

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 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390378

研究課題名（和文） 進行肝臓に対する肝特異的分子生物学的特性を応用した新規治療法の展開と応用

研究課題名（英文） The expansion in application of novel treatment through the liver specific signaling pathway for the intractable and advanced hepatocellular carcinoma

研究代表者

永野 浩昭 (NAGANO HIROAKI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10294050

研究成果の概要（和文）：IFN 併用化学療法的作用機序について検討した。

（1）【IFN レセプターからのシグナル伝達を介した抗腫瘍効果の機序】

IFN レセプターからの各種シグナル伝達と抗腫瘍効果の関係について、①death ligand (Fas-FasL) を介した腫瘍細胞破壊機構、②apoptosis 関連蛋白 (Bcl-2, Bcl-xL, Bax 等)、及び実行蛋白 (caspase 群) とその関係を明らかにした。

【免疫賦活作用からの apoptosis の誘導】

免疫賦活作用増強については、IFN 併用化学療法下での、CTL の誘導と肝細胞癌細胞株の apoptosis の関連が明らかになった。

（2）【抗血管新生作用関連】

IFN の抗血管新生効果に関しては、腫瘍内における血管新生関連因子の mRNA レベル及び蛋白レベルでの評価において、Ang-2 の発現と抗腫瘍効果の関与を明らかにした。

（3）難治性進行肝細胞癌症例に対する IFN 併用化学療法の効果の検討

【効果予測式の作成と臨床応用】

効果予測を前提として、不応答性肝細胞癌細胞株を作成し、これらを用いて網羅的遺伝子解析 (cDNAmicroarray) を施行し、効果予測ために有用性を認める遺伝子として epi-CAM さらには、Insulin-like growth factor binding-protein 7 (IGFBP7) を同定した。

研究成果の概要（英文）：SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

（1）The mechanism of the antitumor effect through the IFN- IFNAR signaling

The anti-tumor effect of IFN/5-FU combined therapy was significantly correlated with the strength of IFNAR expression, in the HCC cells in-vitro. This was also proved in the experiment of the IFNAR gene transfection model. In this mechanism, the upregulation of the p-STATS and Bcl-xl expression were most significantly correlated with anti-tumor effect, among the several signal transductional factors.

（2）Anti tumor effect through TRAIL/TRAIL receptor and Fas/FasL

Among peripheral blood cells, NK cells were found to exert the cytotoxic effects on human hepatoma cells. In addition, the involvement of CTL system in the anti tumor effect was examined and confirmed in terms of the relationship of apoptosis in this study.

（3）The Gene Expression Profiling

Using the clinical samples treated by IFN- α and 5-FU, the gene expression profiling would be suggested to be useful for the prediction of the treatment efficacy. In addition, the 2 candidates of predictive factors for anti-tumor effect of IFN- α and 5-FU was identified by Gene Expression Profiling with unresponsive HCC cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：肝細胞癌、難治性進行癌、門脈内腫瘍栓、インターフェロン、化学療法、インターフェロン受容体、血管新生、トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の予後は依然として不良で、その中でも門脈内腫瘍栓など脈管侵襲をとまなう進行肝臓癌については、肝切除、肝移植、経動脈的化学塞栓療法 (TAE) や経皮的ラジオ波焼灼療法 (RFA) などの既存治療はまったく期待できない。さらに、QOLも極めて悪く、ほとんどの症例が6ヶ月以内に死に至る。したがってこのような高度脈管侵襲症例に対する有望かつ有効な治療法の開発は、急務である。その可能性の一つとして、われわれの提唱してきたIFN併用化学療法は、高度進行肝臓癌に対する集学的治療の一基軸としてきわめて有用であるとの知見を得た。その一方で、本療法は残念ながら奏効率が約40%程度で、その他の症例においては全く治療効果を認めない。これら無効症例の克服が課題であることはいうまでもなく、その奏効率向上のためには、IFN併用化学療法の機序解明は不可欠であり、さらに肝臓癌全体の生存率向上に大きく寄与することに異論はない。

