

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19940

研究課題名(和文)肝細胞癌におけるスタチンによる抗腫瘍効果の分子メカニズムの検討

研究課題名(英文)Prediction for HCC development and the effect of statin for NASH patients

研究代表者

東 孝暁 (HIGASHI, Takaaki)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70594878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌は、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)肝疾患(NAFLD)、などの背景肝より発症する疾患であるが、その発癌・進展に関しては不明な点が多い。本研究では特にNASH、NAFLD症例を中心とし、肝細胞癌の発癌リスクや予後不良に関わるバイオマーカーを同定し、予後を改善する可能性のある薬剤(特にスタチン)を検索した。既知の186 gene signatureがNASH、NAFLD症例の予後予測に有用であることが確認された。またスタチン内服により肝細胞癌無再発生存期間の延長を認めること、肝細胞癌細胞株において増殖抑制、アポトーシスの誘導が確認された。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) are developed from the background livers such as viral hepatitis, alcoholic hepatitis, the non-alcoholic steatohepatitis (NASH) fatty liver disease (NAFLD), but the mechanism of HCC development and progress is still unclear. In this study, I focused on NASH and NAFLD patients in particular to identify the carcinogenic risk of HCC and biomarker poor-prognosis for NASH and NAFLD. And also I tried to search a drug (statin in particular) which might improve the prognosis. It was confirmed that 186 gene signature was useful for the HCC prediction of the NASH, NAFLD patients. In addition, I confirmed statin could induce the apoptosis and have the anti-proliferative effects on HCC cell lines in vitro. In clinical cohort, the patients who took statin showed significantly longer disease free survival than ones who didn't take statin.

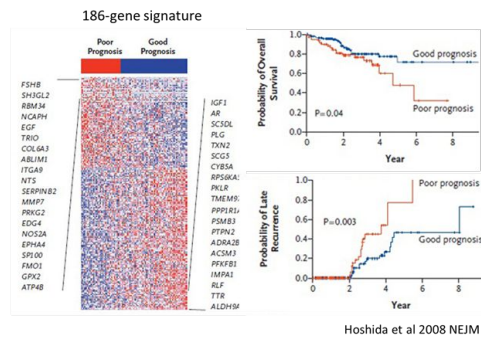
研究分野：肝細胞癌、発癌予測、化学療法感受性

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎(NASH) 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD) 肝細胞癌 発癌予測 186 gene signature スタチン

1. 研究開始当初の背景

我々は、米国の Mount Sinai 医科大学の星田 Lab との共同研究で、肝細胞癌の切除標本を提供している。臨床検体を用いた DNA マイクロアレイによる遺伝子解析を行い、発癌リスクや予後不良に関わるバイオマーカーを同定した。これらを用いた肝細胞癌の発癌・予後・治療効果の予測を行うワールドワイドなデータベースを作成し、臨床応用することを目標としてきた。近年欧米諸国を中心に肥満やメタボリックシンドロームに伴う NAFLD、及び NASH より発症する肝細胞癌が増加しており、日本においても今後増加することが予想される。我々は主に C 型肝炎より発症した肝細胞癌術後の再発・予後を予測する Prognostic gene signature (186-gene signature) を提唱し (Hoshida et al 2008 NEJM, Hoshida et al 2013 Gastroenterology, King et al 2015 Gut 図 1)、

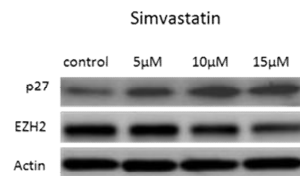
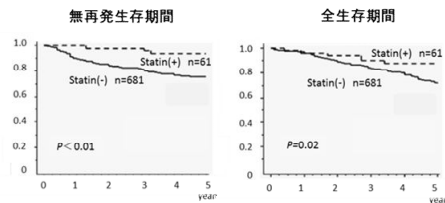
図 1. C 型肝炎肝細胞癌における Prognostic gene signature に関して



現在臨床応用へ向けた取り組みを行っているが、NAFLD および NASH においても適応可能かどうかその有用性は明らかでは無い。スタチンは血中コレステロール値を減少させる薬剤の総称であり高脂血症治療薬としてメタボリックシンドローム患者に頻用されている。近年、各国のデータベースを使用した大規模調査にてスタチンが様々な癌腫において発癌リスクを軽減することが報告され

ている (Alexandre, Gastroenterology. 2014, Arnsfang, Br J Cancer. 2015, MacGliynn. Cancer Epidemiol. 2014, Yu, J Clin Oncol 2014)。その分子メカニズムとして、EZH2 の発現を減少させ、p27 の発現を上昇させることで細胞増殖抑制効果を発揮することを我々は大腸癌細胞株を用いた研究で明らかにした (Ishikawa, Int J Cancer 2014 図 2)。

