

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590863

研究課題名（和文） 肝癌由来増殖因子の発現制御およびシグナル伝達調節による
肝癌増殖制御法の開発研究課題名（英文） Growth inhibition of hepatocellular carcinoma by the regulation of
signal pathway of the hepatoma-derived growth factor

研究代表者

榎本 平之 (ENOMOTO HIRAYUKI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：40449880

研究成果の概要（和文）：

本研究では、まずわれわれの発見した新規増殖因子である肝癌由来増殖因子(HDGF)の発現を抑制することで肝癌細胞の増殖を阻害しうること、また HDGF の発現抑制効果をもたらす薬剤としてビタミン K があることを明らかにした。また HDGF の肝癌細胞に対する作用として、複数の細胞増殖・血管新生関連因子の誘導の関与を明らかにした。さらに HDGF の血中濃度上昇が、実際の臨床症例において肝癌の発症や早期再発との関連を示唆する結果を得た。これらの知見は HDGF の発現制御およびシグナル伝達調節による肝癌増殖制御法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Hepatoma-derived growth factor (HDGF) is a new molecule that we identified as a novel growth factor. Down-regulation of HDGF resulted in the suppressive effects on the proliferation of the hepatocellular carcinoma (HCC) cells. Vitamin K could reduce HDGF expression through the transcriptional suppression of HDGF promoter. Various factors which are involved in the angiogenesis and cellular growth were found as potential target molecules of HDGF. Increased plasma HDGF concentration was related to the HCC development and early recurrence after the treatment. These findings should lead to the new therapy for HCC by the regulation of HDGF expression and the signal transduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：肝癌由来増殖因子(HDGF)、肝細胞癌、血管新生

1. 研究開始当初の背景

近年肝細胞癌に対する治療面の発展は著しく、局所療法が発達や手術の安全性の向上などにより、その予後は徐々に改善されつつ

ある。しかしながら肝細胞癌は、依然として日本人の死亡率の上位に位置する疾患であり、肝細胞癌の発症およびその増殖に関するメカニズムの解明は極めて重要な課題と考

えられる。

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(中村ら、JBC, 1994)。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(榎本ら、Hepatology, 2002; 榎本ら、J. Gastroenterology, 2002; 貴島ら、JBC, 2002; 貴島ら、Hepatogastroenterology, 2002)。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(吉田ら、J. Gastroenterol. Hepatol., 2003; 吉田ら、Ann. Surg. Oncol., 2006)。以上のことより HDGF は肝癌細胞の増殖に深く関与する因子と考えられ、HDGF の作用を明らかにすることは、肝細胞癌の新たな病態究明に有用と考え研究を行った。

2. 研究の目的

肝癌由来増殖因子 HDGF は、我々のグループによって発見およびクローニングされた新たな増殖因子である。これまでに HDGF が発癌および癌増殖に深く関与することを明らかにしてきたが、HDGF のシグナル伝達機構については十分に解明されていない。本研究課題では HDGF の発現制御機序と HDGF の標的遺伝子の解明を行うことを目標とした。また肝癌症例における血漿中の HDGF 濃度と臨床経過(発癌・再発)との関連性も検討し、最終的には肝癌増殖制御の新たな治療法の開発に貢献しうる新たな知見の獲得を目指した。

3. 研究の方法

(1) HDGF の発現抑制による肝癌細胞増殖抑制に関する検討

Sh-RNA プラスミドを導入して HDGF の発現を低下させた肝癌細胞株を樹立し、HDGF の発現低下が肝癌細胞増殖の抑制をもたらさるか *in vitro* にて検討を行った。また肝癌細胞抑制効果を有することが報告されているビタミン K、ビタミン A などの薬剤が、HDGF の発現を抑制しうるか検討をした。

(2) HDGF シグナル下流の標的遺伝子の検索

HDGF を安定に過剰発現する HepG2 細胞(肝癌細胞株)を樹立し、AGPC 法によって total RNA を抽出した後逆転写反応によって cDNA を作成し、コントロールの細胞と過剰発現細胞とで発現遺伝子を DNA チップによって比較した。

(3) 肝癌患者血漿中の HDGF 濃度と肝発癌および肝癌再発との関連性の解析

われわれの樹立した測定系を用い、慢性肝疾患および肝細胞癌症例における HDGF の血中濃度測定を行ってその臨床的意義を検討した。また肝癌に対する局所治療(ラジオ波焼灼術)後の再発率との関連についても検討した。

4. 研究成果

(1) HDGF の発現抑制による肝癌細胞増殖抑制に関する検討

HDGF の発現を抑制した肝癌細胞株を樹立した。Western blot によって各々約 64%, 40% の発現抑制が確認でき、さらに HDGF 発現抑制細胞では、肝癌細胞の増殖が抑制されることが確認された(図 1)。この結果から HDGF の発現抑制を行うことで、肝細胞癌治療の治療につながることを示唆された。

