

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590973

研究課題名(和文) 肝癌治療を目指した肝先天免疫制御の分子機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of liver innate immunity in human hepatocellular carcinoma

研究代表者

巽 智秀 (Tatsumi, Tomohide)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20397699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)感染肝細胞癌における、肝癌細胞の細胞死のメカニズム解析を行った。HCV感染肝細胞は、エピルビシンやソラフェニブに治療抵抗性を示し、その機序として感染肝細胞のアポトーシスの抑制、薬剤排出トランスポーターの発現上昇を認めた。またHCV感染により、肝癌細胞の肝癌幹細胞化が示唆された。HCV感染細胞ではG0/G1で細胞周期の静止を認め、このことも抗癌剤抵抗性の一因と考えられた。IFN- $\alpha$ によるHCV排除により、上記の抗癌剤抵抗性の機序は改善された。以上より肝細胞癌治療時にHCV排除を行うことで肝細胞癌の治療効果の増強が期待できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the cell death of hepatitis C virus (HCV) infected hepatocellular carcinoma (HCC) cells. HCV-infected HCC cells were more resistant to epirubicin and sorafenib than non-infected HCC cells. HCV-infected HCC cells exhibited anti-apoptotic and higher expression of ATP-binding cassette drug transporters. HCV infection resulted in increasing the characteristics of cancer stem cell of HCC. Cell cycle analysis revealed the increase of sub-population of G0/G1 phase in HCV-infected HCC cells. HCV eradication by interferon-alpha treatment resulted in improvement of the efficacy of anti-cancer drug by changing the anti-apoptotic characteristics. These results suggested that eradication of HCV should be required in the treatment of HCC.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 C型肝炎ウイルス 抗癌剤 先天免疫 細胞周期

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における肝細胞癌(HCC)による死亡は年間約3万5千人程度であり、今後もこの状況が続くと考えられている。HCCに対して肝切除術、肝動脈塞栓術、ラジオ波治療、動注化学療法などの治療法が集学的に行われ、HCC患者の予後は改善してきている。最近では分子標的治療薬のソラフェニブが承認され、HCCに対する治療法の選択肢が広がっている。しかしながら既存の治療法の適応外の患者も依然多く存在している。新たなHCC治療の治療戦略が必要である。これまで申請者らは、NK細胞活性化分子であるMICAの発現制御による新規治療の可能性を示してきた。近年の免疫学、分子生物学の進歩により、肝癌細胞の特異的形質が解明されている。HCCにおいても他の多くの癌と同様に、癌幹細胞の存在が示唆されており、これを標的とする治療法の確立が望まれる。また低酸素培養下における癌細胞の形質変換について注目されているが、HCCについては明らかになっていない。本邦のHCCの最大の原因は、C型肝炎ウイルス(HCV)によるものである。HCVは、慢性肝炎、肝硬変からHCCを引き起こすが、HCC治療後に肝内転移や局所再発がおこることが、HCCの予後規定因子である。HCC組織中には少数ながらHCVの存在を指摘されている。In vitroの検討では、HCVレプリコン細胞において肝癌の癌幹細胞機能が亢進するという報告があり、HCVの存在がHCCの進展や治療抵抗性にも関与する可能性が示唆されている。以上の様に、HCCの進展には、免疫、低酸素、HCVをはじめとしたウイルス感染など多くの因子の関与が示唆されている。これら因子のHCC進展への関与の機構の解明し、これら因子の制御による新規治療法の確立が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、HCCに対する新たな治療方法の確立を目指して、以下の目的を検討した。  
 (1)低酸素下における肝癌細胞のMICA制御。  
 (2)HCV感染肝癌細胞の肝癌幹細胞化と抗癌剤抵抗性の分子機構の解析。

### 3. 研究の方法

(1)肝癌細胞株 Huh7 細胞の培養液に塩化コバルトを添加する、あるいは1%O<sub>2</sub>下で Huh7 細胞を培養し、Cell viability を WST-8 法にて評価しさらに、細胞膜上の分子の MICA 発現をフローサイトメトリーで評価した。また Huh 7.5 細胞に HCV-RNA を electroporation にて導入し、HCV 感染細胞を作製し HCV 感染 Huh7 細胞も低酸素下で培養し、同様の検討を行った。

(2)上記と同様に、Huh 7.5 細胞に HCV-RNA を electroporation にて導入し、HCV 感染細胞を作製した。HCV 感染細胞と非感染細胞に対して各種抗癌剤を添加し、Cell viability を評価した。またこれらの細胞において抗癌剤

によるアポトーシスの誘導をウエスタンブロット法にて、抗がん剤の薬剤排出トランスポーターの発現量をリアルタイム RT-PCR にて評価した。細胞周期解析および肝癌幹細胞の検出のための Side population 分画の解析、肝癌幹細胞マーカーの発現についてはフローサイトメトリーにて検討した。

