

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 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590715

研究課題名（和文） 肝細胞癌の発生・進展の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） The molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma

研究代表者

金井 文彦 (KANAI FUMIHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：70334399

研究成果の概要（和文）：高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた肝細胞癌の遺伝子量的異常の網羅的解析よりわれわれは Hedgehog、Hippo シグナルの異常が肝細胞癌の発生・進展に深く関与している可能性を見出し、それぞれのシグナルの構成因子の肝細胞癌における発現や機能解析を行ったところ、Hedgehog シグナルでは Hedgehog interacting protein と Suppressor of fused が、Hippo シグナルでは Sarvador homolog 1 が肝発癌、進展に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the alteration of Hedgehog and Hippo signal in hepatocellular carcinoma based on the results which was already detected by comprehensive analysis of genomic alteration using SNP array. We detected Hedgehog interacting protein, Suppressor of fused, and Sarvador homolog 1 was involved in the hepatocarcinogenesis and progression of hepatocellular carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は発症すると難治性の経過をたどり予後不良である。治療成績向上のための研究と発症予防に対する対策が急務である。肝細胞癌は、特にアジアやアフリカで発生頻度が高く、日本でも罹患率及び死亡率の高い癌である。本邦における肝癌の年間死亡者数は約3万4千人で、肺、胃、大腸に次ぎ第4位であるが、そのほとんど

が肝細胞癌である。本邦の肝細胞癌は、約80%がC型肝炎ウイルス、約10%がB型肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝炎・肝硬変を母地として発生する。治療法は、手術、肝動脈塞栓療法、経皮的ラジオ波療法、化学療法、放射線療法、肝移植があり、さらに本年5月には肝細胞癌に対しては初めての分子標的薬となる multi kinase inhibitor であるソラフェニブが認

可された。このように治療法は多岐にわたるが、他の癌と比較して予後は不良である。これは、肝細胞癌が多中心性発生や肝内転移により極めて高い確率で再発することや、再発病変に治療を繰り返すうちに肝不全が進行することにある。C型肝炎ではウイルスの持続感染による慢性肝炎から長い年月をかけて肝硬変へ進行し、肝細胞癌が発生する場合が多く、繊維化の程度によって発癌率が増えてくる階段状モデルをたどる。一方、B型肝炎では時に肝硬変をスキップして発癌し、罹患期間や繊維化の程度からは発癌率は推定しにくい。B型肝炎ウイルス遺伝子は染色体に組み込まれ、また X 遺伝子産物は肝細胞の増殖を促進することが報告されているが、これらのウイルスによる発癌メカニズムには不明の点も多い。再発様式も複雑である。我々の解析では、肝硬変(F4)からの年発癌率が約7%であるのに対し、初発肝癌に対してラジオ波焼灼療法 (RFA) を施行した患者集団のその後 1 年間の再発率は約 20%、2 年間の再発率は約 40%である。初発癌を根治しても次の癌ができる確率が著しく高まり、多発傾向を示すことは、多中心性の *de novo* 発癌のみでは説明しえず、肝内転移がかなりの頻度で起こっていると考えられる。肝細胞癌は、一般に他の癌種に比べ増殖は遅く、転移は肝臓内におこることが多い。しかし、治療を繰り返すうち、10%程度の症例ではリンパ節・肺・骨・副腎・腹膜・脳などの遠隔転移、門脈腫瘍血栓の出現、癌の急速な増大などの悪性転換を引き起こす。しかし、これらの悪性転換にどのような分子が関わっているか依然不明の点が多い。これは、肝細胞癌が長らくアジアの特殊な病気であるという認識から、大腸癌の基礎研究などに比較し世界的な観点からも研究が遅れていることも一因である。肝細胞癌に関しては、本邦の臨床研究水準はきわめて高く、高感染地域であるアジアで日本が世界の先頭に立ち、肝細胞癌の予後改善を目指して研究を進めてゆかねばならない立場にある。我々は、高密度マイクロアレイを用いた網羅的ゲノム解析によって、肝細胞癌 17 株におい

