

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460982

研究課題名(和文) 肝癌治療標的としてのストレス関連遺伝子HSF1シグナルの解析

研究課題名(英文) Investigation of the HSF1 signaling pathway as the molecular targeted therapies for hepatocellular carcinoma.

研究代表者

中馬 誠 (Makoto, Chuma)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授

研究者番号：30360910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌におけるHSF1の役割と標的治療の可能性について研究を行った。HSF1の発現抑制により、MAPK経路の活性化の減弱と細胞増殖の低下、NF- κ Bの活性化の減弱とアポトーシスの亢進を認めた。肝癌の切除検体ではHSF1の高発現と臨床病理学的悪性度の相関を認めた。酸化ストレス肝発癌モデルとして alb-cre/LSL-KrasG12D を作成し、このモデルの高脂肪食負荷では、有意な肝発癌の増悪、腫瘍部で強いHSF1の発現を認め、酸化ストレス肝発癌、NASH肝発癌におけるHSF1の関与が示唆された。HSF1の機能解析と臨床検体の結果より、HSF1は肝癌における重要な治療標的分子に成り得る事が示された。

研究成果の概要(英文)：HSF1, a major transactivator of stress responses, has been implicated in carcinogenesis in various organs. We investigated to clarify the functional role of HSF1 in HCC. Tumorigenicity was significantly reduced in orthotopic mice with HSF1-KD cells compared to those with HSF1-control cells. Reduced tumorigenesis in HSF1-KD cells appeared attributable to increased apoptosis and decreased proliferation. Tumor necrosis factor α -induced apoptosis was increased in HSF1-KD cells and HSF1-/- mouse. Decreased expression of IKK β , a positive regulator of nuclear factor κ B, was also observed in HSF1-KD cells and HSF1-/- mouse hepatocytes. Clinicopathological analysis demonstrated frequent overexpression of HSF1 in human HCCs. Significant correlations between HSF1 protein levels and prognosis were also observed. In summary, these results identify a mechanistic link between HSF1 and liver tumorigenesis and may provide as a potential molecular target for the development of anti-HCC therapies.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝癌 分子標的治療 HSF1

1. 研究開始当初の背景

肝癌は従来成因としてB型およびC型肝炎ウイルスにより大半を占められていたが、近年では脂肪性肝炎(NASH)患者に伴う肝癌の発生が増加している。また難治進行肝癌に対する有効な分子標的薬は少なく、予後は極めて厳しい。肝発癌において炎症や活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)などのストレスが、その病態に重要な役割を果たすことが知られているが、これらにおける詳細な機序は未だ不明な点が多い。申請者らは、ストレス関連遺伝子である Heat shock protein (HSP)70 が肝癌の早期に高発現していることを報告し (Chuma et al, Hepatology 2003; 37: 198)、さらに HSP70 を制御している Heat shock factor 1 (HSF1) が肝癌のシグナル伝達に関与し、標的分子になる可能性について解析してきた。HSF1 は、様々なストレスにตอบสนองし、生体の恒常維持に関わっている一方で、HSF1 の抑制により多くの癌関連遺伝子(RAS, PDGF,ERK,HER2)の機能を減弱させ、腫瘍の進展抑制が得られる事や(Dai C et al. Cell 2007; 130: 1005)、腫瘍形成の多岐に関わる分子であることが考えられている(Mendillo et al. Cell 2012; 150: 549)。HSF1 を分子標的治療とした場合、HSF1 のみならず様々な分子の抑制が得られることが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、HSF1 の肝癌におけるシグナル伝達経路の解析、酸化ストレス肝発癌、脂肪性肝炎由来の肝発癌における HSF1 の役割を明らかにする事を主眼とした。具体的には、ストレス関連シグナルのマスター遺伝子である HSF1 を基軸とした解析することにより、既知、新規の下流因子を同定し、新規分子標的治療の候補因子を提言し、さらに動物モデルによって、その治療効果についての検討を行い、臨床応用への足がかりを作る事を目的とした。

3. 研究の方法

A. 肝癌における HSF1 の機能解析; HSF1 により制御を受けるシグナル伝達経路の解析と臨床検体における HSF1 の発現。1) DNA microarray における HSF1 標的遺伝子の探索 2) HSF1 knockout (HSF1KO)マウス、WT マウスの初代培養肝細胞株、HSF1 高発現肝癌細胞株(HSF1 control)、同細胞株の HSF1-knock down(KD)細胞での細胞増殖に関する検討 3) 上記 HSF1KO、WT マウス、HSF1 KD、control 細胞における apoptosis に関する検討 4) 肝癌切除症例の組織検体における HSF1 の発現と臨床病理学的検討を行った。

