

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701024

研究課題名(和文) dUTPaseとwntシグナルを標的とした肝細胞癌新規治療薬の開発

研究課題名(英文) development of hepatocellular carcinoma novel therapeutics that target wnt signaling and dUTPase

研究代表者

鷹取 元 (TAKATORI, HAJIME)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：60613734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：dUTPase抑制効果を有する薬剤として、インターフェロンおよびbeta-HIVSを同定した。beta-HIVSの類似化合物を作成し、肝癌細胞増殖抑制効果を確認した。EpCAMとdUTPaseの発現の正の相関をあきらかにした。Wntシグナルを活性化でdUTPaseの強発現を、beta-cateninの発現抑制で、dUTPaseプロモーターの活性の低下を認め、dUTPaseの発現はWntシグナルで調節されている可能性を発見した。dUTPaseとWnt/beta-cateninシグナルおよびEpCAMの相関を明らかとし、dUTPase抑制薬として、beta-HIVS類似化合物を同定・作成した。

研究成果の概要(英文)：Examples of drugs having dUTPase inhibitory effect was identified as a component of the Chinese herb Lithospermum a beta-HIVS. Create a similar compound of HIVS, it was confirmed liver cancer cell growth inhibitory effect. I have revealed a positive correlation of expression of dUTPase and EpCAM. In suppression of the expression of beta-catenin, the observed decrease in activity dUTPase promoter, expression of dUTPase found the possibility of being regulated in Wnt signaling, a strong expression of dUTPase activation of Wnt signaling. The apparent correlation of EpCAM and Wnt / beta-catenin signaling and dUTPase, dUTPase as inhibitors, were identified, create a beta-HIVS similar compounds.

研究分野：臨床腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：dUTPase EpCAM -catenin Wnt HCC

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は全世界で年間約 62 万人が罹患し、ほぼ同数の約 60 万人が死亡する世界第三の癌死亡原因であり、治療として肝移植、外科切除、ラジオ波焼灼療法、経カテーテル的肝動脈塞栓療法、化学療法や放射線療法などが施行されているが、80%以上の患者が肝局所再発や他部位再発、脈管浸潤および他臓器転移を呈し進行肝細胞癌となり死にいたるため、有効な治療法の開発が求められている。固形癌において幹細胞様の特徴を示す癌幹細胞の存在が明らかになり、癌の転移や治療抵抗性のメカニズムに深く関わっていることが示唆されている。我々は肝幹細胞マーカーを用いた肝細胞癌診断システムを開発、肝細胞癌において自己複製能力と非対称性分裂能力を持ち、NOD/SCID マウスで高い腫瘍形成能をもつ癌幹細胞分画の分離精製に成功、Wnt シグナルが自己複製や非対称制分裂の制御を行っていることを同定した。一方、これまで応募者らは SAGE 法による HCC の網羅的遺伝子解析を行い、肝癌組織では核酸代謝酵素 dUTPase をコードする遺伝子である DUT の発現亢進が起こっていることを同定した。dUTPase 発現が強い症例では有意に予後が悪いことを見出した。dUTPase は Wnt シグナル伝達系が亢進している癌幹細胞での発現亢進が見られ、高い門脈浸潤傾向を有すること、5-FU に対する抵抗性を示すこと、DUT の発現抑制により細胞増殖能、抗癌剤抵抗性が抑制されることを見出した。Wnt シグナルの活性化が認められ dUTPase 発現が高い肝細胞癌では、高い門脈浸潤傾向と抗癌剤抵抗性を示すために、肝切除術や動注化学療法といった従来の治療法では十分な治療効果が得られず、このような予後不良の患者に対しては Wnt や dUTPase を標的とする新しい治療法の実用性が求められている。しかしながら、これまでのところ Wnt シグナルや dUTPase を直接阻害し、かつ臨床応用が可能な薬剤は未だ

