

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09383

研究課題名(和文) 肝癌由来増殖因子とヌクレオリンの機能解析による新たな肝癌治療の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for liver cancer by the functional analysis of the hepatoma-derived growth factor and its receptor, nucleolin

研究代表者

榎本 平之 (Enomoto, Hirayuki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40449880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは肝癌の増殖に関与する新たな因子であるHepatoma-derived growth factor (肝癌由来増殖因子、以下HDGFと記す)を発見した。本検討ではHDGFの機能的レセプターであるNucleokin (NCL)の肝癌での発現、またHDGF抑制が分子標的薬Sorafenibとは異なる機序で肝癌の増殖を抑制できることを明らかにした。加えてHDGFによるmicroRNA変動を検討し、2種の異なる肝癌細胞株で共通して増減するものを抽出した。以上より肝癌増殖に関して、HDGFの役割を含めて新たな知見を得ることが出来たと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではHDGFが新たな肝癌治療の標的となりうること、またHDGFの投与で変動するmicroRNAを新たに同定した。これらの知見は、肝癌増殖機序解明と治療法開発への貢献が期待できる。またHDGFは肝癌以外にも様々な臓器における癌増殖への関与が報告されている。したがって本研究の結果は、多種類の癌の増殖機序解明へつながることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：We discovered a new factor involved in the growth of liver cancer, hepatoma-derived growth factor (HDGF). In this study, we found that the nucleokin (NCL), a functional receptor of HDGF, was expressed in hepatoma cells. In addition, reduction of HDGF suppressed the growth of hepatoma cells through the mechanism which was different from the sorafenib treatment. In addition, we examined the changes in the microRNA expressions in response to the HDGF administration, and identified the microRNAs that commonly increased or decreased in two different hepatoma cell lines. These results provide new findings regarding the growth of liver cancer and are expected to contribute to develop a new treatment strategy for the liver cancer.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝癌由来増殖因子 肝細胞癌 microRNA Nucleolin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の抗ウイルス治療の進歩に伴い、C型肝炎ウイルス(HCV)の排除率は100%近くまで上昇している。しかしながら我が国では高齢あるいは肝線維化が進展した症例が多く、今後HCV排除後の肝予備能良好な状態で発癌する例は増加すると考えられる。こうした症例の多くは再発を繰り返し、最終的に治療が困難な高度進行癌へと進展して不幸な転記をたどる。これまで肝癌に対して多数の分子標的治療が試みられてきたが、研究開始当時 VEGF を標的とした Sorafenib 以外には有効性が証明されたものはなく、今も十分な効果のある薬剤は開発されていない。それゆえ既存の治療とは異なる視点に基づく新たな治療の開発は重要である。

我々は肝癌の増殖に関与する新たな因子を求め、完全無血清培地で増殖可能な肝癌細胞株 Huh-7 の培養上清より Hepatoma-derived growth factor (肝癌由来増殖因子、以下 HDGF と記す) を発見し、更にその cDNA のクローニングにも成功した。これまでに我々は、HDGF が肝細胞の増殖因子として働き、未分化な肝細胞や肝癌細胞に対する増殖促進作用を有することを報告してきた。更に我々は HDGF が肝細胞癌で高発現しており、その発現レベルが肝臓癌手術後の患者の再発や予後の指標となることも示してきた。また我々は HDGF が血管新生誘導因子としても作用して癌の進展に関与することを見出した。これまで遺伝子導入や発現抑制、また DNA チップやウエスタンブロット、レポーターアッセイなどによって HDGF の機能解析を行ってきたが、更にエピゲノミックな視点から HDGF の作用と発現制御の解明を行うことを計画した。また最近 Nucleolin (NCL) が癌細胞の細胞表面に発現し、HDGF がそれに結合して細胞増殖を促進させる可能性が報告されたため、NCL の肝癌増殖への関与の可能性についての検討も合わせて計画した。

