

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590412

研究課題名（和文） インターフェロンを使用した肝細胞癌の治療及び予防に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Basic studies on the treatment and prevention of hepatocellular carcinoma with interferon

研究代表者

矢野 博久（YANO HIROHISA）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40220206

研究成果の概要（和文）：インターフェロン（IFN）の肝癌細胞に対する増殖抑制効果を効率よく発現させるために①IFN と他の薬剤との併用投与、②新規の薬物放出装置の利用、③IFN の増殖抑制作用、特に、アポトーシス（細胞死）誘導に最も重要に関連する分子の同定とその制御による効果を検討した。その結果、血管新生因子の発現を阻害する分子標的薬との併用では一定の効果があり、新規薬物放出装置の利用も今後の改良により有効である可能性が示された。IFN によるアポトーシス誘導に XAF-1、TRAIL という分子が密に関連し、これらの調節により効果の調節が可能となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To induce efficient anti-proliferative effect of interferon (IFN) on hepatocellular carcinoma cells, we performed the following investigation: 1) combination of other drugs with IFN, 2) application of new drug delivery system, and 3) determination and functional analysis of the molecules closely related with IFN-mediated apoptosis induction. As a result, combination of IFN with anti-angiogenesis drug was effective to a certain extent. New drug delivery system worked to some extent and may be more effective after some improvement. XAF-1 and TRAIL were closely related with the induction of apoptosis and the regulation of XAF-1 and TRAIL will modify the anti-proliferative effect of IFN.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、サイトカイン、インターフェロン、アポトーシス、阻害剤、分子標的薬剤

1. 研究開始当初の背景

現在、我国の肝癌による年間の死亡者は、3 万人以上に上り、肝細胞癌（以下、肝癌）の

多発国であるが、アジア諸国や北米も肝癌患者が増加傾向にあり、肝癌の発癌予防・再発

予防・有効な治療法の確立などは世界的に非常に重要なテーマである。I型インターフェロン (IFN) に属するIFN- α/β は、抗ウイルス作用、増殖抑制作用、免疫調節作用など種々の機能を有するサイトカインである。臨床的には、C型慢性肝炎などのウイルス性疾患や、腎癌・白血病などの腫瘍性疾患の治療薬として広く世界的に使用されている。C型慢性肝炎を完治させれば、肝癌の発生を防止できると思われるが、従来のIFN治療では、20%程度の患者にのみウイルスの完全除去が可能であった。しかし、近年、C型慢性肝炎患者に対するIFN- α/β の投与が、ウイルス駆除の有無とは関係なく肝発癌を有意に抑制することや、肝癌摘出術後の再発も有意に抑制する事が報告されている。IFNには、ウイルス駆除や発癌抑制効果以外に、抗癌剤 (5-fluorouracil [FU]) との併用投与により進行肝癌治療に対しての有効性もここ数年報告されている。しかし、その一方で、生体内でどのような機序でIFN- α/β が発癌抑制や抗腫瘍作用を発揮しているかについては臨床・基礎研究で十分解明されていない。

IFN- α/β 製剤は、天然型や遺伝子組換え型など数種類が現在臨床の場で使用されている。最近では、ポリエチレングリコール (PEG) 分子をIFN- α に結合させたPEG-IFN- α 製剤の使用が増加している。PEG-IFN- α 製剤は半減期が長く、長時間にわたりIFN- α が体細胞に対し作用することを可能とする薬剤である。PEG-IFN- α 製剤は、これまでのIFNと比べ、C型慢性肝炎に対する治療効果が高いと欧米や国内から報告されており、今後C型慢性肝炎治療の第一選択の治療薬となる可能性が推察されるが、肝発癌予防効果、肝癌再発予防効果、抗腫瘍効果に関しての効果は未知数であり、臨床及び基礎研究が必要である。また、ウイルス性肝硬変患者に対しては、IFNを用いた治療はこれまで保険適応外であったが、今年になりIFN- β を用いた治療が保険適応となり使用可能となった。今後、IFN- β の肝硬変患者におけるウイルス駆除、肝機能改善、そして肝発癌抑制に対する効果が期待できる。従って、IFN- β に関する上記同様の基礎研究が望まれる。