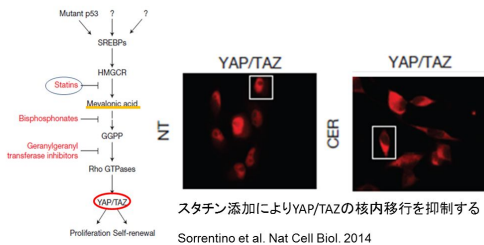
図 2 大腸癌切除後のスタチン内服、非内服症例の長期予後



Ishikawa S et al. Int J Cancer. 2014

乳癌細胞株を用いた報告では Hippo pathway の下流に局在する YAP/TAZ の核内移行をスタチンが抑制することで、抗腫瘍効果を発揮することが明らかにされた (Sorrentino, Nat Cell Biol 2014 図 3)。

図 3 スタチン添加により YAP/TAZ の核内移行の抑制



スタチン添加により YAP/TAZ の核内移行を抑制する Sorrentino et al. Nat Cell Biol. 2014

2. 研究の目的

肝細胞癌は、C 型肝炎、B 型肝炎、アルコール性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）などによる線維化を伴う背景肝より発症する疾患であるが、その発癌・進展に関わるメカニズムは不明な点が多い。本研究では特に NASH、NAFLD 症例を中心とし、肝細胞癌の発癌リスクや予後不良に関わるバイオマーカーを同定するとともに、予後を改善する可能性のある薬剤（特にスタチン）を検索することを目的とする。ウイルス性肝炎に対する発癌予防は抗ウイルス治療の発展により効果が得られているが、NAFLD/NASH 肝癌に対する発癌予防を目的とした治療法は未だ開発段階であり本研究が果たす役割は大きいものと考えられる。

3. 研究の方法

- 1) C 型肝炎より発症した肝細胞癌術後の再発・予後を予測する Prognostic gene signature (186-gene signature) の NAFLD, NASH 症例に対する有用性の確認

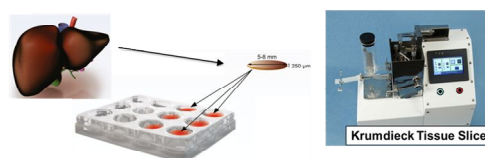
C 型肝炎より発症した肝細胞癌術後の再発・予後を予測する Prognostic gene signature (186-gene signature, Hoshida et al 2008 NEJM) を利用し、NAFLD, NASH 症例でもその 186-gene は予後予測因子となり得るか検討する。

- 2) NAFLD の予後を予測する新たな gene signature を決定し、スタチン内服により変化している gene pathway の同定

NAFLD, NASH から発症した肝細胞癌症例から新たに gene signature を決定し、予後不良な gene、予後良好な gene を同定する。その

後、ヒト肝組織（肝生検検体を使用）を用いて、スタチン添加、非スタチン添加での gene expression pattern の変化を確認する（ex vivo）。共同研究を行っている米国（Mount Sinai 医科大学、MGH Cancer Center）、日本（熊本大学、虎ノ門病院）の施設から肝生検サンプルを集積する。Krumdieck Tissue Slicer を使用しサンプルを Slice し培養、RNA、DNA を抽出し gene expression を確認すると共に、HE 染色にて組織学的変化についても確認する（図 4）。

図 4



また肝細胞癌細胞株において、スタチン添加による gene expression pattern 変化を確認することで、スタチンが抗腫瘍効果を発揮する詳細なメカニズムの同定を行う。

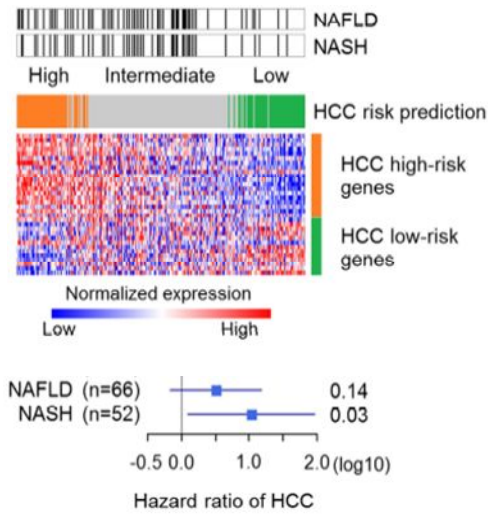
4. 研究成果

- 1) NAFLD、NASH 症例の肝細胞癌発癌・予後を予測する Gene signature の証明

既存の Prognostic gene signature を NASH NAFLD 症例に適応可能か検証するため、肝細胞癌根治切除症例 263 例のコホートを使用し検証を行った。