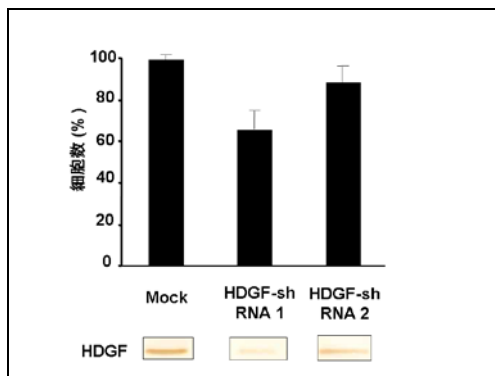


図 1 HDGF の発現抑制による肝癌細胞の増殖抑制効果

また肝癌細胞抑制効果を有することが報告されている種々の薬剤を検討した結果、ビタミン K が HDGF の発現を濃度依存的に抑制できることが判明した(図 2 および図 3)。

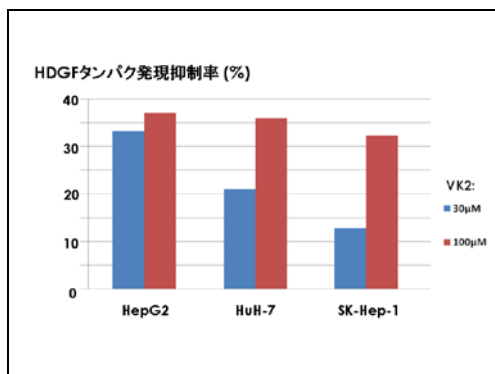


図 2 肝癌細胞における HDGF タンパクのビタミン K2 による発現抑制効果

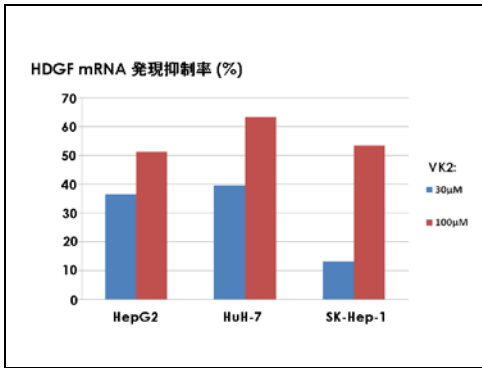


図3 肝癌細胞における HDGF mRNA 発現のビタミン K2 による抑制効果

またビタミン K による HDGF 発現抑制の機序について検討したところ、HDGF の転写を抑制することがルシフェラーゼアッセイによって明らかとなった (図4)。

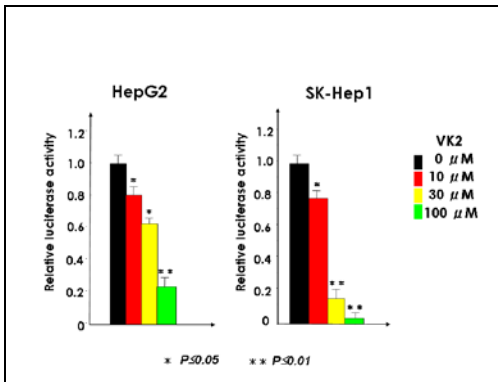


図4 肝癌細胞における HDGF 転写活性のビタミン K2 による抑制効果

これらの結果から、*in vitro*におけるビタミン K の肝癌細胞増殖抑制の一つの機序として、HDGF の発現抑制があると考えられた。また今後 HDGF およびそのシグナルの抑制による肝癌増殖制御を目指す上で、重要な知見と考えられる。

(2) HDGF シグナル下流の標的遺伝子の検索

HDGF を安定に過剰発現する HepG2 細胞 (肝癌細胞株) を樹立し、各々コントロールの細胞とで発現遺伝子を DNA チップによって比較した。表1に示すように、Tie-1、PDGF といった細胞増殖や血管新生に関連する遺伝子の誘導が認められた。HDGF のシグナル伝達と血管新生誘導の機序とに関わる新たな知見と考えられる。

遺伝子名	発現上昇比率
Tyrosine kinase with Ig and EGF-like domains (Tie-1)	21.78
Schwannoma-derived growth factor (Amphiregulin)	16.57
AXL receptor tyrosine kinase	14.05
Bone morphogenetic factor protein 6 (BMP6)	6.43
Leukemia inhibitory factor (LIF)	5.46
Epithelial cell receptor protein tyrosine kinase (EphA2)	4.82
Platelet-derived growth factor alpha polypeptide (PDGF-A)	3.85

