

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5月14日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791288

研究課題名（和文）肝細胞癌の浸潤転移に対する新規分子標的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the novel molecular targeted therapy against hepatocellular carcinoma invasion and metastasis

研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI TSUYOSHI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：50528007

研究成果の概要（和文）：

肝細胞癌の浸潤能・運動能を制御する分子を標的として、癌の浸潤や転移を阻止する方法を確立することが本研究の目的である。肝細胞癌において h-prune タンパク発現の臨床的意義が見いだせなかったが、甲状腺癌において h-prune が高発現し、h-prune が甲状腺未分化癌の浸潤転移機構において重要な役割を有することが明らかとなった。現在 h-prune を標的とした甲状腺未分化癌の分子標的治療の開発に取り組んでいる。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to develop the novel molecular targeted therapy against hepatocellular carcinoma invasion and metastasis. Although we were not able to clarify the clinical significance of expression of h-prune in hepatocellular carcinoma, we elucidated that h-prune frequently expressed in thyroid cancers and had an essential role in anaplastic thyroid cancer cell invasion and metastasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：腫瘍外科

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：癌、遺伝子、蛋白質、細胞・組織、外科

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肝細胞癌は高率に脈管浸潤・肝内転移や遠隔転移を来しやすく、根治切除後の予後も依然として不良である。進行肝細胞癌における癌細胞浸潤・転移のメカニズムは明らかになっていない。
- (2) NM23-H1 は最初に同定された癌転移抑制因子であり、h-prune と複合体を形成し、乳癌細胞の浸潤・転移と深く関わること

が報告された。h-prune はその phosphodiesterase (PDE) 活性依存性に細胞の運動能を促進することが示され、進行乳癌細胞に高発現していることが報告された。一方で私たちは Wnt シグナルの構成分子であるグリコーゲン合成酵素リン酸化酵素 (GSK-3) が細胞運動に必要なであることを明らかにし、h-prune が GSK-3 と結合することを明らかにして

きた。GSK-3 はそのリン酸化酵素活性依存性にh-prune と大腸癌細胞内で複合体を形成し、その複合体形成が大腸癌細胞の運動能に必要であった。h-prune とGSK-3 は細胞運動の足場となる接着斑に共局在し、h-prune/GSK-3 複合体はこの接着斑のダイナミクスを制御していた。従って、h-prune/GSK-3 複合体が癌の浸潤、転移能に深く関わっている可能性が高いと考えられ、肝細胞癌の浸潤・転移機構におけるh-prune 及びGSK-3 の関与を明らかにする臨床的意義は大きく、新しい浸潤・転移のマーカーや分子標的治療を開発できる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

肝細胞癌の浸潤能・運動能を制御する分子を標的として、癌の浸潤や転移を阻止する方法を確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) h-prune 及び GSK-3 を介した肝細胞癌浸潤・転移制御機構の解明

- ① 肝細胞癌切除検体を用いた免疫組織染色により、h-prune 及び活性型GSK-3 の発現と分化度、脈管侵襲、臨床病期や転移再発との関連性を検討する。
- ② 肝細胞癌株細胞で h-prune/GSK-3 が細胞運動や浸潤、接着斑形成に必要なかどうか、Rac や FAK の活性化に必要なかどうかを阻害剤や RNA silencing などの分子生物学的手法を用いて評価する。
- ③ h-prune を過剰発現させた肝癌細胞や、h-prune をノックダウンした肝癌細胞を用いて、DNA マイクロアレイ法により h-prune 発現と相関を示す遺伝子の網羅的解析を行う。得られた分子について、分子生物学的手法を用いて肝細胞癌株細胞の接着能、浸潤能、運動能を評価する。また肝細胞癌臨床検体を用いて臨床病理学的検討を行う。

(2) 肝細胞癌浸潤・転移抑制法の開発

- ① ラット肝癌モデルを用いて、h-prune に対する PDE 阻害剤 dipyridamole、または GSK-3 阻害剤を腹腔内投与し、肝癌の増殖、脈管侵襲、肝内転移、肺転移を抑制できるかどうか、生存率に影響するかどうかを評価する。
- ② ラット肝癌モデルに対して、経肝動脈的に h-prune 及び GSK-3 に対する

