

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年～2008 年
 課題番号：19591576
 研究課題名（和文） 肝前駆細胞由来肝癌の発癌・進展に関わる microRNA とその診断・治療への応用
 研究課題名（英文） MicroRNAs and their potential for cancer development in hepatocellular and cholangiocellular carcinomas derived from hepatic progenitor cells.
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：大塚 将之（OHTSUKA MASAYUKI）
 所属機関・部局・職：千葉大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：90334185

研究成果の概要：

肝切除時ミラノ基準内で、その後ミラノ基準外の再発をきたしたものと、肝切除時ミラノ基準外であったものの再発を認めなかった症例と比較すると 67 遺伝子が前者で発現増強していた。肝細胞癌においては 36%の症例に ezrin 発現がみられ、CK19 の発現と有意に関連しており、それは独立した有意な再発危険因子であることを見出した。JHH1 株に対して siRNA を利用し、ezrin 発現を抑制すると増殖能が抑制された。肝内胆管癌では Notch2 が癌細胞に、そのリガンドである Jagged1 が癌細胞と間質細胞に発現していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝細胞癌、肝内胆管癌、肝前駆細胞、遺伝子発現プロファイリング、ezrin、Notch、microRNA

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は正常細胞の genetic あるいは epigenetic な変異の集積として発生するため、長期の lifespan をもった細胞のみが悪性転化する機会を有すると考えられている。肝臓においては、腸管や表皮など turn over の早い成熟細胞を有する組織とは異なり、成熟した肝細胞や胆管細胞自体ある程度の lifespan があるためそれら自体、癌化のタ

ーゲットとなりうるが、肝内にもその存在が広く認められるようになった幹細胞・前駆細胞も腸管や表皮など同様に、癌の起源細胞となりうると考えられている。肝前駆細胞は、何らかの肝障害時に、特に成熟肝細胞や胆管細胞の複製が制限された時に、活性化され、肝細胞及び胆管細胞両者に分化しうる。これらは、ラットやマウスといった小動物において証明されてきたが、ヒ

トにおいても、慢性ウイルス性肝炎を含む多くの慢性肝障害時において主にテロメアの短縮から成熟細胞の複製が制限されていることが示され、肝前駆細胞活性化のトリガーとなっていることが明らかになっている。これらは病理学的にはductular reactionと呼ばれる反応として認識され、それらのマーカーとしてはサイトケラチン(CK)7、CK19、OV-6など成熟胆管細胞と共通するマーカーや、 α フェトプロテイン(AFP)、delta-like protein (dlk)など胎児肝細胞マーカー、Hepar-1やアルブミンなど成熟肝細胞マーカー、Thy-1やc-kitなど造血幹細胞マーカーがあり、肝前駆細胞の分化の程度に応じてそれらマーカーの発現が認められると報告されている。B型・C型慢性ウイルス性肝炎をはじめとする慢性肝障害は肝細胞癌の最も大きなリスクファクターであり、近年肝内胆管癌においても慢性肝障害との関連が指摘されているが、活性化した肝前駆細胞を有する肝臓における発癌という点から肝前駆細胞が癌化のターゲット細胞として重要な位置を占めることが示唆される。実際、肝細胞癌の中には、成熟肝細胞には認められないCK7やCK19といった肝前駆細胞が有する形質をもつ症例があることが報告され、また、肝内胆管癌においてもCK7やCK19といった胆管細胞マーカーに加え、AFPやHepar-1が発現している症例が報告されている。これらが、成熟細胞の dedifferentiationによるものではないことは、小さなdysplastic nodule (肝細胞癌の前癌病変)がすでに肝前駆細胞で構成されていることから明らかである。

