

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592008

研究課題名(和文)肝細胞癌における血中癌幹細胞の同定と標的治療の開発

研究課題名(英文)Characterization of circulating tumor cells and its application of the treatment selection for hepatocellular carcinoma

研究代表者

別府 透 (beppu, toru)

熊本大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：70301372

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)：CD44は間葉系の性質と相関し、TGF- β signalの下流に存在すること、CD44+細胞のsphere形成能が非常に高いこと、CD44陽性ヒト肝細胞癌症例は予後不良であることを明らかにした(Mima K, Beppu T. Cancer Res 2012)。ヒト肝細胞癌におけるCD44、Vimentin、Twist1の発現のco-localizationを確認した。血中のCD45-CD44+CD90+肝細胞癌細胞において、CD44が肝細胞癌のEMT markerとして有用であることを確認した(Okabe H, Beppu T. Br J Cancer 2014)。

研究成果の概要(英文)：As the characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC), CD44 is correlated with mesenchymal characteristics of HCC and is present downstream of TGF- β signals. After hepatic resection, CD44-positive HCC patients showed poor prognosis (Mima K, Beppu T, et al. Cancer Res 2012). Furthermore we demonstrated that sphere forming ability was very high in CD44+ cells compared to CD44- cells. These characteristics are regulated by Twist1 controlling the mesenchymal characteristics and we confirmed the co-localization of the expression of CD44, Vimentin, Twist1 in human HCC primary tumors (Okabe H, Beppu T, et al. Br J Cancer 2014). As compared with the CD45-CD44 + CD90 + HCC cells in the tissue, the expression of the CD44, and Vimentin in the CD45-CD44 + CD90 + HCC cells in the blood rose markedly, and expression of E-cadherin was dramatically declined. Finally it was confirmed that CD44 is useful as EMT marker for HCC (Okabe H, Beppu T, et al. Br J Cancer 2014).

研究分野：消化器外科学

キーワード：血中癌細胞 上皮間葉形質転換 (EMT) 肝細胞癌 CD44 Anoikis CD45-CD44+CD90+細胞 血中癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

1869年に血中癌細胞の存在が初めて報告されて以来、technologyの進歩とevidenceの積み重ねにより、その検出手法は血中mRNAの解析とCellSearch System等の抗体を用いた検出が主流となっている。治療への応用を含めた血中癌細胞(circulating tumor cell, CTC)の機能解析という点では、癌細胞を捕捉する抗体を用いた検出手法が期待されている。乳癌や前立腺癌においてCellSearch Systemによる血中癌細胞検出の有用性は予後予測因子・治療効果予測因子として確立しているが、肝細胞癌においては上皮系のマーカーEpcAMの発現率が低いこともありCellSearch Systemを用いた血中癌細胞検出の有用性は報告されていない。

2. 研究の目的

CTCの機能解析と治療への応用が現在注目されている。近年のトランスクリプトーム解析から肝細胞癌のサブクラス分類が明らかになりつつあり、分子標的治療の効果予測を行う上で進展が期待される。今回、肝細胞癌患者の血中癌細胞および切除組織からの癌細胞を分離し、RNA・DNAを抽出しGenetic profilingを行うことで、固形癌と血中癌細胞のcharacterの比較、抗癌剤および分子標的治療効果予測因子としての有用性などの臨床応用の可能性を追求する。

3. 研究の方法

肝細胞癌において、血中癌細胞のmutation statusおよびシグナル解析を基盤として、患者血液から癌の分子生物学的な情報を採取し、治療選択や抗癌剤・分子標的治療薬の効果予測などの臨床応用のツールとする。すなわち、末梢血から末梢血単核球(PBMC)を分離し、肝細胞において報告される癌幹細胞マーカーを用いてFACS(BD ArialII)により癌細胞を分離する。RNA・DNAを抽出し既知の肝細胞癌の進展に深く関与する代表的Mutation(TP53, CTNNB1, AXIN1, TCF1等)の解析、mRNA発現解析を行う。蛋白発現解析に関しては、細胞をセルブロックにてパラフィン固定し、シグナル解析を行う。同時に、特性を比較する対象として切除によって得られた肝組織からも癌細胞を分離し、同様の解析を行う。

4. 研究成果

肝細胞癌の特性として、CD44が肝細胞癌の間葉系の性質と相関し、TGF signalの下流に存在すること、ヒト肝細胞癌症例においてCD44陽性腫瘍は予後不良であることを明らかにし、報告した。さらにCD44+細胞がCD44-細胞と比較してsphere形成能が非常に高いことを見いだした。これらの特性は間葉系の特性を制御するTwist1によって制御されており、