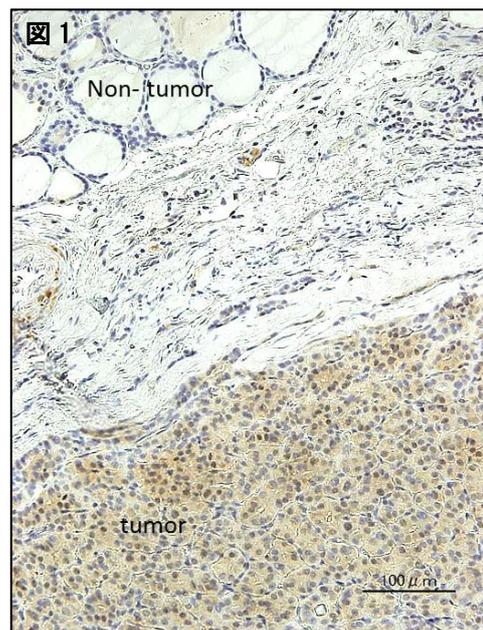
siRNA を投与し肝癌の治療効果をみる。標識した siRNA とリポドールをエマルジョン化して経肝動脈内投与し、腫瘍への取り込み、siRNA の効果を評価する。肝癌の増殖、脈管侵襲、肝内転移、肺転移の有無、生存率を評価する。

- ③ ラット肝癌肝移植モデルを用いて、h-prune に対する PDE 阻害剤、または GSK-3 阻害剤が肝癌肺転移を抑制できるかどうか、生存率に影響するかどうかを評価する。

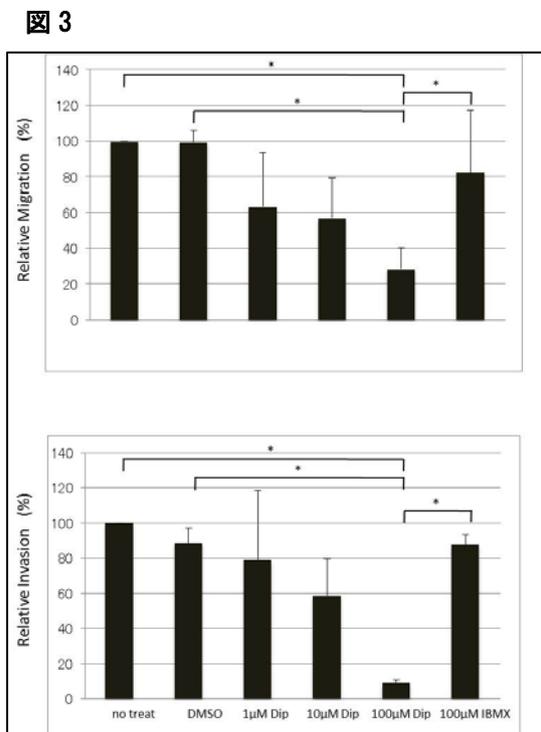
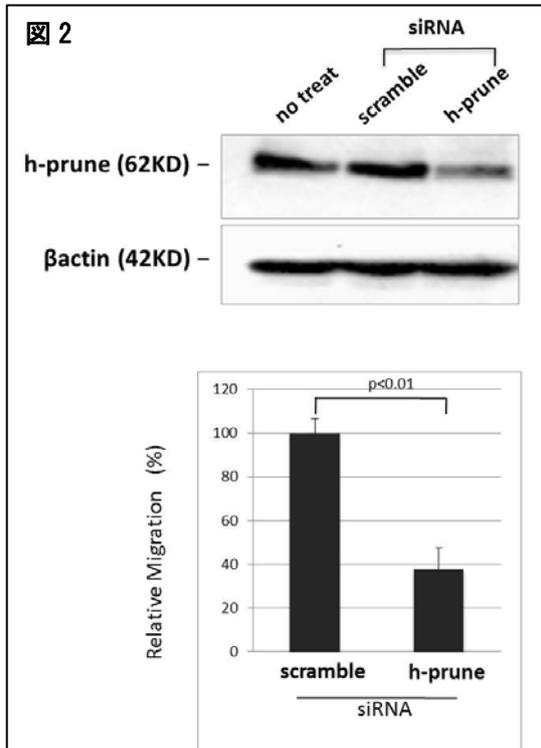
4. 研究成果