我々はIFN- α の肝癌に対する発癌予防、再発予防、抗癌効果の発現機序解明を目的とした基礎研究を独自に樹立した肝癌細胞株

と臨床で実際に使用される種々のタイプのIFNを用いてここ数年一貫して行ってきた。その結果、(1)肝癌組織は、IFN作用発現のためのIFN- α/β のレセプターを比較的高頻度に発現していること、(2)IFN製剤は、臨床投与量で肝癌細胞の増殖を抑制すること、(3)その機序としてミトコンドリア経路を介したアポトーシスや細胞周期の進行停止を誘導すること、(4)増殖抑制効果は、IFN- α の製剤やIFN- α サブタイプの種類により大きく異なること、(5)PEG-IFN- α 製剤は、*in vivo*では、これまでのIFN製剤よりも少ない投与回数で同等の抗腫瘍作用を発揮すること、(6)IFN- α 製剤と5-FU併用投与では、IFN- α の細胞周期停止誘導作用が強く誘導されて相乗的に増殖抑制効果が誘導されたこと、などを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

PEG-IFN- α 製剤やIFN- β 製剤の肝発癌抑制や肝癌治療に関する基礎的研究を以下の大きく二つのテーマに分けて行う。

(1)肝癌細胞に対するIFN製剤 (PEG-IFN- α 、IFN- β 製剤など)の投与方法の工夫による細胞増殖抑制効果増強に関して *in vitro* 及び *in vivo* において基礎的検討を行う。具体的には、①IFN製剤と他の薬剤との併用投与による検討、②新規薬物放出装置 (DDS) を使用したIFN製剤の抗腫瘍効果の検討を行う。

(2)肝癌培養細胞のIFN- α 誘導性アポトーシスや細胞周期進行停止誘導に最も重要な働きをする遺伝子を同定する。すでに、肝癌細胞株 HAK-1B 株と DNA マイクロアレイ法により、TRAIL, TRAIL-R1, TRAIL-R2 などの23種類のIFN- α 誘導性アポトーシス関連遺伝子と p16 などの19種類IFN- α 誘導性細胞周期停止関連遺伝子を同定している。成果は、新しい分子標的治療開発に有用である。

3. 研究の方法

(1)肝癌細胞に対するIFN製剤 (PEG-IFN- α IFN- β 製剤など)の投与方法の工夫による細胞増殖抑制効果増強に関する検討：

①Tyrosine kinase 活性阻害剤の一つであるAG490、NF κ B阻害剤 (プロテアソーム阻害剤)の一つであるラクタシスチンの自己ラクトン化による生成物の β -ラクトン、COX-2阻害

剤であるセレコキシブを使用した。IFN は、ヒト天然型 IFN- β (フェロン[®]) を使用した。使用濃度は、AG490 は、10、50 nM、 β -ラク トンは、1、5 μ M、セレコキシブは、5、20 μ Mを使用した。IFN は、40、200、1000 IU/mL を使用した。肝癌細胞株は、当教室で樹立した 11 種類の肝細胞癌細胞株を使用した。阻 害剤単独あるいは IFN と併用処理し、72 時間 後に MTT assay を行い生細胞数を同定した。

②抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体である ベバシズマブの単独及び IFN- α との併用に よる肝癌細胞の増殖に対する検討を行った。 in vitro の実験では、pegylated IFN- α 2a (pegasys[®]、中外製薬) 単独、ベバシズマブ (アバスチン[®]、中外製薬) 単独、両者併用に よる肝癌細胞増殖抑制効果について 72 時間 後に MTT assay で生細胞数を同定した。肝癌 細胞株は、当教室で樹立した HAK-1B 肝癌細 胞株を使用した。In vivo の実験では、HAK-1B 肝癌細胞を 800 万個ヌードマウスの皮下に接 種し、約 1 週間後腫瘍径が 1 cm 前後になった 時点で実験を開始した。IFN のみ投与群 (C 型慢性肝炎の治療に使用される pegasys[®] の臨 床投与量 (180 μ g/body) に相当する 0.06 μ g/マウスのみを皮下投与)、ベバシズマブ週 1 回投与群 (アバスチンの臨床投与量に相当す る 100 μ g アバスチン[®]/マウスのみ週 1 回腹 腔内投与)、ベバシズマブ週 2 回投与群、IFN とベバシズマブそれぞれ週 1 回投与群、コン トロール群 (培養液皮下投与、生理食塩水腹 腔内投与) を作成し実験を行った。23 日目に sacrifice して、腫瘍重量を測定した。また、 腫瘍の短径と長径を 2、3 日に一度行い、(短 径)² x 長径 x 1/2 の式に当てはめて推定体 積を求めてグループ間で比較した。