一方、肝細胞癌や肝内胆管癌の臨床経過をみると、特に外科切除あるいは肝移植後の再発や患者生存率の面でheterogeneityが存在することが指摘されている。たとえば、肝細胞癌に対する肝移植の際に用いられるミラノ基準内(単発では腫瘍径5cm以内、腫瘍径3cm以内なら腫瘍個数3個まで)の症例においても外科切除後再発をきたす症例が認められるのに対し、ミラノ基準外の症例の中には外科切除後全く再発をきたさない症例も存在する。このようなheterogeneityは同じ肝細胞癌あるいは肝内胆管癌の中には、生物学的に異なるsubgroupが存在することを示唆するものであり、それは発癌や進展に関与する分子のheterogeneityを反映しているものと考えられる。Leeらは、それら

heterogeneityを発癌起源細胞の違いにその原因を求め、発現遺伝子プロファイルの検

討によって肝前駆細胞由来の肝細胞癌と成熟肝細胞より発生した肝細胞癌に分類でき、肝前駆細胞由来の肝細胞癌の予後が成熟肝細胞より発生した肝細胞癌よりも不良であることを示しており、臨床経過の違いにおけるその由来細胞の重要性を明らかにしている。しかしながら、従来の形態学的な肝細胞癌・肝内胆管癌といった枠組みでは、これら

heterogeneityを診断することは難しく、また、これらをすべて同じように診断・治療することは効率が悪く、十分な治療成績をあげることも困難であることはいままでの臨床研究からも明らかである。癌はいくつかの遺伝子異常の蓄積から発生するが、多くの遺伝子発現はその由来細胞のものと共通しており、共通性・非共通性を検討することによって発生起源や発癌・進展の機序が明らかにできる可能性があり、それに基づいた診断・治療が今後はなされるべきと考えられる。

それらに関与する候補分子としては、肝細胞癌においてはezrin(Vil2 gene)があげられる。ezrinはERM (ezrin-radixin-moesin) familyの一員で、細胞膜とアクチンフィラメントの架橋タンパク質として働き、最近では細胞外基質や他細胞との接着、Rho GTPaseを介したシグナル伝達、アポトーシスにも関与しているとされ、CD44やHGFレセプター(Met gene産物)との作用により癌の浸潤・転移に深く関与していることが、特に小児の固形癌(横紋筋肉腫、骨肉腫)において示されている。また、臨床的には各種悪性腫瘍において、その発現と予後との関係が明らかにされている。肝癌においてはin vitroにおいて

cell growthやinvasivenessに関連していることが示唆されており、また、肝前駆細胞から発生した肝細胞癌の遺伝子発現プロファイリングにおいても有意な発現亢進がみられ、それらのaggressive characteristicsに関与していると考えられている。一方、肝内胆管癌においては、Notch2レセプターとそのリガンドであるJagged1が目目される。Notch2-Jagged1は肝芽細胞から胆管上皮細胞への分化及び胆管maturationに重要な役割を果たしていることが明らかにされ、肝前駆細胞からの肝内胆管癌の発癌・分化にも関与していることが示唆される。我々はすでに、肝内胆管癌のいくつかの症例においてNotch2と

Jagged1の発現亢進を見いだしている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝前駆細胞から発癌したと考えられる肝細胞癌と肝内胆管癌を外科切除標本から同定し、その予後を解析するとともに、発癌・進展に関与すると判断される分子、microRNAを網羅的に解析し、特に ezrinやNotchシグナルについて検討を加える。

3. 研究の方法

(1) 肝前駆細胞由来と考えられる肝細胞癌の同定

肝細胞癌については、まず、肝切除時ミラノ基準内で、その後ミラノ基準外の再発をきたしたものと、肝切除時ミラノ基準外であったものの再発を認めなかった症例で DNA マイクロアレイ法を用いて肝細胞癌の遺伝子発現プロファイリングを行い、その違いにつき検討し、**validate** とするとともに、**CK19** や **CK7** との関係を主に免疫組織学的に検討する。

