

機関番号：20101

研究種目：若手研究B

研究期間：2009～2010

課題番号：21790674

研究課題名（和文）

VA-Lip-siRNA を使用した肝癌予防法の開発

研究課題名（英文）

Development of liver cancer preventive methods using VA-Lip-siRNA

研究代表者

村瀬 和幸 (Kazuyuki Murase)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90444918

研究成果の概要（和文）：本研究で我々は線維化が肝癌発症に及ぼす影響を明らかにするための基礎的検討として、CDAA diet model の確認実験および基礎解析を中心に行った。また同時に siRNAHSP47 によるコラーゲン抑制法にて線維化改善による肝癌発症予防が可能であるかの検討を行った。さらに線維化と肝癌のメカニズムについても解析を加え肝発癌の機序解明および予防に向けての基礎データを得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established liver fibrosis model using CDAA diet model and investigated the mechanism of liver carcinogenesis induced by fibrosis. Furthermore, we examined whether the resolution of collagen deposition by siRNA-HSP47 could prevent hepatic carcinoma using CDAA diet model. Finally, we could obtain the fundamental data regarding the plausible mechanisms of liver carcinogenesis by fibrosis which should be promising for prevention of liver fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：①移植・再生医療 ②核酸 ③癌 ④再生医学 ⑤脂質

1. 研究開始当初の背景

医療の進歩に伴い、肝細胞癌の早期発見、早期治療は困難なものでは無くなりつつある。しかし肝細胞癌の5年生存率は50%をようやく超えたに過ぎず、極めて不良である。この原因はひとえに年20%以上という高い再発率にある。この理由として肝臓癌の特徴である多中心性発癌（フィールド発癌）が挙げられる。肝臓においても他の癌腫と同様に

多段階発癌の経過を取る点では変わりはない。しかし、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスによるウイルス発癌にしろ、アフラトキシン等による化学発癌にしろ、肝臓全体が一つのフィールドとして発癌刺激に曝されるため、肝臓内にそれぞれが独立した「癌の芽」が複数発生してくる。このため、いくら早期に臨床的癌を発見、治療しても、残された肝臓にある前癌病変から発癌するために、

肝臓癌は高い再発率を持つことになる。このため、肝細胞癌については早期発見、早期治療に加えて、発癌自体を抑止する方策を講じることが、診療成績を改善する上で不可欠であると考えられている。また実際に肝硬変から年間5-7%と、ほぼ一定の割合では発癌することが報告されており、肝硬変は肝発癌の高危険群と見なすことが出来る。このため発癌予防の対象は再発のみでなく、慢性肝炎、肝硬変の治療までが大きく含まれている。現在のところ発癌の機序としては、日本の発癌の約7割を占めているC型肝炎ではミトコンドリア機能異常に起因するROS(reactive oxygen species)の関与が示唆されている。また近年生活習慣病の増加に伴い、頻度の増えてきたNASHでは活性酸素やフリーラジカルといった酸化ストレスがその一因として考えられており、脂質過酸化に基づく酸化ストレスが肝細胞障害を惹き起こし、発癌を促進すると考えられているが不明である。また一方で肝炎とはどんな機序にしる個々の肝細胞の崩壊によってもたらせるものであり、慢性肝炎、肝硬変状態は肝細胞の不規則再生が持続している状況である。細胞回転の亢進が発癌にとって不可欠であることは周知の事実である。よって、発癌予防としては(1)炎症をblockすること。(2)肝線維化を治療し、肝細胞を正常状態に戻すこと。以上の2点が挙げられる。具体的にはウイルス感染の制御(ワクチン)、肝炎ウイルスの排除(IFN、ラミブジン)、レチノイド(Vitamin A誘導体)などがある。実際に現在、臨床成績も急速に蓄積されつつあり、C型肝炎硬変におけるIFN治療により肝癌発生が抑えられる報告や、レチノイドによる再発予防の報告がある。一方で、線維化抑制療法に関しては有効な臨床報告は未だ成されていない。これまで肝線維化治療の様々な試みがなされ、例えば線維化促進因子であるTGF- β の受容体の阻害、HGFによるTGF- β 活性化の阻害、gliotoxinなどの細胞毒によるHSCのアポトーシスの誘導、イオンチャンネル阻害剤や転写因子阻害剤によるHSCの活性化阻害、TIMP-1抗体やMMP-1自体の投与によるマトリックス分解系の促進などが動物の肝線維化モデルで検討されある程度の有効性が示されてきた。しかし、これまでにこれらの方法が臨床にまで展開された報告は見られない。その最大の理由は、治療戦略が方法論的に標的分子や標的細胞に対する特異性に欠けており重篤な副作用を生じる恐れがあったためであった。しかし、申請者らが開発したHSP47siRNAを使用したVA-Lip-siRNAによる治療は重篤な副作用も無く、安全に肝線維化を治療することが可能である。(Nature Biotechnol. 2008,26:431-442)。このため本法は線維化と発癌の関係をみるのに適切な

