活性は、control 群 > (DPP-4 阻害剤)低用量群 > (DPP-4 阻害剤)高用量群 の順に抑制されていた。

皮下腫瘍の肉眼的観察において、DPP-4 阻害剤の投与は、移植された肝癌細胞の腫瘍体積を有意に減少させた。具体的には、Control 群と比べ DPP-4 阻害剤投与群において、投与量に依存した腫瘍体積減少作用が認められた。

今回の検討における結論として、肝細胞癌患者における肝線維化進展および FAP, CD26 発現と肝細胞癌進展度との関連性は認められなかった。しかし、今回の臨床検討において肝細胞癌の分化度, stage, 被膜外浸潤, 細胞増殖能, 血管新生と癌部 CD26 発現との関連性が示された。以上より、肝細胞癌進展におけるバイオマーカーとしての CD26/DPP-4 の有用性、および CD26 /DPP-4 を標的とした治療戦略が望まれる。

また、CD26/DPP-4 発現肝癌細胞株(Huh7)を用いた実験では、DPP-4 阻害剤が細胞増殖能に影響を及ぼさなかった。一方、ヌードマウス肝癌細胞皮下移植 xenograft において DPP-4 阻害剤が NK 細胞浸潤亢進もしくは血管新生抑制とともに腫瘍の増大抑制効果を示した。そのため DPP-4 阻害薬は、癌組織の微小環境への影響を介した抗腫瘍効果を有する可能性が考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1. 仁科惣治、肝細胞癌治療標的としての CD26(DPP-4)の分子生物学的解析、第 41 回日本肝臓学会西部会、2015 年 12 月 4 日、名古屋国際会議場(名古屋)

2. Sohji Nishina、DPP-4 inhibitor, anagliptin suppress the progression of Hepatocellular carcinoma、AASLD The Liver Meeting 2015、2015 年 11 月 17 日、サンフランシスコ(アメリカ)

3. Sohji Nishina、CD26(DPP-4) as a molecular target for HCC treatment、第 19 回日本肝臓学会大会(International Session)、2015 年 10 月 9 日、グランドホテル新高輪(東京)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 肝細胞癌の予防又は治療のための医薬
発明者: 仁科惣治、日野啓輔、後藤守兄

権利者: 同上

種類: 特許願

番号: 特願 2015-09736

出願年月日: 平成 27 年 4 月 27 日

国内外の別: 国内

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

仁科 惣治 (Nishina Sohji)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号： 70550961

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：