(2) 肝前駆細胞由来と考えられる肝内胆管癌の同定

Notch 及びそのリガンドである **Jagged**、**Delta**、**Dlk** の発現を肝内胆管癌組織より抽出した RNA を用い、cDNA を合成した後、定量的 PCR 法にて mRNA 量を検討する。また、免疫組織学的手法にてその発現をタンパクレベルで調べ、**CK7** や **CK19**、**c-kit**、**Hepar1** などの表現形質をあわせて検討し、肝前駆細胞由来と考えられる肝内胆管癌を抽出する。

(3) ezrin(Vil2 gene)の発現評価

肝細胞癌組織を用い、定量的 RT-PCR 法による Vil2 遺伝子の mRNA レベルの発現量を測定するとともに、免疫組織染色による ezrin 蛋白の発現を検討する。さらにそれらと **Hepar1** や **CK7**、**CK19** との関係を明らかにし、肝前駆細胞から発生したと考えられる肝細胞癌と成熟肝細胞から発生したと考えられる肝細胞癌を比較検討し、臨床病理学的因子との関連を調べるとともに、外科切除後の予後・再発との関連についても検討する。

(4) 細胞株を用いた ezrin の発現制御と機能解析

肝細胞癌細胞株(HepG2、HuH-7、HLE、HLF、JHH1、JHH2、JHH5、JHH6、JHH7)を用いて ezrin(Vil2 gene)の発現を定量的 RT-PCR 法により定量し、ezrin を強制発現(トランスフェクション法)あるいは発現抑制(small interfering RNA 法)することにより、細胞増殖能(MTT assay)や浸潤能(transwell

assay)などが変化するかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 肝前駆細胞由来と考えられる肝細胞癌の同定

肝切除時ミラノ基準内で、その後ミラノ基準外の再発をきたした症例 6 例と、肝切除時ミラノ基準外であったものの再発を認めなかった症例 6 例による cDNA マイクロアレイの結果、肝切除時ミラノ基準内で、その後ミラノ基準外の再発をきたした症例で有意に発現亢進している遺伝子が 67 個、発現低下している遺伝子が 39 個認められた。このうち、**ROBO1**、**STMN1**、**CKAP2**、**CCNE1**、**FGFR4** の 5 遺伝子を候補遺伝子とし、**validate** を行い、特に **CKAP2** 遺伝子は、独立したサンプルにおいても発現亢進が認められた。

(2) 肝前駆細胞由来と考えられる肝内胆管癌の同定

25 例の肝内胆管癌切除症例において、**Notch2** の遺伝子発現レベルを検討したところ、10 例において発現亢進が認められた。発現亢進がみられた症例とみられなかった症例を比較すると、従来の臨床病理学的因子には、違いを見出すことはできなかった。ただし、**Notch2** が発現亢進している症例では、**Hepar1** が発現していたり、肝前駆細胞由来の癌と考えられている細胆管細胞癌の部分がみられたり、**ckit** の発現がみられたりする症例が有意に多くみられた。また、**Notch2** が発現亢進している症例は有意に無再発生存率が良好であった。一方、**Jagged1** も肝細胞には発現がみられないのに対し、肝内胆管癌では 25 例中 8 例に発現亢進がみられた。これらを免疫組織学的に検討すると、**Notch2** は肝内胆管癌細胞そのものに発現しており、**Jagged1** は癌細胞とともに、間質細胞に発現していることが明らかになった。これは、肝前駆細胞から発癌した癌が、正常分化を模して胆管癌に分化していくことを示唆するものと考えられた。

(3) ezrin(Vil2 gene)の発現評価

組織学的治癒切除された肝細胞癌 77 例について **Vil2 gene** の発現を定量的 RT-PCR にて解析したが、多くの症例で発現がみられた。免疫組織学的には、ezrin は癌細胞だけではなく、浸潤した炎症細胞にも発現がみられ、mRNA 解析は、不相当と判断された。免疫組織学的には、正常肝細胞・胆管細胞には ezrin 発現はみられず、慢性肝障害肝において浸潤炎症性細胞以外に、**ductular reaction**、**intermediate hepatocyte** に発現が認められた。77 例の肝細胞癌においては、28 例に ezrin 発現が認められた。一方、**CK7** は 32 例にお