2. 研究の目的

本研究は、欧米では治療の対象とさえならない、いわゆる治療抵抗性難治性進行肝臓癌に対する予後向上がその主目的ではあるが、さらに最終的には肝臓癌の根治療法の確立までも視野の中に入れていいる。というのは肝臓癌進展過程における終末段階である難治性進行肝臓癌の治療を確立し得れば、飛躍的に肝臓癌治療成績は向上する。IFN併用化学療法の有効性の機序については、肝臓癌特異的な分子生物学的特異性を反映している可能性が高い。その中で、(1)IFNレセプター (IFNAR) を介した抗腫瘍効果、(2)免疫賦活作用にとまなう抗腫瘍効果、(3)血管新生抑制効果、の3つの可能性がある。(1)については直接的な抗腫

瘍効果であり、(2)(3)に関しては、前者はNK細胞、T細胞などのリンパ球を介した、後者は腫瘍細胞の放出する血管新生促進因子、抑制因子を介した、いずれも間接的な抗腫瘍効果である。

これら(1)(2)(3)については、肝臓癌における他消化器癌と異なる分子生物学的特異性に立脚しており、本研究ではこれらの観点より、IFN併用化学療法の抗腫瘍効果の機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) IFNARからのシグナル伝達を介した抗腫瘍効果の機序
RT-PCRおよびWestern blot法にてapoptosis抑制蛋白(Bcl-2, Bcl-xL, IAP等)、促進蛋白(Bax, Bad, Bid, APAF1, Smac等)及び実行蛋白(caspase群)の発現がIFN-α併用化学療法でどのように変化するかを、in vitro及びin vivoで検討し、IFN不応答肝臓癌細胞株をもちいて、直接効果関連因子に関する因子について、検討する。

(2) 免疫賦活作用からのapoptosisの誘導
肝内網内系の賦活化による、CTL, NKを介したapoptosisを誘導する系について、FasL-Fasの系、TRAIL-TRAIL-receptor (TRAIL-R)の系の関与に加えて、本研究においては調節性T細胞の関与について検討する。肝臓癌細胞株5種(HuH7, PLC/PRF/5、HLE, HLF、HepG2)を用いて、Tリンパ球表面上のFox-p3の発現や腫瘍細胞上のmRNAレベル(RT-PCR法)での変化、5-FUおよびIFN-αで刺激し、腫瘍細胞傷害能の変化を末梢血単核球をIFN-αで刺激し肝臓癌細胞株に対するcytotoxicityの変化を⁵¹Cr放出試験にて解析する。また、これらのCTL, NKを介するapoptosisの誘導のための、細胞内

death signal が核に伝達される過程での各種 caspase の変化、CAD-ICAD、の関与を mRNA レベル及び蛋白レベルで検討する。

(3) 抗血管新生作用関連

培養肝癌細胞株 (PLC/PRF/5) とヒトサイ帯静脈細胞 (HUVEC) をもちいて混合培養し、さらには IFN と 5FU をもちいて付加実験をすることにより、VEGF などの血管新生因子の産生の抑制について検討する。また nude mouse ヒト腫瘍移植モデルやマウス同種腫瘍移植モデルを使用し、MVD (micro-vessel density) の測定にくわえて固形癌での血管新生の多寡の評価及び腫瘍内における血管新生因子 (Ang, VEGF, Tie2 など) の mRNA レベル (定量的 RT-PCR 法) 及び蛋白レベルでの発現量の評価 (免疫組織染色、ELISA 法) を行う。

さらに、本機序からみた分子標的薬 (PTK/ZK) との併用の可能性について検討する。

4. 研究成果

(1) IFNAR からのシグナル伝達を介した抗腫瘍効果の機序

IFNAR からの各種シグナル伝達と抗腫瘍効果の関係について、①STAT のリン酸化に伴う核内移行とその後の、②death ligand (Fas-FasL) を介した腫瘍細胞破壊機構、③apoptosis 抑制蛋白 (Bcl-2, Bcl-xL, IAP 等)、促進蛋白 (Bax, Bad, Bid, APAF1, Smac 等) 及び実行蛋白 (caspase 群) の発現の解析について終了し、その関係を明らかにした。