B. 肝癌治療標的としての HSF1 シグナル解析 1) 肝発癌モデルの作成。酸化ストレスを発生し、発癌を引き起こすと考えられる発癌モデルとして、潜在性 K-ras マウスにアルブミンプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼを発現するマウス(alb-cre/ LSL-Kras^{G12D})を作成。また非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデルである Alb Pik3ca マウスを基に LSL-Kras^{G12D} /alb-cre/Alb Pik3ca を作成し、脂肪性肝炎、酸化ストレス肝発癌における HSF1 の関与を検討した。2) HSF1 改変と酸化ストレス肝発癌モデルにおける HSF1 シグナルの解析。HSF1 コンディショナルノックアウトマウスから肝臓特異的に HSF1 遺伝子欠損マウスを作成する(HSF1^{Δhep} マウス)。HSF1^{Δhep} マウスと 1)で作成したモデルと交配することにより、発癌に対する HSF1 影響の検討を行う。HSF1 の改変により変化する酸化ストレスを中心とした因子を網羅的に解析する。3) 肝癌標的治療における HSF1 の検討。2)の結果により HSF1 が関与する標的分子の中和抗体の作成、siRNA の腫瘍組織への直接的注入や標的分子の発現細特異的プロモータ下に siRNA 配列をもつウイルスにて作成した治療法を構築する。

4. 研究成果

A.1) microarray では、HSF1 発現抑制により、転写因子 KLF, CDCA7、細胞骨格分子 vav3、Bcl 関連分子、MAPK シグナルなどの分子で発現の低下を認めた。2) HSF1-KD 細胞では、control に比較して、40%の増殖抑制を認めた。EGF 投与後、HSF1 control、WT マウスに比較して HSF1-KD、HSF1 KO マウスでは、EGFR,MEK,ERK のリン酸化の有意な低下を認めた。SCID マウスにおいて HSF1-KD では control に比較して有意に腫瘍の縮小を認めた。マウス肝左葉切除後の肝右葉において HSF1 は 24,48 時間後で発現の増加を認め、HSF1 は肝細胞の増殖、再生に関与していると考えられた。3)TNF α 投与後の NF- κ B signal については、WT マウスに比較して HSF1 KO マウスでは、HSF1 により制御されている BAG-3 (Bcl-2-associated athanogene domain 3)の発現減少を介して、IKK γ の proteasome degradation を来し、NF- κ B の活性化の低下を認めた。また HSF1-KD 細胞において、control 細胞に比較して TNF α 投与後 NF- κ B に制御されている抗アポトーシス分子の発現低下を認め、さらに TUNEL 染色において陽性細胞の上昇を認め、HSF1 の発現抑制は apoptosis の亢進に寄与していると考えられた (Carcinogenesis. 2014 Feb;35(2):272-81.)。4) 肝癌の切除検体における免疫組織染色では、癌部が非癌部に比較して約半数以上の症例で高発現しており、HSF1 の高発現と分化度、腫瘍径、腫瘍個数、予後が相関しており、臨床上も HSF1 の肝癌における関与が示唆された。また HSF1 の発現と MAPK シグナルの P-ERK の発現、NF- κ B の活性化に関与する BAG3 が相関している結果を得た。

B.1) 酸化ストレス肝発癌モデルである alb-cre/ LSL-Kras^{G12D} を作成した。alb-cre/LSL-Kras^{G12D} は 9 か月程度で 40%の頻度で肝癌が発生したが、更に高脂肪食投与では、3 か月で全マウスに肝癌が発生した。

alb-cre/ LSL-Kras^{G12D} では肉眼的に 2-10 個程度の肝癌が発生し、高脂肪食投与では、炎症性サイトカインである TNF α , IL-6 の増加およびその上流のシグナル因子である NF- κ B の活性化を認め、HSF1 の増加が脂肪肝部、特に腫瘍部において強く観察された。LSL-Kras^{G12D} /alb-cre/Alb Pik3ca を作成したところ、8 ヶ月で全例に肝癌の腫瘍形成を認めた。このモデルでは腫瘍部においてさらに非常に強い HSF1 の発現を認めた。これらより HSF1 の酸化ストレス肝発癌、NASH 由来の肝癌における HSF1 の関与が示唆された。その分子機序に関して現在検討中である。2), 3) HSF1 の肝臓特異的ノックアウトマウス(HSF1 Δ hep)を作成中であるが、HSF1 Δ hep マウスが期間内では十分に生育されなかった。そのため、2), 3) 酸化ストレス肝発癌における HSF1 のシグナル解析を期間内で明らかにするに至らなかったが、A, B.1)の成果により、HSF1 は肝癌治療における重要な標的分子になることが示唆され、酸化ストレス肝発癌における役割として今後も引き続き検討していく予定である。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Sho T, Nakanishi M, Morikawa K, Ohara M, Kawagishi N, Izumi T, Umemura M, Ito J, Nakai M, Suda G, Ogawa K, Chuma M, Meguro T, Nakamura M, Nagasaka A, Horimoto H, Yamamoto Y, Sakamoto N. A Phase I Study of Combination Therapy with Sorafenib and 5-Fluorouracil in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Drugs R D*. 2017 Jun 1. doi: 10.1007/s40268-017-0187-7. (査読あり)
2. Tsukuda Y, Suda G, Tsunematsu S, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Sho T, Maehara O, Shimazaki T, Kimura M, Morikawa K, Natsuzaka M, Ogawa K,