方法であり、実際に予防抑制効果が実証できれば、人への臨床応用が十分期待できる治療法であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 線維化が肝癌発症に及ぼす影響の検討
線維化を経由し肝癌を発症するCDA食ラットモデルを用いVA-lip-siRNAHSP47投与により癌化の遅延や、予防効果が得られるかを検討し、発癌に対する影響を明らかにしたい。さらに線維化無く肝癌を発症するモデルである鉄過剰投与HCV transgenic miceを使用し、比較検討する事で機序を明らかにしたいその際の副作用について、siRNA-liposome投与時に報告されているIFN誘導や炎症性サイトカイン等の誘導が無いかどうかを含め、多角的に検討する。

(2) 線維化と肝癌増殖のメカニズムおよび線維化改善と肝癌予防のメカニズムの検討
HSCの存在下での肝癌細胞の増殖能力を解析を行うとともに、コラーゲンの存在有り無しの状態での肝癌細胞の増殖能力の解析することで、線維化と発癌のメカニズムを検討したい。またin vitroで増殖因子の解析のために肝癌細胞とHSC、線維芽細胞との共培養を行い、遺伝子profileを比較検討すると共に、in vivoでのVA-Lip-siRNA法による治療の有無での遺伝子profileを比較検討する。また一方でSCIDマウスでの担癌実験で、in vivoにおける肝癌細胞の増殖をHSCの存在の有無および治療の有無で比較検討する。

3. 研究の方法

(1) CDA食モデル実験系の確認および基礎解析

5週齢のFisher 344 ratsを用意し、CDA食(PMI Nutrition International)を持続して摂取させる。文献的には1週で脂肪沈着が始まり、1-4週apoptosisが始まる。12週で線維化が始まり、30週で肝硬変は発症。そして52週間摂取させた時点で肝癌を100%発症するモデルである。これと通常食を摂取させたcontrolのFisher 344 ratsと比較検討し、NASH→HCC発症modelを確立、確認する。さらにこの系のラットに対して、我々が既報で示したVA-Lip-siRNAを投与することで線維化および肝発癌を改善することが出来るかを確認する。当初の予定としては肝硬変の治療をすることで肝癌発症を抑えることが出来るか検討するために、30週から治療を開始する。週1回から5回程度の間隔での投与を検討する。また、臨床応用にむけて最適なsiRNA投与間隔プロトコルを検討するため、肝硬変の改善を維持できる間隔を週1から3回程度の投与間隔で検討する。上記治療後の52週時点での肝臓を組織学的に評価する。腺腫の割合および肝細胞癌の発