③新規 DDS の薬剤放出率の検討を行った。 in vitro での検討では、10,000 IU のヒト天 然型 IFN の BALL-1 lymphoblastoid IFN- α (OIF、大塚製薬株式会社) を含有したヒア ルロン酸-チラミンハイドロゲル (HA-Tyr gel) を dish 上に固定し、培養液をいれて、 経時的に培養液を採取し、放出される IFN- α の量を測定した。ヌードマウスを用いた in vivo の検討では、ヌードマウス皮下に 1.0 x 10⁶ IU の IFN- α を含有した HA-Tyr gel を埋 め込み、経時的にマウスから採血して、血清 中の IFN- α の濃度を測定した。

(2) 肝癌培養細胞の IFN- α 誘導性アポトー シス誘導に最重要な遺伝子の同定：

①HAK-1B 肝癌細胞の PEG-IFN- α 2b 処理によ り発現上昇あるいは低下したアポトーシス 及び細胞周期関連遺伝子を cDNA microarray 法により検索したが、その結果、変化を示し た遺伝子のうち、ミトコンドリア系のアポト ーシス誘導分子の Noxa, BNIP-3, XAF-1、そ して XAF-1 の標的蛋白でアポトーシスを阻害 する XIAP、Death receptor の TRAIL-R1, TRAIL-R2 とそのリガンドである TRAIL の発 現に関して 13 種類の肝癌細胞株を用いて検 討した。すなわち細胞を 1,000 IU/mL の PEG-IFN- α 2b 添加あるいは非添加で 72 時間 培養し検討を行った。mRNA レベルの検討は、 real time PCR で全ての細胞株で行った。蛋 白レベルの検討は、XAF-1, XIAP, TRAIL, TRAIL-R1, -R2 に関して FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) で解析した。②ヒト肝癌組織及び 非癌部の Noxa, BNIP-3, XAF-1, XIAP の発現 を mRNA レベルで real time PCR を用いて検 討した。③肝癌及び非癌部組織における XIAP と XAF-1 の発現を免疫組織化学的に検討し、 肝癌組織におけるアポトーシスとの関連性 について検討した。④13 種類の肝癌細胞を、 250、1,000 あるいは 4,000 IU/mL の PEG-IFN- α 2b 添加あるいは非添加で 48 時間 培養し 0.39-100 ng/mL の recombinant TRAIL を添加培地と交換し 24 時間後に MTT assay により生細胞数を測定した。⑤TRAIL 特異的 な siRNA とランダム siRNA を PEG-IFN- α 2b 添 加あるいは非添加で培養している HAK-1B 細 胞に導入し、TRAIL の発現とアポトーシスの 出現 (Annexin-V の発現) を FACScan で検討 した。⑥HAK-1B 細胞と cDNA microarray 法に より同定した細胞周期進行停止誘導に関連 する遺伝子の 6 種類の肝細胞癌細胞株にお ける mRNA の発現に関して検討した。

4. 研究成果

(1) 肝癌細胞に対する IFN 製剤 (PEG-IFN- α 、IFN- β 製剤など) の投与方法の工夫によ る細胞増殖抑制効果増強に関する検討結果：
①各種阻害剤 (Tyrosine kinase 阻害剤、NF κ B 阻害剤、COX-2 阻害剤) は、単独では種々 の程度に肝癌細胞株の増殖を抑制したが、 IFN との併用投与では、相乗的増殖抑制作用 は認められず、相加作用あるいは相殺作用を 認めたのみであった。AG490 は、6 株が相加 作用、5 株が相殺作用、 β -ラク トンは、2

