

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15807

研究課題名（和文）肝細胞癌悪性性質獲得に寄与するBMP9分子機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapeutic strategies targeting BMP9 that contributes to the acquisition of malignant properties in hepatocellular carcinoma

研究代表者

丹尾 幸樹 (Nio, Kouki)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80807397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で我々は、肝細胞癌患者血清中のBMP9値が患者予後に関連する血清バイオマーカーである事を明らかにした。肝がん細胞株を用いた実験により、BMP9はその標的遺伝子であるID1とともに、Wnt/カテニンシグナルの活性化を介して、EpCAM陽性肝がん幹細胞を活性化する事が明らかとなった。さらに、肝がん細胞株ならびに肝がん移植マウスモデルを用い、BMP受容体阻害剤の有用性を検討した結果、BMP9-ID1シグナルを阻害する事で、BMP9による誘導されるEpCAM陽性肝がん幹細胞の活性化が抑制され、細胞増殖や浸潤・遊走といった肝がん悪性形質が有意に抑制される事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再発や転移、薬物療法抵抗性の源と考えられているがん幹細胞は、進行肝細胞癌において重要な治療標的と考えられている。今回我々は、BMP9シグナル（細胞情報伝達）による肝がん幹細胞活性化のメカニズムを解明し、BMP9シグナルを阻害するBMP受容体阻害剤が肝細胞癌における有望な治療法となる可能性を示した。今後、高悪性度（腫瘍が大きくなる速度が速い、腫瘍マーカーが高値）や難治性（薬物療法が効きにくい）の進行肝細胞癌に対する臨床応用が期待される。本研究結果は、国内および海外の学術集会での報告と英文誌掲載により広く社会・国民に発信した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the role of BMP9 signaling in cancer stem cell (CSC) properties of hepatocellular carcinoma (HCC) and to assess the therapeutic effect of BMP receptor inhibitors in HCC. We have first identified that high BMP9 expression in serum from patients with HCC leads to poorer outcome. BMP9 promoted CSC properties in EpCAM-positive HCC subtype via enhancing ID1 expression in vitro. Additionally, ID1 knockdown significantly repressed BMP9-promoted HCC-CSC properties by suppressing Wnt/β-catenin signaling. Cells treated with BMP receptor inhibitors K02288 and LDN-212854 blocked HCC-CSC activation by inhibiting BMP9-ID1 signaling. Treatment with LDN-212854 suppressed HCC tumor growth by repressing ID1 and EpCAM in vivo. Our study demonstrates the pivotal role of BMP9-ID1 signaling in promoting HCC-CSC properties and the therapeutic potential of BMP receptor inhibitors in treating EpCAM-positive HCC.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 がん幹細胞 BMP9 ID1 BMP受容体阻害剤

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (HCC) は全世界で代表的な難治がんの一つである。HCC に対する根治療法として、肝移植、外科切除、ラジオ波焼灼療法などが施行されているが、多くの患者で治療後数年の内に再発、転移が認められている。進行 HCC に対しては、現状では、ソラフェニブなどの分子標的治療や肝動注化学療法が行われているが、いまだ十分な有効性が得られていない。このような HCC における再発、転移、がん薬物療法抵抗性の原因の一つとして、癌幹細胞の存在が考えられている (Yamashita T, et al. Gastroenterology. 2009;136: 1012-1024)。したがって、癌幹細胞を標的とした新規治療法の確立が焦眉の課題として求められている。我々はこれまで、HCC を大きく2つのサブタイプに分類し (Yamashita T, et al. Hepatology. 2013 Apr;57(4):1484-97.) サブタイプ毎の遺伝子発現プロファイルから肝癌幹細胞で活性化する分子を同定し、癌幹細胞維持や悪性形質獲得メカニズムの解明と新規治療法の開発を行ってきた (Nio K, et al. J Hepatol. 2015 Nov;63(5):1164-72.)。

2. 研究の目的

TGF スーパーファミリーに属する BMP は、肝幹細胞の維持・分化に関与することが知られている。肝癌幹細胞は、肝幹細胞と共通の遺伝子発現や分子シグナル活性化プロファイルを示す事が知られており、BMP ファミリーが肝癌幹細胞維持に重要な役割を果たす事が示唆されているが、その分子機構は十分に研究されていない。BMP ファミリーの内、BMP9 は、肝線維化や HCC 増殖に関わる因子として近年注目されている。我々は、ヒト HCC 切除標本を用いた事前検討で、BMP9 の腫瘍内発現が高い患者は、有意に予後不良であることを見出した。以上から、本研究では、HCC における BMP9 のバイオマーカーとしての検討、癌幹細胞の活性化に関わる BMP9 分子機構の解明、BMP9 シグナルを標的とした新規治療法の開発を行う事を目的とした。