ヒト肝細胞癌原発腫瘍におけるCD44、Vimentin、Twist1の発現のco-localizationを確認した。組織中のCD45-CD44+CD90+肝細胞癌細胞と比較して、血中のCD45-CD44+CD90+肝細胞癌細胞ではCD44およびVimentinの発現は著明に上昇し、E-cadherinの発現は劇的に減少していることから、CD44が肝細胞癌のEMT markerとして有用であることを確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計16件)

- 1) Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, Miyake K, Takamori H, Beppu T, Baba H. The expression levels of CD44v6 are correlated with the invasiveness of hepatocellular carcinoma in vitro, but do not appear to be clinically significant. *Oncol Lett* 3: 1047-1051, 2012. 査読有り
- 2) Masuda T, Beppu T, Mizumoto T, Ishiko T, Chikamoto A, Hayashi H, Okabe H, Otao R, Horlad H, Takamori H, Baba H: Hybrid ablation using percutaneous and endoscopic approach for multi-nodular hepatocellular carcinomas. *Hepato-Gastroenterol* 59(115):836-9, 2012. 査読有り
- 3) Okabe H, Beppu T, Ueda M, Hayashi H, Ishiko T, Masuda T, Otao R, Horlad H, Mima K, Miyake K, Iwatsuki M, Baba Y, Takamori H, Jono H, Shinriki S, Ando Y, Baba H. Identification of CXCL5/ENA-78 as a factor involved in the interaction between cholangiocarcinoma cells and cancer-associated fibroblasts. *Int J Cancer* 2012;131(10):2234-41. 査読有り
- 4) Horino K, Beppu T, Komori H, Masuda T, Hayashi H, Okabe H, Takamori H, Baba H: Evaluation of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma with viral hepatitis. *Hepato-Gastroenterol* 59(116):1217-9, 2012. 査読有り
- 5) Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, Watanabe M, Beppu T, Tamada M, Nagano O, Saya H, Baba H. CD44s regulates the TGF- β -mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2012; 72(13):3414-23. 査読有り
- 6) Kinoshita H, Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Ishimoto T, Miyake K, Yokoyama N, Ishiko T, Baba H.