生率、腫瘍伸展速度を control 群と比較検討する。これらの評価として、一部のラットは屠殺し肝組織の線維化および腺腫割合、肝癌発生率を評価する。線維化の評価は、Azan-Malloy 染色、SMA 染色をおこない、これらの定量化は NIH image を利用する。さらに、hydroxyproline の定量も行う。また、評価項目としてビリルビン、albumin、ALT,AST、ヒアルロン酸等の肝機能も検討する。また副作用のモニターとして、特に TLR 由来のサイトカインとして、 $INF\ \alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL12$ や TNF などの炎症性サイトカインの誘導や補体の活性化並びに血算についてもできる限り検討する。さらにできる限り腫瘍マーカーの経過も検討する。申請者の既報 (Nature Biotechnol. 2008,26:431-442) では合計 12 回の治療で、各 DMN model、BDL model、CCL4 model で線維化改善効果が得られていたが、これらはどれも 4w から 8w の間に肝硬変を発症する model であった。一方、今回使用のモデルでは肝硬変まで 30 週と、より慢性的な model であるため、治療の間隔および回数の検討も必要と考えられる。このため、上記で設定した治療間隔で 12 回投与、24 回投与、36 回投与の群間での治療の効果を比較検討する。30 週時点からの治療で線維化および肝細胞癌の改善が得られない場合は、線維化発症時点である 12 週に治療開始時期を変更するなど、適時対応する。

(2) 線維化改善と肝癌予防のメカニズムの解析

CDDA 肝癌発症ラットに対して PBS 投与群、siRNA HSP47 投与群より肝組織を採取する。またコントロールとして正常ラットから肝組織を採取する。これらから RNA を抽出し DNA microarray (Affymetrix GeneChip) を用い発現の変動している遺伝子を検索する。例えばコラーゲン、HSP47、MMPs、TIMP-1、またはアポトーシス関連遺伝子、細胞増殖シグナル関連遺伝子などを中心に検討する。肝細胞増殖率の検討： 5×10^6 個の肝細胞株 (HepG2、PLC/PRF/5) と HSC を SCID マウスに接種し、担癌マウスを作製する。コントロールとして肝細胞株と normal fibroblast および肝細胞株のみを接種した群を作製する。両群間での腫瘍の増殖率を比較検討する。腫瘍径の計測とともに周囲の線維化の評価も Azan-Malloy 染色、SMA 染色をおこない評価する。さらに VA-Lip-siRNA HSP47、VA-Lip-siRNA random、PBS をそれぞれ経静脈投与し、腫瘍径の変化を経時的に観察し、抗腫瘍効果を検討する。尚、投与 1 週目、2 週目に腫瘍を摘出し、腫瘍細胞内もしくは周囲にみられる HSC を α SMA 染色で同定し、形態並びに apoptosis の有無を確認する。線維化と肝癌増殖のメカニズムの解

析の為、以下の方法で検討する。肝細胞株 (HepG2、PLC/PRF/5) の増殖における HSC 関与の検討：肝細胞株 (HepG2、PLC/PRF/5) と primary cultured HSC との共培養を行う。まず HSC を単一培養し、液性因子を産生させ、これを肝細胞株に与える。共培養後 24 時間での肝細胞株の DNA 合成能を見るために [3 H] thymidine assay を行う。さらに、蛋白を抽出し細胞増殖マーカーとして PCNA や p42/44 MAPK 並びに β actin の western blotting を行う。また、細胞形態の変化についても位相差顕微鏡等で検討する。尚、control としては共培養をしない群の他に、normal skin fibroblast との共培養の群を置く事とする。肝細胞株 (HepG2、PLC/PRF/5) の増殖における肝線維化状態の検討：肝細胞株 (HepG2、PLC/PRF/5) をコラーゲンコーティングプレートで培養し、24 時間後に [3 H] thymidine assay を行なう。さらに、蛋白を抽出し細胞増殖マーカーとして PCNA や p42/44 MAPK 並びに β actin の western blotting を行う。また、細胞形態の変化についても位相差顕微鏡等で検討する。これにより肝細胞の増殖と周囲のコラーゲン存在の影響を解析する。線維化を生じない肝癌発症 model における VA-Lip-siRNA の影響解析の為、以下の方法で検討する。本検討の対照 control として線維化を生じない肝癌発症 model である鉄過剰投与 HCV transgenic mice model (Gastroenterology 2006, 130, 2087-2098) を用意し、上記 CDDA model の実験で得られた至適投与量に相当する VA-Lip-siRNA を投与する。腫瘍径の変化を経時的に観察し、抗腫瘍効果を検討する。さらに周囲の HSC の評価を SMA 染色で同定し、形態並びに apoptosis の有無を確認する。