3. 研究の方法

1. HCC 患者血清 (n=37) を用い、血中 BMP9 を ELISA 法で測定し、BMP9 と患者予後との相関を検討した。
2. ヒト肝癌細胞株 (Huh7、Huh1、HLE、HLF、Sk-Hep-1) ならびに当科で樹立した肝癌細胞株 (MT) を用い、BMP9 ならびにその分子シグナルによる肝癌幹細胞の活性化メカニズムを種々の分子生物学的手法を用いて検討した。
3. BMP 受容体阻害剤による抗腫瘍効果ならびに癌幹細胞抑制効果を、肝癌細胞株ならびに担癌免疫不全マウスを用い検討した。

4. 研究成果

本研究で我々は以下の知見を得た。

1. HCC 患者血清中の BMP9 値をカットオフ 600pg/mL で高値群 (n=18) と低値群 (n=19) の2群に分けて患者予後との相関を検討した。その結果、血清 BMP9 高値群では、低発現群に比して有意に予後不良であった。
2. ヒト肝癌培養細胞株に対し、BMP9 リコンビナントタンパクを添加検討した結果、EpCAM 陽性肝癌細胞株 (Huh7、Huh1、MT) において、BMP9 シグナル分子ならびに幹細胞マーカーの発現が亢進し、癌浸潤能、遊走能の亢進が確認された。一方、CD90 陽性肝癌細胞株 (HLE、HLF、Sk-Hep-1) では、幹細胞マーカーの発現亢進は認めなかった。
3. EpCAM 陽性肝癌細胞株では、BMP9 シグナルの標的遺伝子である ID1 発現が亢進しており、ID1 のノックダウンにより BMP9 が誘導する癌幹細胞性 (細胞増殖能、スフェロイド形成能、浸潤能、遊走能) の活性化が抑制された。一方、ID1 の過剰発現においては、EpCAM 陽性肝癌における癌幹細胞性が亢進した。
4. BMP9 は、EpCAM の発現調整因子として知られる Wnt/ カテニンシグナルを活性化し、ID1 の抑制によりその活性化は抑制された。また、EpCAM プロモーターへの ID1 の結合は認めなかった。
5. BMP 受容体阻害剤は、TGF- 受容体阻害剤と比較して、有意に BMP9-ID1 分子シグナルを抑制する事で、EpCAM 陽性肝癌幹細胞を抑制した。
6. 担癌免疫不全マウスモデルにおいて、BMP 受容体阻害剤は、腫瘍内 ID1 ならびに EpCAM 陽性肝癌幹細胞を抑制する事で、良好な抗腫瘍効果を示した。

以上の結果から、BMP9-ID1 シグナルは、EpCAM 陽性肝癌幹細胞を活性化する事で HCC 患者の予

後不良に寄与する分子シグナルであり、進行 HCC における重要な治療標的となる事が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chen H, Nio K, Yamashita T, Okada H, Li R, Suda T, Li Y, Doan PTB, Seki A, Nakagawa H, Toyama T, Terashima T, Iida N, Shimakami T, Takatori H, Kawaguchi K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S.	4. 巻 none
2. 論文標題 BMP9 ID1 signaling promotes EpCAM positive cancer stem cell properties in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 none
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12963	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 丹尾 幸樹、山下 太郎、本多 政夫、金子 周一
2. 発表標題 肝細胞癌悪性形質に関わるBMP9分子シグナルが制御する癌幹細胞維持機構の検討
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kouki Nio, Taro Yamashita, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 Clinical and biological significance of BMP9 in the malignant nature of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹尾 幸樹、陳 晗、山下 太郎、金子 周一
2. 発表標題 肝細胞癌におけるBMP9発現の臨床的意義と幹細胞性維持への影響
3. 学会等名 第54回日本肝癌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丹尾 幸樹、山下 太郎、本多 政夫、金子 周一
2. 発表標題 肝細胞癌悪性形質に関わるBMP9分子シグナルが制御する癌幹細胞維持機構の検討
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kouki Nio, Taro Yamashita, Han Chen, Hikari Okada, Masao Honda, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 BMP9 promotes EpCAM-positive cancer stem cell properties in hepatocellular carcinoma via ID1 activation.
3. 学会等名 AASLD 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丹尾 幸樹、山下 太郎、金子 周一
2. 発表標題 幹細胞性肝細胞癌に対するBMP9シグナル阻害剤の治療効果検討
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Han Chen, Kouki Nio, Taro Yamashita, Hikari Okada, Masao Honda, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 Targeting BMP9-ID1 signaling suppresses cancer stem cell features in hepatocellular carcinoma.
3. 学会等名 58th JSCO (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丹尾 幸樹、山下 太郎、金子 周一
2. 発表標題 肝癌幹細胞の活性化に寄与するID1を標的とした治療法の検討
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021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
研究協力者	陳 晗 (Chen Han)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------