### 4. 研究成果

(1)肝癌細胞株 Huh7 細胞の培養液に塩化コバルトを添加する、あるいは1%O<sub>2</sub>下で Huh7 細胞を培養し、Cell viability を WST-8 法にて評価したところ、いずれの方法でも優位に cell viability が低下した。また細胞膜上の MICA 分子の発現を検討したが、いずれの培養下でも変化がなかった。血管新生因子を多く発現し、多血性の癌である HCC は、低酸素に対して非常に弱いことが示された。しかしながら、MICA 他 NK 細胞感受性関連分子の発現はいずれも変化がなかった。以上より低酸素では、NK 細胞に対する感受性の変化がなく、動脈塞栓術等の治療において、免疫学的治療の上乗せ効果は期待しにくいことが示唆された。HCV 感染細胞を作製し HCV 感染 Huh7 細胞も低酸素下で培養し、同様の検討を行ったが、HCV 感染肝癌細胞でも同様の結果であった(図1)。

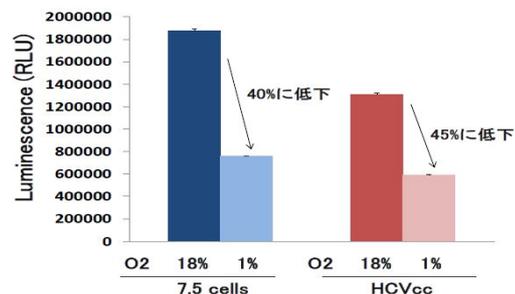


図1. HCVccに対するhypoxiaの影響(1% O2)

(2)HCV 感染細胞と非感染細胞に抗癌剤であるエピルピシンやソラフェニブを添加し、Cell viability を評価した。抗癌剤添加により、HCV 感染細胞は非感染細胞よりも有意に Cell viability が高く、HCV 感染細胞はこれら抗癌剤に抵抗性であった。HCV 感染細胞では非感染細胞に比して、エピルピシン添加後では、アポトーシスのマーカーである cleaved-caspase3/7 及び cleaved-PARP の発現誘導が弱く、逆に ERK や Akt など抗アポトーシス経路の蛋白発現は有意に高かったことから、HCV 感染細胞では抗癌剤によるアポトーシスの誘導が抑制されていた。また HCV 感染細胞は非感染細胞に比して薬剤排出トランスポーターである ABCB1、ABCG2 の発現が、mRNA レベルが有意に高かった。抗癌剤抵抗性は癌幹細胞の特性の一つであるが、肝癌幹細胞の存在を side population 分画で評価したところ、HCV 感染細胞では非感染細胞に比して side population 分画の有意な増加を

認めた。また肝癌幹細胞マーカーである CD133 や CD13 の発現は、HCV 感染細胞では非感染細胞に比して有意に高発現していたことより(図 2)、HCV 感染により肝癌幹細胞の誘導が示唆された。

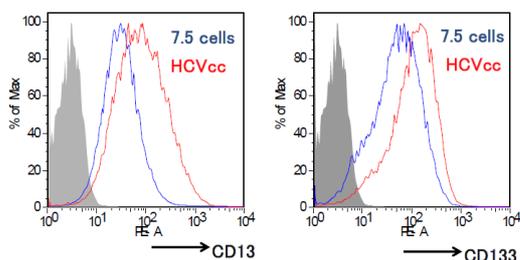


図2. HCV感染細胞における肝癌幹細胞マーカーの発現

さらに HCV 感染肝癌細胞及び非感染肝癌細胞の細胞周期を検討した。HCV 肝癌細胞では G0/G1 phase での細胞周期静止が示唆され、HCV 感染肝癌細胞では、リン酸化 Rb タンパクやサイクリン A の発現の低下を認めた。

一方インターフェロンを用いて、HCV 治療細胞を作成し、上記の現象を検討した。HCV 治療細胞では、Cleaved-PARP の発現上昇を認め、アポトーシス抵抗性が改善された。また細胞周期は、HCV 感染肝癌細胞に比して HCV 治療細胞では、G0/G1 phase の細胞が減少する一方 G2/M phase の細胞が増加した。また抗癌剤抵抗性は、HCV 治療細胞では有意に改善した。肝癌幹細胞マーカーである CD133 あるいは CD13 の発現は、HCV 治療細胞では有意に減少していた。以上より、インターフェロン治療により HCV 感染を排除すると、抗癌剤抵抗性が改善され、より根治が期待できることが明らかとなった。

肝癌細胞は HCV の存在によりアポトーシスシグナルや薬剤排出トランスポーターを制御することで生物学的悪性度が増悪し、結果的に HCC の抗癌剤抵抗性を増大していることが示唆された。HCC 治療後の HCV 制御がその後の再発を含めた予後の改善に重要であると考えられた。

## 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 4 件)

Oze T, Miyagi T(15 番目), Tatsumi T(17 番目), et

al. The prospective randomized study on telaprevir at 1500 mg or 2250 mg with pegylated interferon plus ribavirin in Japanese patients with HCV genotype 1. J Gastroenterol、査読有、50、2015、313-322

DOI: 10.1007/s00535-014-0965-8.