株が相加作用、9株が相殺作用、セレコキシブは、全てで、軽度から種々の程度の相殺作用を認めた。

②In vitroにおいて、ベバシズマブは、直接的な肝癌の増殖抑制作用は示さず、IFNと併用投与してもベバシズマブによる相加・相乗的な増殖抑制作用は見られなかった。In vivoにおいては、IFN単独、ベバシズマブ単独週1回で、約50%程度増殖が抑制され、ベバシズマブのみ週2回投与では増殖が、約60%程度抑制された。IFNとベバシズマブの併用は、それぞれの単独投与とほとんど変わらないか、軽度に増殖抑制効果が増強した。組織学的に壊死はIFNとベバシズマブの併用群で最も多く見られた。今後、ベバシズマブを含め種々の分子標的薬とIFNの併用による肝癌に対する抗腫瘍効果の増強作用の有無に関する継続的な検討が必要である。

③新規DDSの薬剤放出率に関しては、in vitroでは、1日目で既にゲル内の25%程度のIFN- α が培養液中に放出されその後、1/20程度の量が徐々に6日間で放出されていた。in vivoでは、皮下埋め込み後6時間の時点で既に血中濃度は最高値に達しており、12時間目で6時間目の2/3の濃度に、24時間で1/4の濃度になり、以後徐々に低下を示した。生物学的半減期は18.6時間であった。この結果は、半減期が皮下注射した場合の3倍程度延長はしているものの、初期に放出量が多く薬物の放出速度のコントロールは不十分であった。現在別の素材の新規DDSが既に開発されており、今後、IFN、分子標的薬の単独あるいは併用投与を行いこのDDSの有用性について検討を継続する予定である。

(2) 肝癌培養細胞のIFN- α 誘導性アポトーシス誘導に最重要な遺伝子の検討結果：
①PEG-IFN- α 2b処理によりXAF-1のmRNAの発現上昇が13株全てで見られたが、Noxa, BNIP-3, XIAPに関しては、3株ずつで2倍以上の発現上昇を認めたのみであった。蛋白レベルでは、XAF-1とXIAPの発現はPEG-IFN- α 2b処理によりそれぞれ8株と11株で低下したが、XAF-1が低下しない細胞株、及びXAF-1が低下してもXIAPの発現が上昇した細胞株は、PEG-IFN- α 2b誘導性アポトーシスに比較的抵抗性であった。TRAILのmRNAの発現上昇を11株で認め、TRAIL-R1, -R2の発現上昇を4株、3株で認めた。蛋白レベ

ルでもTRAILの発現上昇を9株で、TRAIL-R1, -R2の発現上昇を10と6株で認めたが、必ずしもPEG-IFN- α 2bのアポトーシス誘導性と関連しなかった。②ヒト肝癌組織は、非癌部に比べXIAP, XAF-1, Noxa, BNIP-3すべて発現が低下していたが、Noxaが最も低く、XAF-1, XIAP, BNIP-3の順であった。③ヒト肝癌組織及びその非癌部組織のXIAPとXAF-1の発現検討では、非癌部・癌部ともにいずれの分子も発現を認めた。XAF-1は、門脈域のアポトーシスが生じる部分で特に発現が強く見られた。癌部での発現に関しては、XIAPは、肝癌の分化度に関係なく一定の発現を認めたが、XAF-1は、低分化型肝癌で発現の低下を認めた。ヒト肝癌組織のアポトーシスは、分化度の低下とともに減少し、XAF-1の発現と有意な相関性を示した。④肝癌細胞株の6株は、rTRAILによるアポトーシス誘導作用に感受性が高く、5株では、PEG-IFN- α 2bの前処置により感受性となった。また、11株でPEG-IFN- α 2bの前処置により感受性が上昇したが、2株は比較的感受性が乏しかった。⑤HAK-1B株では、TRAIL特異的siRNAを用いた実験によりPEG-IFN- α 2bによるTRAILの発現抑制とそれに伴うアポトーシスの減少が認められ、HAK-1B株におけるPEG-IFN- α 2bによるアポトーシスは、TRAIL/TRAIL-Rを介して誘導されることが証明された。⑥5種類(CDK2, cyclinD, p16, p21, p27)の細胞周期関連蛋白の発現をreal-time PCR法を用いて6種類の肝癌株において検討した結果、PEG-IFN- α 2b接触48時間後では、p21の発現が全ての細胞株で、p27の発現が1株でコントロール(PEG-IFN- α 2b非接触)の2倍以上に上昇した。2株において、経時的に発現を検討すると、1株では、CDK-2やCyclinDの発現が接触後6時間で上昇していた。今後、蛋白レベルの変化やその蛋白の機能・役割についての検討が必要である。