表1 HDGF の肝癌細胞株に対する過剰発現により誘導される因子

(3) 肝癌患者血漿中の HDGF 濃度と肝発癌および肝癌再発との関連性の解析

カットオフ値を 0.3ng/mL として、血漿中の HDGF タンパク陽性例と陰性例とで比較したところ、正常コントロールでは陽性率が 0% であったが、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌となるにつれて陽性率は上昇した (図5)。

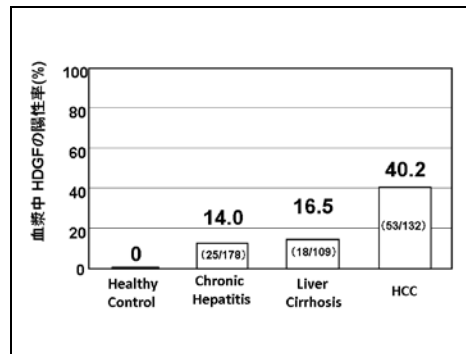


図5 慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の患者での HDGF の血中濃度

また HDGF 陽性群と陰性群とで肝細胞癌の局所治療後の再発率を比較すると、HDGF 陽性群では有意に1年以内での再発率が高値であった (図6)。

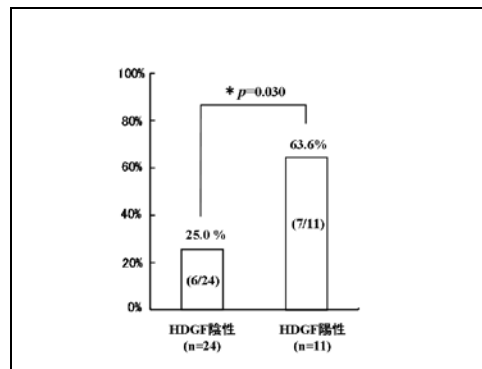


図6 HDGF 陽性症例と陰性症例における
肝細胞癌の局所療法後の1年以内
再発率

以上の結果から HDGF が陽性であることは、肝細胞癌の存在や悪性度の高さと関連することが示唆される。また腫瘍マーカーとしての意義や、HDGF の抑制が肝細胞癌の治療につながることも示唆される。

(4) 結果の総括

HDGF の発現抑制が肝癌増殖制御につながることを明らかとすることができた。さらにビタミン K により HDGF の発現を抑制する効果が得られること、またその機序として HDGF 遺伝子の転写抑制があることが明らかになった。また HDGF のシグナル伝達経路としていくつかの細胞増殖・血管新生関連因子を明らかにした。さらに実際の臨床症例において HDGF の血中濃度が肝癌の発生や治療経過と関連する可能性を明らかにすることができた。これらは HDGF の発現制御およびシグナル伝達調節による肝癌増殖制御法の開発につながる知見であると考えられる。

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 9 件)

- ① Nakamura H, Enomoto H. Hepatoma-Derived Growth Factor in Carcinogenesis and Cancer Progression. *Current Drug Therapy*, 査読有、6巻、2011、278-285.
Doi:10.2174/157488511798109574
- ② Enomoto H., Nakamura H., Nishiguchi S. Role of Hepatoma-derived Growth Factor (HDGF) in Hepatocellular carcinoma. *Current Research in Gastroenterology& Hepatology*, 査読有、5巻、2011、19-26. 電子ジャーナル掲載なし
- ③ Enomoto H., Nakamura H., Nishiguchi S. The role of Hepatoma-derived Growth Factor (HDGF) in cancer development and progression. *Current Research in Cancer*, 査読有、5巻、2011、11-25. 電子ジャーナル掲載なし
- ④ Nakamura H., Weidong L., Enomoto H. Role of Hepatoma-derived Growth Factor in Cancer. *Trends in Cancer Research*. 査読有、5巻、2010、1-11.
<http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?in=0&vn=5&tid=57&aid=2815&pub=2009&type=3>

- ⑤ Liu W., Nakamura H., Deng H., Enomoto H., et al., (他7名, 4番目) A higher expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma cells and more tumor growth in vivo. *Trends in Cancer Research*. 査読有、5巻、2010、29-36.
<http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?in=0&vn=5&tid=57&aid=2818&pub=2009&type=3>
- ⑥ Enomoto H., Nakamura H., Nishiguchi S. Role of Hepatoma-derived Growth Factor in hepatocyte proliferation and differentiation. *Current Research in Hepatology*, 査読有、4巻、2010、79-88. 電子ジャーナル掲載なし
- ⑦ 榎本平之、石井昭生、今西宏安 他、(他15名、1番目) 自己免疫性肝炎に発症した肝細胞癌に UFT-E投与が有効であった1例、癌と化学療法、査読有、37巻、2010、919-922.
<http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/37050/919>
- ⑧ Enomoto H., Nakamura H., Komatsu-Kanatani. N, et al. (他7名 1番目)、Partial blockage of hepatocyte maturation in hepatoma-derived growth factor transgenic mice. *World Journal of Hepatology*, 査読有、1巻、2009、98-102.
doi: 10.4254/wjh.v1.i1.98.
- ⑨ Enomoto H., Nakamura H., Nishiguchi S. Involvement of Hepatoma-derived Growth Factor in the growth of hepatocytes during liver development and regeneration. *Current Research in Hepatology*, 査読有、3巻、2009、27-35. 電子ジャーナル掲載なし