Oze T, Miyagi T(22 番目), Tatsumi T(24

番目), et al. Significance of liver stiffness measurement by acoustic radiation force impulse (ARFI) among hepatitis C patients. Clin Gastroenterol Hepatol、査読有、12、2014、1186-1195

DOI: 10.1016/j.cgh.2013.11.033.

Harada N, Miyagi T(8 番目), Tatsumi T(9 番目), et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels categorized by Japanese treatment guidelines. J Gastroenterol、査読有、48、2013、535-543

DOI: 10.1007/s00535-012-0657-1.

Ishida H, Tatsumi T(4 番目), et al. Valine, the branched-chain amino acid, suppresses hepatitis C virus RNA replication but promotes infectious particle formation. Biochem Biophys Res Commun、査読有、437、2013、127-133

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.06.051.

〔学会発表〕(計 15 件)

小瀬嗣子、宮城琢也、巽 智秀(他 9 名)

Genotype1 C 型慢性肝炎に対する

Simeprevir/Peg-IFN/RBV 併用治療の有用性について 2014 年 5 月 29 日 第 50 回肝臓学会 東京都

森下直紀、宮城琢也、巽 智秀(他 11 名)

C 型肝炎に対するシメプレビル治療における次世代シーケンサーを用いた耐性変異の検討 2014 年 5 月 30 日 第 50 回肝臓学会総会 東京都

原田直毅、宮城琢也、巽 智秀(他 16 名)

C 型慢性肝疾患に対する Simeprevir/PegIFN/Ribavirin 併用療法におけるビリルビン上昇と ITPA 遺伝子多型について 2014 年 10 月 24 日 第 18 回肝臓学会大会 兵庫県神戸市

森下直紀、宮城琢也、巽 智秀(他 16 名)

C 型肝炎に対するテラプレビル 3 剤併用療法非著効例におけるシメプレビル 3 剤併用療法の有効性と耐性変異について 2014 年 10 月 24 日 第 18 回肝臓学会大会 兵庫県神戸市

Nawa T, Tatsumi T, Miyagi T, (他 8 名)

Involvement of hepatitis C virus infection in the regulation of chemo-sensitivity of hepatocellular carcinoma cells. 2014 年 11 月 11 日 第 65 回米国肝臓学会 米国ボストン

疋田隼人、宮城琢也、巽 智秀(他 6 名)

肝細胞アポトーシスが発生する酸化スト

レスの肝発癌に与える影響 2013年6月6日 第49回肝臓学会総会 東京都  
明田寛史、巽 智秀、宮城琢也(他6名)  
肝腫瘍に対する -Galactosylceramide  
と 5-Fluorouracil 併用による免疫化学  
療法の有用性 2013年6月6日 第49  
回肝臓学会総会 東京都  
名和誉敏、巽 智秀、(他1名) C型肝炎  
ウイルスは肝細胞癌の抗癌剤抵抗性を増  
強する 2013年10月10日 第17回肝  
臓学会大会) 東京都  
Nawa T, Tatsumi T, Miyagi T, (他9名)  
Hepatitis C virus infection reduces  
chemo-sensitivity of the  
hepatocellular carcinoma cells  
through enhancing cancer stem cell  
characters. 2013年11月5日 第64  
回米国肝臓学会 米国ワシントン DC  
Hikita H, Tatsumi T, Miyagi T, (他7  
名) Oxidative stress induced by  
continuous hepatocyte apoptosis  
drives liver carcinogenesis  
independently of regeneration and DNA  
methylation status. 2013年11月5  
日 第64回米国肝臓学会 米国ワシ  
ントン DC  
巽 智秀、(他2名) NKG2D リガンド制御  
による肝癌免疫化学療法の可能性 2012  
年6月8日 第48回肝臓学会総会 石川  
県金沢市  
小玉尚弘、巽 智秀、(他1名) 肝細胞  
p53 による肝線維化誘導機構の解析  
2012年6月8日 第48回肝臓学会総会  
石川県金沢市  
疋田隼人、巽 智秀、(他1名) 肝細胞障  
害が誘導する酸化ストレスと肝発癌  
2012年10月10日 大16回肝臓学会大  
会 兵庫県神戸市  
Aono S, Tatsumi T, Miyagi T, (他10名)  
NK cells might deplete liver  
myeloid-derived suppressor cells via  
targeting NK activating molecules in  
metastatic liver tumor-bearing mice.  
2012年11月13日 第63回米国肝臓学  
会 米国ボストン  
Nishio K, Miyagi T, Tatsumi T, (他8  
名) Interleukin-17 producing T  
cell is responsible for iNKT cell  
deficiency-induced liver inflammation.  
2012年11月13日 第63回米国肝臓学  
会 米国ボストン

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巽 智秀 (TATSUMI, Tomohide)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20397699

(2) 研究分担者

宮城 琢也 (MIYAGI, Takuya)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80532986

(3) 連携研究者

なし( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

名和 誉敏 (NAWA, Takatoshi)  
青野 悟志 (AONO, Satoshi)