2. 研究の目的

我々はこれまでにビタミン K などによる HDGF mRNA の抑制を明らかにしたが、その HDGF の抑制効果は十分なものとはいえなかった。本研究は HDGF の制御やその作用について、これまでのゲノミックを中心とした検討に加え、micro RNA を含むエピゲノミックな機序、また HDGF に結合するタンパクである NCL を含めた検討を行うものである。これまで多数の分子標的薬が開発されたが、残念ながら肝細胞癌への有効性のある薬剤は少なく、またその効果も限定的である。本研究はこれまで薬剤開発の行われていない新規の増殖因子の作用と機能制御とに関する検討であり、将来的に肝細胞癌の発症や再発の予測、新規治療開発に貢献するような新知見が得られることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) HDGF の肝癌増殖作用に関する micro RNA 解析

異なる2つの肝癌細胞由来の株 SK-Hep1 および HepG2 細胞を用い、培養液に recombinant HDGF タンパク (100ng/mL) を添加して増殖刺激を加えた。その後 total RNA を抽出し、アレイシステムを用いて HDGF の作用によって誘導あるいは抑制される microRNA を同定した。

(2) HDGF 抑制と Sorafenib の併用による肝癌増殖抑制の検討

培養肝癌由来細胞株に対して Sorafenib を添加し、HDGF 発現に及ぼす影響を検討した。また HDGF の発現抑制株を用いた Sorafenib による肝癌増殖抑制効果についての検討を行った。すなわち Control 細胞に対して、「Sorafenib 投与」、「HDGF 抑制」、「Sorafenib 投与と HDGF 抑制の併用」の3つの効果を比較した。

(3) Nucleolin (NCL) の肝癌増殖への関与についての解析

NCL は HDGF の機能的レセプターとされ、HDGF/NCL の結合で HDGF の産生が増加する positive feedback が提唱されている。そこで抗 NCL 抗体を用いた免疫染色を行い、肝癌細胞株である HepG2 細胞と SK-Hep1 細胞での NCL の発現について検討した。

4. 研究成果

(1) HDGF の肝癌増殖作用に関する micro RNA 解析

HepG2 細胞および SK-Hep1 細胞は、いずれも肝癌由来の細胞として分類されるが、興味深いことに HDGF の刺激で変動する microRNA は大きく異なっていた。しかしながら HDGF の刺激によって2つの細胞株に共通して増加する microRNA が32種、また共通して減少する microRNA が2種特定された。このなかには miR-362-5p や miR-4534、miR-133b といった癌増殖との関連が報告されているものが含まれていた。

(2) HDGF 抑制と Sorafenib の併用による肝癌増殖抑制の検討

肝癌細胞株における HDGF の発現は Sorafenib の影響を受けないことをこれまでに報告して

いる。一方で HDGF 発現抑制株に対する Sorafenib 投与の効果について検討したところ、HDGF の抑制は *in vitro* での Sorafenib の肝癌抑制効果を増強することが明らかとなった (図 1)。したがって HDGF の発現抑制は、Sorafenib とは異なる機序によって肝癌増殖を抑制していることが考えられた。

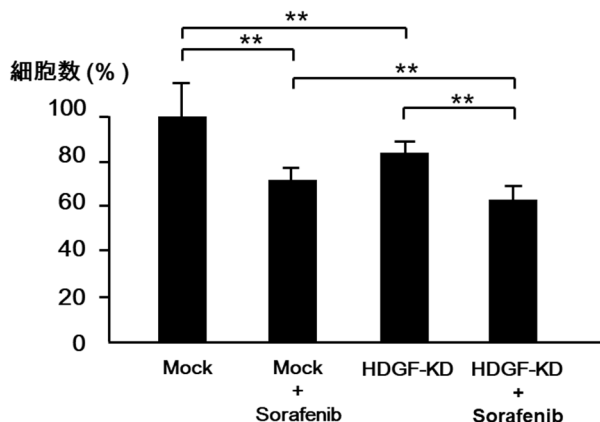


図 1: HDGF 抑制と Sorafenib の併用による肝癌細胞増殖の増強効果
Mock: コントロール細胞, HDGF-KD : HDGF 抑制細胞 (**p<0.01)