存在しない。

2. 研究の目的

肝細胞癌は根治的治療後も再発を繰り返して死に至る悪性度の高い癌である。我々は肝細胞癌の難治機序に関わる未分化な細胞形質を示す肝癌幹細胞を同定、Wnt シグナル伝達系と核酸代謝酵素 dUTPase の活性化が生じていることを見出した。一方、Wnt シグナルや dUTPase は有力な分子標的ではあるものの、この経路を直接阻害しかつ *in vivo* で使用可能な薬剤は未だ存在しない。本研究では、Wnt および dUTPase を活性化させた細胞を樹立し、Wnt や dUTPase に対し、正常細胞に影響を与えず癌幹細胞を特異的に標的とする新規治療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではこれまでの知見を踏まえて、金沢大学附属病院で外科切除が行われた肝細胞癌組織を用いて免疫組織化学で EpCAM と dUTPase の染色を行った。また、ヒト胎児肝における EpCAM と dUTPase の発現も組織アレイスライドを用いて同様に評価した。dUTPase が Wnt により発現誘導される細胞株、Huh7 を用いて癌幹細胞の自己複製能や抗癌剤感受性に与える影響を評価した。EpCAM 陽性癌幹細胞とそれ以外の細胞分画はフローサイトメーターを用いて分離し蛍光免疫染色を行った。また、ヒト肝癌外科切除標本から分離した癌幹細胞の免疫不全マウス移植モデルを用いて、Wnt や dUTPase に対し抑制的に働く可能性のある化合物を投与し、癌幹細胞特異的な治療法としての妥当性について検証した。

4. 研究成果

肝細胞癌における dUTPase 発現の臨床的な意味について、肝細胞癌外科切除例において dUTPase 発現を免疫組織学的に評価し、再発・

予後について前向き試験をおこなった。
 dUTPase高発現群16例と低発現群11例のあいだに臨床的背景に差は認めないにも関わらず（図1）、無再発生存率において高発現群は有意に予後が悪かった（図2）。（第42回日本肝臓病学会総会にて発表）

図1 dUTPase発現と症例背景

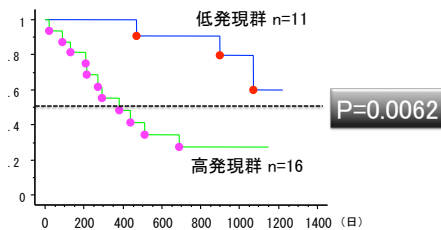
背景

| | 高発現群(16) | 低発現群(11) | P-value |
|-----------------------------------|----------|----------|---------|
| 年齢(60歳未満/以上) | 6 / 10 | 4 / 7 | 0.99 |
| 性別(男/女) | 10 / 6 | 8 / 3 | 0.69 |
| Stage(I, II / III, IV) | 6 / 10 | 7 / 4 | 0.25 |
| 最大径(<30mm / 30mm \leq) | 6 / 10 | 6 / 5 | 0.45 |
| 分化度(wel, mod / por) | 14 / 2 | 11 / 0 | 0.50 |
| 脈管浸潤(あり, なし) | 9 / 7 | 8 / 3 | 0.45 |
| AFP(<400ng/ml / 400ng/ml \leq) | 8 / 8 | 9 / 2 | 0.12 |

χ^2 乗検定

図2 dUTPase発現と無再発生存率

無再発生存率

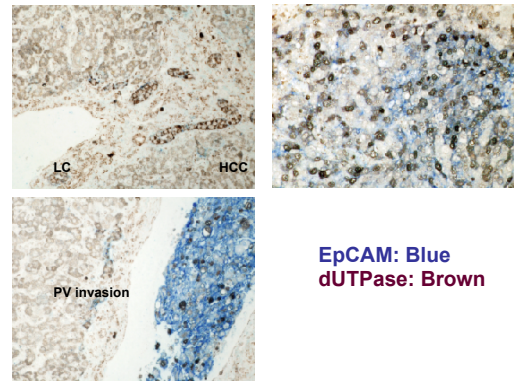


dUTPase抑制効果を有する薬剤としてIFN- α と漢方薬 紫根の成分である β -HIVSを同定した。より副作用が少ないと考えられる β -HIVSの類似化合物を5種類選択した。これらを肝癌培養細胞(Huh7)に添加したところ、MTT assayにていずれも細胞増殖抑制効果が確認された。