て高頻度に増幅している染色体領域 10 か所を同定した。これら高度増幅領域に含まれる遺伝子群について 70 の臨床検体を用いた解析から、肝細胞癌の早期再発に関わる候補分子として GRHL2 を、また腫瘍径・病理組織学的悪性度に関連する因子として TAX1BP1 および CCND1 を見出した。また、Hedgehog シグナルの受容体である patched 2 (PTCH2) が肝細胞癌で高度増幅していることも合わせて見出した。(*J. Hepatol.* 2008, 基盤研究 (C) 、平成 18 ~20 年度、高密度マイクロアレイを用いた包括的ゲノム解析による肝細胞癌の発生・再発の解明、研究代表者・金井文彦)。CCND1 は様々な癌で増幅が報告されているが、GRHL2 および TAX1BP1 については肝発癌との関連に関する報告はなく、分子の機能そのものもほとんどわかっていない。また、Hedgehog シグナルに関しては、PTCH2 などのシグナル活性化因子の肝発癌、進展への関与はほとんど明らかとなっていない。

2. 研究の目的

我々は、高密度マイクロアレイを用いた網羅的ゲノム解析によって、肝細胞癌において高頻度に増幅している染色体領域より肝細胞癌の早期再発に関わる候補分子として Grainyhead-like 2 (GRHL2) を、また腫瘍径・病理組織学的悪性度に関連する因子として Tax1-binding protein 1 (TAX1BP1) および Cyclin D1 (CCND1) を見出した。また Hedgehog シグナル因子 patched 2 (PTCH2) が高度増幅していることも同時に明らかにした (*J. Hepatol.* 2008, 基盤研究 (C) 、平成 18 ~20 年度、高密度マイクロアレイを用いた包括的ゲノム解析による肝細胞癌の発生・再発の解明、研究代表者・金井文彦)。本研究では、これらの分子が肝細胞癌の発生・再発・進展にどのように関わるかを基礎・臨床の両面から明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 肝細胞癌手術検体での癌部・非癌部でのこれらシグナル構成因子の mRNA の発現を real-time PCR 法で検討した。
- (2) (1) で異常がみられた因子について肝細

胞癌手術検体での癌部・非癌部での DNA 変異解析や DNA メチル化解析を直接シークエンス法や Methylation specific PCR (MSP) 法などで検討した。

(3) (1) で異常がみられた因子について、発現ベクターあるいはノックダウンベクターを肝細胞癌細胞株にトランスフェクションし、レポーターアッセイ、MTS アッセイ、シグナル下流因子の発現解析などを行った。

4. 研究成果

(1) 平成 22 年度

これまでの研究で高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた肝細胞癌の遺伝子量的異常の網羅的解析よりわれわれはHedgehogシグナルの異常が肝細胞癌の発生・進展に深く関与している可能性を見出していたため、そのシグナル構成因子につき検討を行うこととした。まず、シグナル構成因子の肝細胞癌細胞株での発現をQuantitative real-time RT-PCRとWestern blottingで検討したところLigandであるSonic hedgehog, 受容体であるSmoothend、Patched、転写因子であるGlioma-associated oncogene homolog 1はすべて発現している一方、シグナルを負に制御する受容体Hedgehog interacting proteinの発現低下がみられた。HHIPの発現低下のメカニズムを探索するため、Sodium bisulfite sequencingおよびmethylation-specific PCR (MSP) によるDNAメチル化解析を行った。その結果、HHIP mRNAの発現低下がみられた細胞の一部ではDNAメチル化がみられており、それらの細胞株は脱メチル化剤処理することでmRNA発現回復がみられたことから、mRNA発現低下の機序の一つとしてDNAメチル化が考えられた。また、HHIP DNAメチル化はないがmRNA発現低下がみられた細胞株は、これまでの高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた検討でHHIPのLoss of heterozygosityがあることがわかっている。従って、肝細胞癌ではHedgehogシグナルの負の構成因子HHIPのgenomicあるいはepigenomicな異常により遺伝子不活化がおこり、Hedgehogシグナルの異常活性化がおこり肝発癌・進展に関与することが明らかとなった。