[学会発表] (計 13 件)

- ① Enomoto H., Nakamura H., Imanishi H., et al. Hepatoma-derived growth factor as a potential target molecule for the treatment of hepatocellular carcinoma. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2011)、2011年11月6日、San Francisco
- ② 榎本平之、会澤信弘、西口修平、C型慢性肝炎組織に生じるミトコンドリア遺伝子異常と発癌に関する検討、第47回日本肝臓学会総会、2011年6月2日、東京
- ③ 榎本平之、今西宏安 他、肝癌細胞増殖因子と血管新生因子としての Hepatoma-derived growth factor : 治療

- 標的の可能性に関する検討、第 47 回日本肝臓学会総会、2011 年 6 月 2 日、東京
- ④ 会澤信弘、榎本平之、今西宏安 他、慢性肝疾患組織におけるミトコンドリア遺伝子異常と肝発癌、第 97 回日本消化器病学会総会、2011 年 5 月 15 日、東京
- ⑤ 榎本平之、中村秀次、今西宏安 他、未分化肝細胞の増殖因子 Hepatoma-derived growth factor は、血管新生誘導を介して腫瘍増殖に関与する、第 18 回浜名湖シンポジウム、2010 年 12 月 15 日、浜松
- ⑥ 榎本平之、中村秀次、今西宏安 他、未分化肝細胞の増殖因子 Hepatoma-derived growth factor の腫瘍間質非上皮細胞への作用に関する検討、第 14 回日本肝臓学会大会 (JDDW2010)、2010 年 10 月 14 日、横浜
- ⑦ 中村秀次、榎本平之、西口修平、血漿中の肝癌由来増殖因子 HDGF は肝細胞癌の再発・予後マーカーとなりうるか？第 14 回日本肝臓学会大会 (JDDW2010)、2010 年 10 月 13 日、横浜
- ⑧ 中村秀次、榎本平之、今西宏安 他、血漿中の肝癌由来増殖因子 HDGF は進行肝癌の生命予後予測因子になりうるか？第 46 回日本肝臓学会総会、2010 年 5 月 27 日、山形
- ⑨ 榎本平之、中村秀次、西口修平、肝癌症例における Hepatoma-derived growth factor (HDGF) の血中濃度測定に関する検討、第 96 回日本消化器病学会総会、2010 年 4 月 24 日、新潟
- ⑩ 中村秀次、榎本平之、今西宏安 他、早期肝細胞癌における血漿中の肝癌由来増殖因子 HDGF の測定意義、第 13 回日本肝臓学会大会 (JDDW2009)、2009 年 10 月 15 日、京都
- ⑪ 榎本平之、中村秀次、西口修平、未分化肝細胞の増殖因子 Hepatoma-derived growth factor は、血管新生誘導を介して腫瘍増殖に関与する、第 51 回日本消化器病学会大会 (JDDW2009)、2009 年 10 月 15 日、京都
- ⑫ 中村秀次、榎本平之、今西宏安 他、血漿中の肝癌由来増殖因子 HDGF は肝癌の腫瘍マーカーとなりうるか？第 45 回日本肝臓学会総会、2009 年 6 月 4 日、神戸
- ⑬ 劉衛東、中村秀次、榎本平之 他、HDGF 抑制による肝細胞癌細胞の腫瘍原性の阻害 (Down-regulation of HDGF inhibits tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells)、第 45 回日本肝臓学会総会、2009 年 6 月 4 日、神戸

〔図書〕 (計 2 件)

① 榎本平之、中村秀次、今西宏安 他、未分化肝細胞の増殖因子 Hepatoma-derived growth factor は、血管新生誘導を介して腫瘍増殖に関与する、アークメディア、消化器疾患と幹細胞その基礎と臨床、2011、60-61

② 榎本平之、中村秀次、今西宏安 他、肝細胞癌の増殖における HDGF (Hepatoma-derived growth factor) の役割、アークメディア、消化器疾患におけるエピゲノミクスとゲノミクス、2009、199-201

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 秀次 (NAKAMURA HIDEJI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20237423

(H21 : H21.7.1 退職)

榎本 平之 (ENOMOTO HIRAYUKI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：40449880

(H21 → H23)

(2) 研究分担者

今西 宏安 (IMANISHI HIROYASU)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60340957

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：