次いでdUTPase発現と肝細胞癌幹細胞との関連を107例のヒト肝細胞癌組織で検討した。stem cell markerであるEpCAM陽性の肝癌ではdUTPaseの発現が強く認められ、門脈浸潤部位

で特に強い傾向が認められた。（図3）

図3

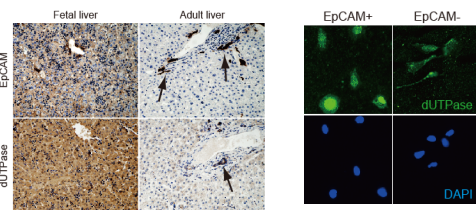


EpCAMの発現とdUTPaseの発現は統計的に有意に正の相関を示した。

さらに、ヒト胎児肝と成人肝組織におけるEpCAMとdUTPaseの発現を検討したところ、胎児肝のhepatoblastではEpCAM陽性かつdUTPaseが強発現しているのに対し、成人肝では胆管細胞でのみdUTPaseおよびEpCAMの発現を認めた。（図4）

図4

dUTPaseはヒト胎児肝組織およびEpCAM陽性がん幹細胞で強発現している



またフローサイトメトリーを用いて、dUTPaseがEpCAM陽性細胞で強く発現していることを確認した。

次に肝癌幹細胞の自己複製および抗癌剤によるDNA損傷応答に働くWntシグナルとdUTPase発現の関連性について検討した。

低分子化合物BIOを用いてGSK3 betaを不活化し、Wntシグナルを活性化させたところ、肝癌培養細胞Huh7でdUTPaseの強発現が認めら

れ、さらに、dUTPaseのプロモーター領域を有するプラスミドを用いて解析したところ、BIO処理によりコントロールに比べ明らかなプロモーター活性の亢進が認められた。一方、si-RNAを用いてbeta-cateninの遺伝子発現を抑制したところ、controlに比べて明らかにdUTPaseプロモーターの活性の低下が見られた。以上の結果より、dUTPaseの発現はWntシグナルで調節されており、少なくともHuh7ではdUTPaseはWntの標的遺伝子であると考えられた。

漢方薬紫根の成分であるβ-HIVSおよびその類似化合物種類で、肝癌培養細胞でのEpCAM陽性細胞の減少を確認した。また、Huh7をNOD/SCIDマウス皮下に移植し、DMSOで溶解したβ-HIVSの腹腔内投与による抗腫瘍効果を検討したが、残念ながら薬剤のデリバリーが悪く、抗腫瘍効果は認められなかった。

以上本研究により、dUTPaseがWnt/β-cateninシグナルの下流に存在する可能性があり、dUTPaseを抑制する可能性があるβ-HIVSが肝癌幹細胞を標的とした治療の候補となることが確認された。一方生体での有効な投与方法については今後の検討が必要であることも明らかになった。

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 2 件)

(1) Ueda T, Takatori H, Kaneko S, Gene expression profiling of hepatitis B and hepatitis C related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Genomics, 査読有り、101(4)、2013、238-248

(2) Yamashita T, Takatori H, Kaneko S, Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatology, 査読有り、57(4)、2013、1484-1497

[学会発表] (計 9 件)

(1) Takatori H, Hayashi T, Kaneko S Comparison of danaparoid sodium monotherapy and combined therapy with antithrombin 3 for portal vein thrombosis accompanying cirrhosis 第64回米国肝臓学会議、2013年11月4日、Walter E Washington convention center (Washington D.C, USA)

(2) 鷹取 元、林 武弘、金子周一 肝癌合併静脈瘤の現状と成績 第19回日本門脈圧亢進症学会総会、2012年9月8日、椿山荘 (東京都)

(3) 鷹取 元、山下太郎、金子周一 肝細胞癌におけるdUTPpyrophosphataseの再発予後予測の有用性 第48回日本肝臓学会総会、2012年6月7日、石川県音楽堂 (金沢市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鷹取 元 (TAKATORI, Hajime)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：60613734