(2) 平成23年度

これまでの研究で高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた肝細胞癌の遺伝子量的異常の網羅的解析より、われわれはHippoシグナルの異常が肝細胞癌の発生・進展に深く関与している可能性を見出していたため、そのシグナル構成因子につき検討を行うこととした。Hippo pathwayは近年注目されているシグナル経路であり、その機能不全により細胞増殖を促進し、細胞死を抑制し、細胞数の増加を

招き、器官サイズが増大する。すなわち癌抑制シグナル伝達系と考えられている。今回の検討ではHippoシグナル構成因子の一つ、Salvador homolog 1 (SAV1) 遺伝子に着目した。SAV1が含まれる14qのLoss of heterozygosity (LOH) を13種類中6種類の肝癌細胞株で認めた。さらに、うち1つの細胞株ではホモ欠失となっていた。ホモ欠失を呈している細胞株以外の12種類の細胞株のDNAを用いて遺伝子変異解析を行ったところ、1種類の細胞株でnonsense 変異を認めた。さらに、患者同意を得て採取した肝細胞癌手術検体36例の癌部DNAを用いて遺伝子変異解析を行ったところ、2例でmissense 変異を認めた。レポーターアッセイを用いた検討では、これらの遺伝子異常があるとSAV1遺伝子の活性が低下することが明らかとなった。以上の検討からHippoシグナルの機能不全が肝発癌、進展に寄与する可能性が示唆された。

(3) 平成 24 年度

これまでの研究で高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた肝細胞癌の遺伝子量的異常の網羅的解析よりわれわれはHedgehogシグナルの異常が肝細胞癌の発生・進展に深く関与している可能性を見出しており、さらに、シグナルを負に制御する受容体Hedgehog interacting protein (HHIP) が、肝細胞癌において、DNAメチル化とLoss of Heterozygosity (LOH) という、epigenetic・geneticな制御により発現低下をきたし、そのことが肝発癌・進展に関与することを明らかにしていたため、さらにHedgehogシグナルの解析を進めることとした。そこで、シグナル構成因子であるSuppressor of fused (Sufu) に着目し検討を行った。7種類の肝細胞癌細胞株での発現を検討したところ、Hep3BおよびSk-Hep-1の2種類において蛋白発現の低下がみられていたが、sodium-bisulfite sequencingを施行したところDNAメチル化はみられなかった。肝細胞癌切除36例での検討では、16/36で非癌部に比べて癌部でのSufuのmRNA発現低下がみられた。その機序の解明のためDNAメチル化とLOH解析を施行したところ、癌部でのDNAメチル化は0/36、LOH陽性は13/36であった。Sufuの機能解析のため、Sufuの発現プラスミドを作成し、蛋白発現が低下していたHep3BとSk-Hep-1細胞にSufuを遺伝子導入し以下解析したところ、Hedgehog シグナル活性化の指標であるGliレポーター活性が約50%、細胞増殖活性が約30%、シグナル下流標的因子の発現が約30-40%、それぞれコントロール群に比べ低下していた。以上から、Sufuはgeneticな発現制御をうけることで、肝

発癌、進展に寄与することが明らかとなった。
。

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 1 件)

Kanai F (23 人中 21 番目), Tada M (23 人中 11 番目), et al. Altered Composition of Fatty Acids Exacerbates Hepatotumorigenesis during Activation of the Phosphatidylinositol 3-kinase Pathway. J Hepatol. 2011; 55; 1400-1408:査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 浅岡 良成, 金井 文彦, 多田素久, 他。肝細胞癌におけるHippoシグナルの異常に関する検討。第 47 回日本肝臓学会総会 2011 年 6 月 3 日 ホテルグランパシフィック LE DAIBA

② 多田 素久 他。肝発癌、進展におけるHedgehog signalの関与と新規治療の探索。第 18 回日本消化器病関連学会週間。2010 年 10 月 15 日 パシフィコ横浜会議センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 文彦 (KANAI FUMIHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：70334399

(2) 研究分担者

多田 素久 (TADA MOTOHISA)
千葉大学医学部附属病院・助教
研究者番号：00554239

(3) 連携研究者

()

研究者番号：