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8件中6件)

1. Yano H. Inhibitory function of interferon on hepatocarcinogenesis. *Oncology* (査読有り) 75 (suppl 1): 2008, 22-29.

2. 矢野博久. 肝癌の発生・進展とインターフェロンによる制御. J Microwave Surg (査読無し) 26:2008, 21-26.
3. Moriya F, Ogasawara S., Basaki Y., Akiba J., Kojiro S., Fukahori S., Ishizaki H., Nishida N., Matsuoka K., Kojiro M., Kuwano M., Yano H. Growth inhibitory effects of pegylated IFN- α 2b and 5-fluorouracil in combination on renal cell carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. Int J Oncol (査読有り) 33:2008, 647-655.
4. Sakemi, R, Yano H., Ogasawara S., Akiba J., Nakashima O, Fukahori S, Michio S, and Kojiro M. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and XIAP-associated factor-1 expression and their relationship to apoptosis in human hepatocellular carcinoma and non-carcinomatous liver tissues Oncology Reports (査読有り) 18:2007, 65-70.
5. Ogasawara S., Yano H., Momosaki S, Akiba J., Nishida N, Kojiro S, Moriya F, Ishizaki H, Kuratomi K, Kojiro M. Growth inhibitory effects of IFN- β on human liver cancer cells *in vitro* and *in vivo* Journal of Interferon & Cytokine Research (査読有り) 27: 2007, 507-516.
6. Oie S, Ono M, Fukushima H, Hosoi F, Yano H., Maruyama Y, Kojiro M, Terada T, Hirano K, Kuwano M, Yamada Y. Alteration of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by IFN- α affects the antiproliferative effects of 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma cells Mol Cancer Ther (査読有り) 6: 2007, 2310-8.

[学会発表] (計9件中6件)

1. 小笠原幸子, 他. 肝細胞癌における RecQL1 ヘリカーゼ発現の臨床病理学的検討. 第45回日本肝臓学会総会. 2009年6月4日.神戸.
2. Ogasawara S. et al. Expression of RecQL1 helicase in hepatocellular carcinoma. Annual Meeting of International Liver cancer Association. September 5, 2009, Milan, Italy.
3. Hisaka T. et al. Quercetin suppresses the proliferation of liver cancer cell lines *in vitro*. Annual Meeting of International Liver cancer Association. September 5, 2009, Milan, Italy.
4. 小笠原幸子, 他. シグナル伝達分子阻害剤単独あるいはインターフェロンとの併用による肝癌細胞の増殖抑制効果の検討. 第68回日本癌学会学術総会. 2009年10月3日.

横浜.

5. 小笠原幸子, 他. ペグインターフェロン- α 2bにより肝細胞癌株に誘導されるアポトーシス及び細胞周期関連遺伝子の変化に関する研究. 第44回日本肝臓学会総会.2008年6月6日.松山.
6. Yano H. et al. Analyses of the expression of interferon-mediated apoptosis-related molecules in human liver cancer cell line. Annual Meeting of International Liver cancer Association. September, 4, 2008, Chicago, USA.

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 博久 (YANO HIROHISA)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：40220206

(2)研究分担者

小笠原 幸子 (OGASAWARA SACHIKO)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：40258405
秋葉 純 (AKIBA JUN)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：00341305