いて、また、CK19は11例において発現がみられた。EzrinとCK19の発現に有意な相関関係がみられ、また、ezrin高発現肝細胞癌は有意にAFP値が高値を示し、ezrin発現は肝前駆細胞由来の肝細胞癌に発現しているものと考えられた。Ezrin発現肝細胞癌の切除後予後を検討すると、累積生存率、無再発生存率とも有意にezrin発現のない症例に比し、悪いことが明らかになり、予後規定因子として、多変量解析でも独立したものとして抽出された。

(4) 細胞株を用いた ezrin の発現制御と機能解析

9種類の肝細胞癌細胞株で、JHH1のみがezrinを強発現していた。JHH1は日本人男性の肝細胞癌より樹立された細胞株で、AFPが680,000ng/mlと高値を示していた。この細胞株に対し、ezrin (Vil2 gene)に対するsiRNAを作製し、まず、in vitroにおいてそれが作用するかどうかを検討した。50nMのsiRNAをも胃いることによって、negative controlはその発現を維持し、siRNAを作用させると有意にezrin発現が抑制された。そこで、JHH1細胞株に作製したsiRNAを作用させて。細胞増殖能の検討をしたところ、有意に増殖能が抑制されることが明らかになった。この結果は、将来的に、治療への応用が可能であると、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 4 件)

① Ezrin expression is associated with hepatocellular carcinoma possibly derived from progenitor cells and early recurrence after surgical resection. Okamura D, Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Kato M, Miyazaki M. Mod Pathol 21:847-855, 2008 (査読 有)

② Upregulation of topoisomerase II α expression in advanced gallbladder carcinoma: a potential chemotherapeutic target. Washiro M, Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Sugimoto T, Seki N, Miyazaki M. J Cancer Res Clin Oncol 134:793-801, 2008 (査読 有)

③ Angiopoietin-2 levels in the hepatic vein as a useful predictor of tumor invasiveness and prognosis in hepatocellular carcinoma. Kuboki S, Shimizu H, Mitsuhashi N, Kusashio K, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M. J Gastroenterol Hepatol 23:157-164, 2008 (査読 有)

④ FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer. Nomura S,

Yoshitomi H, Takano S, Shida T, Kobayashi S, Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Kato A, Miyazaki M. Br J Cancer 99:305-313, 2008 (査読 有)

[学会発表] (計 4 件)

① 肝内胆管癌切除症例におけるリンパ節転移様式とその予後 大塚将之、木村文夫、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、吉富秀幸、古川勝規、三橋 登、竹内 男、高屋敷 吏、須田浩介、高野重紹、宮崎 勝 第70回日本臨床外科学会(東京)2008年11月29日

② 肝内胆管癌に対する積極的外科切除を中心とした治療戦略 大塚将之、木村文夫、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、野澤聡志、吉富秀幸、古川勝規、三橋 登、竹内 男、高屋敷 吏、須田浩介、太田 舞、宮崎 勝 第44回日本肝癌研究会(大阪)2008年5月22日

③ 腫瘍形成優越型肝内胆管癌に対する積極的外科切除の意義と限界 太田 舞、大塚将之、宮崎 勝 第15回日本消化器病関連学会週間(神戸)2007年10月19日

④ 肝内胆管癌に対する積極的外科切除を中心とした治療成績の解析 大塚将之、木村文夫、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、野澤聡志、吉富秀幸、古川勝規、三橋 登、竹内 男、須田浩介、吉岡伊作、宮崎 勝 第43回肝癌研究会(東京)2007年6月22日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 将之 (OHTSUKA MASAYUKI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90334185

(2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70166156

清水 宏明 (SHIMIZU HIROAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：80272318

吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60375631

(3) 連携研究者

なし