(1) h-prune の PDE 阻害剤 dipyridamole は肝癌細胞株の細胞運動を抑制した。しかし肝細胞癌の臨床検体における免疫染色において h-prune の発現は確認されたが、進行度や予後と相関を見出せなかった。また肝内胆管癌の臨床検体における h-prune の発現は CEA や CA19-9 と相関がみられたが、予後との相関を見出せなかった。肝内胆管癌細胞株において dipyridamole は細胞運動を抑制しなかった。肝癌臨床検体の凍結切片を用いた PCR 法により mRNA との相関を検討している。

(2) 一方で h-prune が甲状腺癌に特異的に発現していることが明らかになった。甲状腺非癌部及び腺腫様甲状腺腫における h-prune の発現 (4.4%, 12.4%) に対して乳頭癌、低分化癌、未分化癌いずれにおいても全例に h-prune の高発現がみられた (図 1)。また転移リンパ節組織においても全例に h-prune が発現しており、h-prune が甲状腺癌の伸展に重要な役割を担っていることが強く示唆された。そ



ここで甲状腺癌細胞株による検討を行った結果、h-prune 高発現株は細胞運動能が高く、h-prune の発現と細胞運動能に相関がみられた。甲状腺未分化癌細胞株 (8505C, KTC-3) において、h-prune に対する siRNA や dipyridamole は細胞運動能、浸潤能を有意に抑制したが、増殖能には影響を与えなかった (図 2, 図 3)。



したがって h-prune が甲状腺未分化癌の浸潤・転移に重要な役割を有することが示唆された。甲状腺未分化癌は浸潤転移能が強く、臨床的に非常に予後不良な疾患であるが、未だ有効な治療法は確立されていない。h-prune を標的にした甲状腺未分化癌の分子標的治療法を開発することは、臨床的に意義が大きいと考えられた。

(3) 免疫不全マウスの甲状腺に未分化癌細胞株を同所性移植した甲状腺癌浸潤転移モデルを作成した。このモデルに対して dipyridamole の腹腔内投与は気管浸潤や生存率を改善できなかった。そこで h-prune に対する shRNA を 8505C 細胞及び KTC-3 細胞に導入し、h-prune ノックダウン細胞を樹立した。この細胞株を用いて、甲状腺癌転移モデルにおける気管浸潤や肺転移を抑制できるかを評価中である。

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 5 件)

1. Kuroda S, Tashiro H, Kobayashi T, et al. No impact of perioperative blood transfusion on recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. World journal of surgery 2012; 36:651-8. 査読有
2. 楠部潤子, 小林剛, 田代裕尊, 他. 甲状腺未分化癌の浸潤転移機構における h-prune の役割. 内分泌外科, 2011, 28, pp232-237. 査読無
3. Kuroda S, Tashiro H, Kobayashi T, et al. Selection criteria for hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma classified as Child-Pugh class B. World J Surg 2011; 35:834-41. 査読有
4. Kobayashi T, Itamoto T, Tashiro H, et al. Tumor-related factors do not influence the prognosis of solitary hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2011; 18:689-99. DOI:10.1007/s00534-011-0379-4, 査読有
5. 小林剛, 大段秀樹. 肝癌再発予防. 外科治療, 2011, 105, pp 467-474, 査読無

[学会発表] (計 3 件)

1. 楠部潤子, 小林剛, 田代裕尊, 杉野圭三, 嶋本文雄, 菊池章, 大段秀樹. 甲状腺未分化癌の浸潤転移機構における h-prune

- の役割. 第 70 回日本癌学会学術総会,
2011 年 10 月 03 日, 名古屋
2. 小林剛、田代裕尊, 天野尋暢, 大下彰彦,
谷本新学, 田澤宏文, 黒田慎太郎, 楠部
潤子, 藤國宣明, 相方浩, 大段秀樹. 高
度脈管侵襲を伴う肝細胞癌に対する肝切
除成績. 第 23 回日本肝胆膵外科学会・学
術集会, 2011 年 06 月 10 日, 東京
 3. 楠部潤子, 小林剛, 田代裕尊, 杉野圭三,
嶋本文雄, 大段秀樹. 世界に発信する内
分泌外科の臨床と基礎研究 甲状腺未分
化癌の浸潤転移機構における h-prune の
役割. 日本内分泌外科学会総会. 2011 年
06 月, 東京

[その他]

ホームページ等

http://home.hiroshima-u.ac.jp/home2ge/research_liver.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI TSUYOSHI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号 : 50528007