4. 研究成果

(1) 5 週齢の Fisher 344 rats を用意し、CDDA 食を持続して摂取させ、NASH→HCC 発症 model を確立した。さらにこの系のラットに対して、VA-Lip-siRNA を投与することで線維化および肝発癌を改善することが出来るかを確認した。週 1 回から 5 回程度の間隔での投与を検討した。上記治療後の 52 週時点での肝臓を組織学的に評価した。腺腫の割合および肝細胞癌の発生率、腫瘍伸展速度はいずれも PBS 投与の control 群と比較し治療群での低下を認めた。また、評価項目としてビリルビン、albumin、ALT,AST、ヒアルロン酸、 $INF\ \alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL12$ 、TNF、補体、血算、について検討したが、治療に伴う副作用は認めなかった。

(2) CDDA 肝癌発症ラットに対して PBS 投与群、siRNA HSP47 投与群、正常ラットから肝組織を採取した。これらから RNA を抽出

し DNA microarray (Affymetrix GeneChip) を用い発現の変動している遺伝子を検索した。5x10⁶ 個の肝癌細胞株 (HepG2、PLC/PRF/5) と HSC を SCID マウスに接種し、担癌マウスを作製した。コントロールとして肝癌細胞株と normal fibroblast および肝癌細胞株のみを接種した群を作製した。両群間での腫瘍の増殖率を比較検討したところ差を認めなかった。さらに VA-Lip-siRNA HSP47、VA-Lip-siRNA random、PBS をそれぞれ経静脈投与し、腫瘍径の変化を経時的に観察し、抗腫瘍効果を検討した。これらの検討により VA-Lip-siRNA HSP47 群の抗腫瘍効果が示された。つぎに肝細胞株 (HepG2、PLC/PRF/5) と primary cultured HSC との共培養を行い、24 時間での肝癌細胞株の DNA 合成能を見るために [³H] thymidine assay を行ったところ合成能増加を認めた。肝細胞株 (HepG2、PLC/PRF/5) をコラーゲンコーティングプレートで培養し、24 時間後に [³H] thymidine assay を行なったところ同様の結果が得られた。さらに、蛋白を抽出し細胞増殖マーカーとして PCNA や p42/44 MAPK 並びに β actin の western blotting を行い、これらの発現上昇を認めた。本検討の対照 control として線維化を生じない肝癌発症 model である鉄過剰投与 HCV transgenic mice model を用意し、VA-Lip-siRNA を投与したが、腫瘍増殖の抑制は確認されなかった。

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 6 件)

- ① Murase K, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Two cases of myelodysplastic syndrome associated with pyoderma gangrenosum. Rinsho zasshi Naika. In press. 2011. 査読有
- ② Hirakawa M, Sato Y, Ohnuma H, Sagawa T, Ishiwatari H, Murase K, Iyama S, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Kobune M, Takimoto R, Kato J. Tuberculous pleuritis with onset of refractory pleural effusion after chemoradiotherapy for esophageal cancer. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi ;108(2):231-7. 2011 査読有
- ③ Murase K, Iyama S, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Therapeutic results in patients with biphenotypic acute leukemia at Sapporo Medical University Hospital. Gan To Kagaku Ryoho ;37(10):2011-3. 2010 査読有
- ④ Sato Y, Ono M, Sagawa T, Takimoto R, Hirakawa M, Ohnuma H, Sato T, Iyama S, Murase K, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. Endoscopic findings of enteropathy-type

T-cell lymphoma by double-balloon enteroscopy and capsule endoscopy. Dig Endosc ; 22(3):243-5. 2010 査読有

- ⑤ Iyama S, Murase K, Sato T, Kikuchi S, Sato Y, Kobune M, Takimoto R, Kato J. Evaluation of the efficacy of liposomal amphotericin B. Kansenshogaku Zasshi ; 84(2):182-6. 2010 査読有
- ⑥ Kobune M, Takimoto R, Murase K, Iyama S, Sato T, Kikuchi S, Kawano Y, Miyanishi K, Sato Y, Niitsu Y, Kato J. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. Cancer Sci ;100(5):948-55. 2009 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村瀬 和幸 (Murase Kazuyuki)

札幌医科大学医学部・助教

研究者番号：90444918