NASH、NAFLD 症例においても本 Gene signature にて再発リスクを予測することが可能であることがわかった（図 5）。

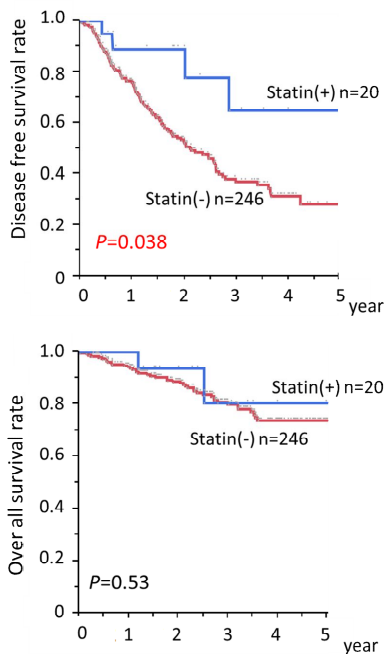
図5 gene signatureを用いた発癌リスク



2) スタチン投与により抑制されるがん関連 Signal の検証

まず熊本大学消化器外科において初回肝細胞癌に対して肝切除を施行した 266 例の予後解析を行ったところ、スタチン内服群 (n=20) は非内服群 (n=246) と比べ、無再発生存期間が有意に長いことがわかった (図 6)。

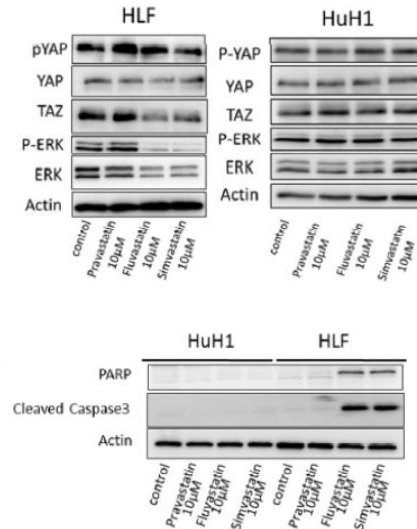
図6 肝細胞癌切除後の生存曲線



In vitro において肝細胞癌細胞株にスタチンを添加したところ、YAP/TAZ の発現が抑制されるとともに、アポトーシスが誘導されるこ

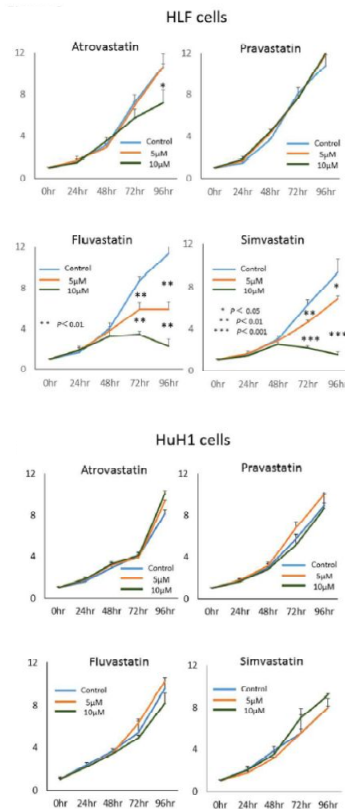
とが確認された (図 7)。しかしその効果は上皮系細胞株である HuH1 には認められなかった。

図7 スタチン添加による細胞内シグナル変化



また、細胞増殖アッセイを行うとシグナル変化、アポトーシス誘導を認めた HLF 細胞株においてのみスタチンによる細胞増殖抑制効果を認めた (図 8)。

図8 細胞増殖アッセイ



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) Cell type-specific pharmacological kinase inhibition for cancer chemoprevention. Deshmukh M, Nakagawa S, Higashi T et al. Nanomedicine. 2018 Feb;14(2):317-325. 査読有
doi: 10.1016/j.nano.2017.11.004.
- 2) Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y Adv Drug Deliv Rev. 2017 May 12. pii: S0169-409X(17)30063-7. 査読有
doi: 10.1016/j.addr.2017.05.007
- 3) Molecular Liver Cancer Prevention in Cirrhosis by Organ Transcriptome Analysis and Lysophosphatidic Acid Pathway Inhibition. Nakagawa S, Wei L, Song WM, Higashi T et al Cancer Cell. 2016 Dec 12;30(6):879-890 査読有
doi: 10.1016/j.ccell.2016.11.004
- 4) Statin attenuates cell proliferative ability via TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma. Higashi T, Hayashi H, Kitano Y et al. Med Oncol. 2016 Nov;33(11):123 査読有
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12032-016-0845-6>
- 5) In vitro modeling of hepatocellular carcinoma molecular subtypes for anti-cancer drug assessment. Hirschfield H, Bian CB, Higashi T et al. Exp Mol Med. 2018 Jan 5;50(1):e419. 査読有
doi: 10.1038/emm.2017.164.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

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

東 孝暁 (HIGASHI, Takaaki)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号: 70594878

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()