(2) 免疫賦活作用からの apoptosis の誘導 免疫賦活作用増強のために、IFN- α の代わりに IFN- β の組み合わせの可能性について解析し、抗腫瘍効果は IFN- α と同等もしくはそれ以上であった。また、IFN 併用化学療法下での、CTL の誘導と肝細胞癌細胞株の apoptosis の関連が明らかになった。

(3) 抗血管新生作用関連

IFN の抗血管新生効果に関しては、腫瘍内における血管新生関連因子 (TSP, Ang-1, Ang-2, VEGF, Tie2, HIF1- α) の mRNA レベル及び蛋白レベル (免疫組織染色、ELISA 法) での評価においては、Ang-2 の発現が抗腫瘍効果との関与の可能性を明らかにした。

(4) 治療効果予測因子に関する検討

効果予測を前提とする臨床応用のために、不応答性肝癌細胞株を作成し、これらを用いて網羅的遺伝子解析 (cDNAmicroarray) を施行し、key 遺伝子についての検索を行った。pick-up されたこれら遺伝子群と臨床検体での結果の相互性について臨床検体で検討を加えたところ、効果予測に有用性を認める遺伝子が示された。

さらに、本研究期間においては、治療効果予測因子については、肝癌細胞株 PLC/PRF/5 に IFN- α を持続的に曝露して IFN- α 耐性株を作成し、樹立した耐性株と親株の網羅的遺伝

子発現解析を行った。樹立した耐性株では、親株と比較して IFN- α に対する耐性が増強し、耐性株と親株の網羅的遺伝子発現解析の結果より、耐性株において発現が有意に低下している遺伝子として、epi-CAM さらには、Insulin-like growth factor binding-protein 7 (IGFBP7) を同定した。さらに、親株に、これらの因子の siRNA を導入すると IFN- α に対する薬剤耐性の増強を認め、耐性株に、これらの因子のを強制発現させると、IFN- α に対する薬剤耐性の減弱を認めた。このことより、IFN- α /5-FU 併用化学療法の耐性には、epiCAM および IGFBP7 が関与している可能性が高く、IGFBP7 は治療効果予測マーカーになり得ると考えられた。

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 23 件)

1. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Kubota S, Takigawa M, Tomimaru Y, Tomokuni A, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2011; 121(8):3343-3356. 査読有
2. Tomokuni, A, Eguchi H; Tomimaru Y, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Nagano H, Mori M, Doki Y. miR-146a suppresses the sensitivity to interferon- α in hepatocellular carcinoma cells. *BBRC* 2011 2011; 414(4): 675-68. 査読有
3. Tomimaru Y, Eguchi H, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Advantage of autologous blood transfusion in surgery for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(32): 3709-3715. 査読有
4. Marubashi S, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in peripheral blood in liver resection for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011 Aug;18(8):2200-2209. 査読有

5. Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Tanemura M, Tomimaru Y, Osuga K, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Long-term outcome of combined subcutaneous interferon- α and intra-arterial 5-fluorouracil treatment for advanced hepatocellular carcinoma with major portal vein thrombosis. *Oncology* 2011; 80(1-2): 63-69. 査読有
6. Noda T, Nagano H, Tomimaru Y, Murakami M, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Kim T, Wakasa K, Doki Y, Mori M. Prognosis of hepatocellular carcinoma with biliary tumor thrombi following liver surgery. *Surgery* 2011; 149(3): 371-377. 査読有
7. Murakami M, Kobayashi S, Marubashi S, Tomimaru Y, Noda T, Wada H, Eguchi S, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Tyrosine kinase inhibitor PTK/ZK enhances the anti-tumor effects of interferon- α /5-fluorouracil therapy for hepatocellular carcinoma cells. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18(2): 589-596. 査読有
8. 永野浩昭、和田浩志、丸橋 繁、川本弘一、小林省吾、江口英利、種村匡弘、土岐祐一郎、森 正樹、進行肝臓に対する集学的治療、外科治療、105(5): 461-466, 2011 査読有
9. Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Tomokuni A, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Takeda Y, Umeshita K, Doki Y, Mori M. MicroRNA-21 induces resistance to the anti-tumor effect of interferon- α /5-fluorouracil in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 2010;103(10):1617-1626. 査読有
10. Kogita S, Imai Y, Okada M, Kim T, Onishi H, Takamura M, Fukuda K, Igura T, Sawai Y, Morimoto O, Hori M, Nagano H, Wakasa K, Hayashi N, Murakami T. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance images of hepatocellular carcinoma: correlation with histological grading and portal blood flow. *Eur Radiol*. 2010 Oct; 20(10): 2405-2413. 査読有
11. Kittaka N, , Seno S, Takeda Y, Kobayashi S, Marubashi S, Dono K, Umeshita K, Nagano H, Matsuda H, Monden M, Mori M, Doki Y. Exploration of Potential Genomic Portraits Associated with Intrahepatic Recurrence in Human Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(12): 3145-3154. 査読有
12. Nagano H. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma: intraarterial infusion chemotherapy combined with interferon. *Oncology* 2010; 78(suppl 1): 142-147. 査読有
13. Tomimaru Y, Nagano H, Eguchi H, Kobayashi S, Marubashi S, Wada H, Tanemura M, Umeshita K, Hiramatsu H, Takehara T, Doki Y, Mori M. Effects of preceding interferon therapy on outcome after surgery for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J of Surg Oncol*. 2010; 102: 308-314. 査読有
14. Tomimaru Y, Eguchi H, Wada H, Noda H, Murakami M, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 Alters the Sensitivity to Interferon-Based Anticancer Therapy in Hepatocellular Carcinoma Cells. *B J Cancer* 2010;102(10):1483-1490. 査読有
15. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Noda T, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2010; 52(5): 698-704. 査読有
16. Tsuboyama T, Onishi H, Kim T, Akita H, Hori M, Tatsumi M, Nakamoto A, Nagano H, Matsuura N, Wakasa K, Tomoda K. Hepatocellular carcinoma: hepatocyte-selective enhancement at gadoxetic acid-enhanced MRImaging-correlation with expression of sinusoidal and canalicular transporters and bile accumulation. *Radiology* 2010; 255(3): 824-833. 査読有
17. Murakami M, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi S, Takeda Y, Tanemura M, Wada H, Umeshita K, Wakasa K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Isolated Metastasis to the Gall Bladder from Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology Research* 2010; 40(8): 793-798. 査読有
18. Murakami M, Nagano H, Kobayashi S, Nakamura M, Marubashi S, Eguchi H,

- Takeda Y, Tanemura M, Sugita Y, Umeshita K, Monden M, Doki Y, Mori M. Effects of preoperative transcatheter arterial chemoembolization for resectable hepatocellular carcinoma: Implication of circulating cancer cells by detection of alpha-fetoprotein mRNA. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2010; 1: 485-491. 査読有
19. Yoshioka S, Takemasa I, Nagano H, Kittaka N, Noda T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Umeshita K, Dono K, Matsubara K, Matsubara N, Monden M. Molecular prediction of early recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *EJ Cancer* 2009; 45(5): 881-889. 査読有
 20. Noda T, Nagano H, Takemasa I, Yoshioka S, Murakami M, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Dono K, Umeshita K, Matsuura N, Matsubara K, Doki Y, Mori M, Monden M. Activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2009; 100(10): 1647-1658. 査読有
 21. Nagano H, Miyamoto A, Kishimoto S, Takeda Y, Marubashi S, Kobayashi S, Tomimaru Y, Noda T, Umeshita K, Dono K, Sakon M, Monden M. A safe protocol of intermittent hilar vascular clamping for hepatic resection in cirrhosis. *Hepatogastroenterol* 2009; 88(9): 1123-1130. 査読有
 22. Wada H, Nagano H, Yamamoto H, Noda T, Murakami M, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y and Mori M. Combination of interferon-alpha and 5-fluorouracil inhibits endothelial cell growth through regulation of angiogenic factors released by tumor cells. *BMC Cancer* 2009; 9: 361-372. 査読有
 23. 永野浩昭、石井秀始、土岐祐一郎、森正樹、癌幹細胞と薬剤耐性 *Cancer Frontier*, 11; 100-105: 2009 査読有