(3) Nucleolin (NCL) の肝癌増殖への関与についての解析

NCL は HDGF の機能的レセプターとして報告され、上述のように HDGF/NCL の結合で HDGF の産生が増加する。さらには NCL の核内から細胞表面への移行も促進され、HDGF/NCL の結合が更に促進されることも提唱されている。肝癌細胞株に対して免疫染色を行ったところ、実際に NCL が肝癌細胞株で発現していることが確認され、HDGF/NCL による増殖機序を示唆する結果であった (図 2)。

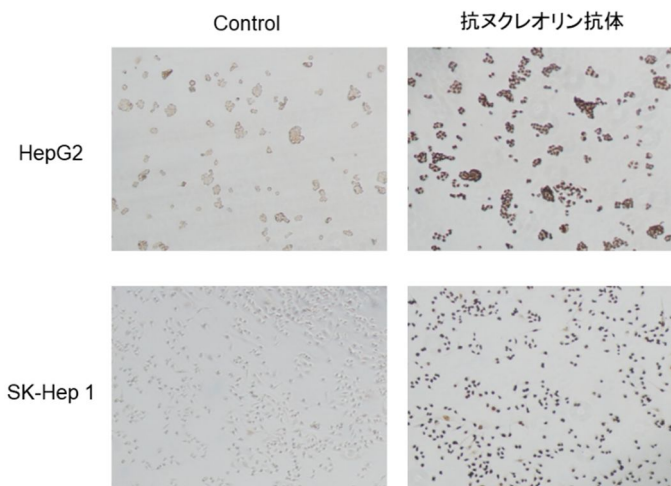


図 2: 肝癌細胞株におけるヌクレオリンの発現

(4) 結果の総括

本検討では HDGF の機能的レセプターである NCL が肝癌で発現すること、また HDGF 抑制は Sorafenib とは異なる機序で肝癌の増殖に関与することを明らかにすることもできた。加えて HDGF による microRNA 変動を検討し、2 種の異なる肝癌細胞株で共通して増減するものを抽出した。これらには癌の増殖との関連を示唆されているものも含まれており、肝癌増殖機序解明への今後の貢献への期待もできると思われる。以上より肝癌増殖に関して、HDGF の役割を含めて新たな知見を得ることが出来たと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Enomoto H, Nakamura H, Nishikawa H, Nishiguchi S, Iijima H	4. 巻 21
2. 論文標題 Hepatoma-Derived Growth Factor: An Overview and Its Role as a Potential Therapeutic Target Molecule for Digestive Malignancies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4216 ~ 4216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124216	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 Enomoto H, Nakamura H, Nishikawa H, Nishimura T, Iwata Y, Nishiguchi S, Iijima H	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Hepatocellular Carcinoma-associated microRNAs Induced by Hepatoma-derived Growth Factor Stimulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) -	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Enomoto H, Nishiguchi S, et al.
2. 発表標題 Identification of microRNAs potentially associated with HDGF(hepatoma-derived growth factor)-stimulating cellular proliferation in hepatoma cells
3. 学会等名 JSH International Liver Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Enomoto H, Nishiguchi S, et al.
2. 発表標題 Hepatoma-derived growth factor as a potential therapeutic target for
3. 学会等名 The 25th APASL Single Topic Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本平之、中村秀次、西口修平 他
2. 発表標題 肝癌由来増殖因子(HDGF)によるmicroRNA変動の検討
3. 学会等名 第42回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榎本平之、辻村亨、西口修平
2. 発表標題 Sorafenibの抗腫瘍効果増強の試み：インターフェロン併用の可能性について
3. 学会等名 第52回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Enomoto H, Nakamura H, Nishikawa H, et al.
2. 発表標題 Anti-HDGF (hepatoma-derived growth factor) treatment as a possible new therapy for hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔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
研究 分担 者	西口 修平 (Nishiguchi Shuhei) (10192246)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	