- Cystine/glutamic acid transporter is a novel marker for predicting poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2013; 29(2):685-9. 査読有り
- 7) Kinoshita H, Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Yokoyama N, Ishiko T, Shinriki S, Jono H, Ando Y, Baba H: CYLD downregulation is correlated with tumor development in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol* 1(2):309-14, 2013. 査読有り
- 8) Mima K, Hayashi H, Imai K, Kuroki H, Nakagawa S, Okabe H, Chikamoto A, Watanabe M, Beppu T, Baba H: High CD44s expression is associated with the EMT expression profile and intrahepatic dissemination of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2013; 20(4): 429-3. 査読有り
- 9) Okabe H, Ishimoto T, Mima K, Nakagawa S, Hayashi H, Kuroki H, Imai K, Nitta H, Saito S, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Nagano O, Beppu T, Saya H, Baba H. CD44s signals the acquisition of the mesenchymal phenotype required for anchorage-independent cell survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2014; 110:958-66. 査読有り
- 10) Beppu T, Emi Y, Tokunaga S, Oki E, Shirabe K, Ueno S, Kuramoto M, Kabashima A, Takahashi I, Samura H, Eguchi S, Akagi Y, Natsugoe S, Ogata Y, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y, Kyushu Study Group Of Clinical Cancer: Liver Resectability of Advanced Liver-limited Colorectal Liver Metastases Following mFOLFOX6 with Bevacizumab (KSCC0802 Study). *Anticancer Res* 34(11):6655-62, 2014. 査読有り
- 11) Okabe H, Delgado E, Lee JM, Yang J, Kinoshita H, Hayashi H, Tsung A, Behari J, Beppu T, Baba H, Monga SP. Role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a biomarker in hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2014 3; 9(6): e98817. 査読有り
- 12) Mima K, Beppu T, Ishiko T, Chikamoto A, Nakagawa S, Hayashi H, Watanabe M, Sakamaki K, Baba H: Preoperative serum hyaluronic acid level as a prognostic factor in patients undergoing hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2014; 101(3):269-76. 査読有り
- 13) Beppu T, Nitta H, Hayashi H, Imai K, Okabe H, Nakagawa S, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Yoshida M, Yamashita Y, Baba H: Branched-chain amino acid supplementation on functional liver regeneration in patients undergoing portal vein embolization and sequential hepatectomy: a randomized control trial. *J Gastroenterol* 2015 Apr 8. [Epub ahead of print] 査読有り
- 14) Harada K, Baba Y, Ishimoto T, Chikamoto A, Kosumi K, Hayashi H, Nitta H, Hashimoto D, Beppu T, Baba H: LINE-1 Methylation Level and Patient Prognosis in a Database of 208 Hepatocellular Carcinomas. *Ann Surg Oncol* 22(4):1280-7, 2015. 査読有り
- 15) Higashi T, Hashimoto D, Hayashi H, Nitta H, Chikamoto A, Beppu T, Baba H: Reactive lymphoid hyperplasia of the liver requires differential diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Surg Case Rep* 1(1):31, 2015. 査読有り
- 16) Beppu T, Hayashi H, Okabe H, Imai K, Nitta H, Masuda T, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Kikuchi K, Baba H: Hybrid-including Endoscopic versus Open Hepatic Resection for Patients with Hepatocellular Carcinoma Meeting the Milan Criteria: A Propensity Case-matched Analysis. *Anticancer Res* 35(3):1583-90, 2015. 査読有り
- 〔学会発表〕(計10件)
- 1) 石本崇胤、**別府 遼**、馬場秀夫、他：消化器癌における癌幹細胞マーカー発現制御機構の解明。第23回日本消化器癌発生学会、2012年11月15日、徳島、ルネッサンスリゾートナルト
- 2) 林 洋光、**別府 遼**、馬場秀夫、他：TGF活性化機構による肝再生抑制機構の解明と新戦略の構築。第113回日本外科学会、2013年4月11日、福岡、福岡サンパレス
- 3) 美馬浩介、**別府 遼**、馬場秀夫、他：肝細胞癌における癌幹細胞マーカーCD44とepithelial mesenchymal transition (EMT)の意義。第113回日本外科学会、2013年4月11日、福岡、福岡サンパレス
- 4) 今井克憲、**別府 遼**、馬場秀夫、他：肝細胞癌に対する局所凝固療法後の治療部位再発に対するサルベージ治療。第68回日本消化器外科学会、2013年7月19日、宮崎、シーガイアコンベンションセンター

- 5) **Beppu T**, Baba H, et al. A novel laparoscopic hepatectomy with Glissonian pre-coagulation and monitoring ischemic area. IHPBA World Congress 2014, 2014年3月25日、韓国、Coex center
- 6) Baba Y, **Beppu T**, Baba H, et al. The relationship between LINE-1 hypomethylation and fibrosis status in noncancerous liver tissues of hepatocellular carcinoma patients. AACR Annual Meeting 2014, 2014年4月6日、San Diego, California
- 7) Hayashi H, **Beppu T**, Baba H, et al. TAZ (WWTR1), a key transcription co-activator of hippo-pathway, promotes hepatocellular carcinoma progression via PI3K/Akt/mTOR pathway. AACR Annual Meeting 2014, 2014年4月6日、San Diego, California
- 8) 馬場祥史、**別府 透**、馬場秀夫：肝細胞癌におけるLINE-1メチル化レベルの網羅的解析。JDDW2014第22回日本消化器関連学会週間(第12回日本消化器外科学会大会)、2014年10月23日、神戸、神戸国際展示場
- 9) **別府 透**、林洋光、馬場秀夫、他：肝細胞癌に対する内視鏡下肝切除の有用性の科学的検証 Propensity Score Matchingを用いて。JDDW2014第22回日本消化器関連学会週間(第12回日本消化器外科学会大会)、2014年10月23日、神戸、神戸国際展示場
- 10) **別府 透**、林 洋光、馬場秀夫：高度脈管侵襲肝細胞癌に対する肝切除と術後補助肝動注療法。第26回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014年6月12日、和歌山、アバローム紀の国

〔図書〕〔産業財産権〕〔その他〕：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

別府 透 (BEPPU, toru)
 熊本大学・医学部附属病院・特任教授
 研究者番号：70301372

(2) 研究分担者

岡部 弘尚 (OKABE, hirohisa)
 熊本大学・医学部附属病院・診療助手
 研究者番号：40573621

安東 由喜雄 (ANDO, yukio)
 熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
 研究者番号：20253742