[学会発表] (計 9件)

1. 永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹、肝癌に対する外科治療、第28回日本医学会総会、2011.4.8(東京) [シンポジウム]
2. 永野浩昭、丸橋 繁、小林省吾、和田浩志、江口英利、武田 裕、種村匡弘、梅

下浩司、門田守人、土岐祐一郎、森正樹、肝細胞癌術後再発への治療戦略—長期予後を目指して—第65回日本消化器外科学会総会、2010.7.14(下関) [シンポジウム]

3. 永野浩昭、丸橋 繁、武田 裕、小林省吾、種村匡弘、堂野恵三、梅下浩司、門田守人、土岐祐一郎、森正樹、脈管侵襲陽性・進行肝細胞癌に対する集学的治療、第64回日本消化器外科学会総会、2009.7.16(大阪) [シンポジウム]
4. 永野浩昭、丸橋 繁、小林省吾、江口英利、武田 裕、種村匡弘、梅下浩司、門田守人、土岐祐一郎、森正樹、肝細胞癌に対する成人間生体肝移植における再発予測に関する検討、第27回日本肝移植研究会、2009.7.10(三島) [シンポジウム]
5. 永野浩昭、丸橋 繁、野田剛広、小林省吾、江口英利、武田 裕、種村匡弘、梅下浩司、若狭研一、門田守人、土岐祐一郎、森正樹、肝細胞癌切除後10年無再発症例の検討、第45回日本肝癌研究会、2009.7.3(福岡) [シンポジウム]
6. 永野浩昭、丸橋 繁、武田 裕、小林省吾、種村匡弘、北川 透、梅下浩司、堂野恵三、門田守人、土岐祐一郎、森正樹、血行再建を伴う進行肝細胞癌に対する肝切除、第21回日本肝胆膵外科学会、2009.6.10(名古屋) [ビデオシンポジウム]
7. 永野浩昭、丸橋 繁、竹政伊知朗、小林省吾、武田 裕、種村匡弘、北川 透、堂野恵三、土岐祐一郎、森正樹、門田守人、肝癌外科治療後の再発予測・予防における臨床・基礎両面からの個別化医療への可能性、第45回日本肝臓学会総会、2009.6.4(神戸) [ワークショップ]
8. 永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹、Treatment of Advanced HCC with macrovascular invasion and no extrahepatic spread: Beneficial effect of combination therapy of IFN/5-FU for advanced HCC with PVTT 第45回日本肝臓学会総会、2009.6.4(神戸) [シンポジウム]
9. 永野浩昭、門田守人、森正樹、門脈内腫瘍栓をともなう進行肝細胞癌におけるIFN併用化学療法的位置づけ、第95回日本消化器病学会総会、2009.5.7(札幌) [シンポジウム]

[図書] (計 1件)

- 永野浩昭、森正樹
消化器疾患診療の課題と展望 序章—2
外科
最新治療シリーズ「消化器疾患の再診診療」、

2011、編集：戸田剛太郎、井廻夫、幕内雅俊、
白鳥敬子 27-29 先端医療技術研究所、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 浩昭 (Nagano Hiroaki)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10294050

(2) 研究分担者

丸橋 繁 (Marubashi Sigeru)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20362725

小林 省吾 (Kobayashi Shougo)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30452436

竹政 伊知朗 (Takemasa Ichiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30452436