- Ohnishi S, **Chuma M**, Sakamoto N. Anti-adipogenic and antiviral effects of l-carnitine on hepatitis C virus infection. *J Med Virol*. 2017 May;89(5):857-866. (査読あり)
3. Terashita K, **Chuma M**, Hatanaka Y, Hatanaka K, Mitsuhashi T, Yokoo H, Ohmura T, Ishizu H, Muraoka S, Nagasaka A, Tsuji T, Yamamoto Y, Kurauchi N, Shimoyama N, Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, Maeda A, Ogawa K, Natsuizaka M, Kamachi H, Kakisaka T, Kamiyama T, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. ZEB1 expression is associated with prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2016 Jul;69(7):593-9. (査読あり)
 4. Maehara O, Sato F, Natsuizaka M, Asano A, Kubota Y, Itoh J, Tsunematsu S, Terashita K, Tsukuda Y, Nakai M, Sho T, Suda G, Morikawa K, Ogawa K, **Chuma M**, Nakagawa K, Ohnishi S, Komatsu Y, Whelan KA, Nakagawa H, Takeda H, Sakamoto N. A pivotal role of Krüppel-like factor 5 in regulation of cancer stem-like cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(10):1453-61. (査読あり)
 5. Numata K, Fukuda H, Nihonmatsu H, Kondo M, Nozaki A, **Chuma M**, Morimoto M, Oshima T, Okada M, Murakami T, Takebayashi S, Maeda S, Inayama Y, Nakano M, Tanaka K. Use of vessel patterns on contrast-enhanced ultrasonography using a perflubutane-based contrast agent for the differential diagnosis of regenerative nodules from early hepatocellular carcinoma or high-grade dysplastic nodules in patients with chronic liver disease. *Abdom Imaging*. 2015 Oct;40(7):2372-83. (査読あり)
 6. Tsunematsu S, **Chuma M**, Kamiyama T, Miyamoto N, Yabusaki S, Hatanaka K, Mitsuhashi T, Kamachi H, Yokoo H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Orimo T, Wakayama K, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Tsukuda Y, Sho T, Suda G, Morikawa K, Natsuizaka M, Nakanishi M, Ogawa K, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging*. 2015 Aug;40(6):1492-9. (査読あり)
 7. **Chuma M**, Terashita K, Sakamoto N. New molecularly targeted therapies against advanced hepatocellular carcinoma: From molecular pathogenesis to clinical trials and future directions. *Hepatol Res*. 2015 Oct;45(10):E1-E11.
 8. Tsunematsu S, Natsuizaka M, Fujita H, Otsuka N, Terashita K, Sato F, Kobayashi T, Nakai M, Tsukuda Y, Horimoto H, Sho T, Suda G, Nakanishi M, Hashino S, **Chuma M**, Sakamoto N. Hepatosplenic gamma-delta T-cell lymphoma associated with Epstein-Barr virus. *Intern Med*. 2014;53(18):2079-82.
 9. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Chuganji Y, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizaka M, Ogawa K, Ohnishi S, **Chuma M**, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N; NORTE Study Group. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatol Res*. 2015 Aug;45(8):837-45.

10. **Chuma M.**, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuzaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor-κB/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):272-81.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. **Chuma M.**, Sakamoto N, Numata K, Fukuda H, Kondo M, Nozaki A, Hara K, Tanaka K, Maeda S : Molecular Pathogenesis for HCC development: HSF1 potential molecular target for HCC therapies. 25th Asian Pacific Association for the Study of the Liver, 2016. 2. 22, Tokyo. (口演発表)
2. **中馬 誠**, 野崎昭人、前田慎 : DAA 治療による肝線維化関連マーカーの変化;IFN base 治療との比較検討 . ワークショップ 4 第 20 回 日本肝臓学会大会 2016 年 11 月 3 日 神戸 (口演発表)
3. **中馬 誠**, 前田慎 : 高脂肪食は肝癌の強力なプロモーターとして機能する 第 102 回日本消化器病学会総会 . プレナリーセッション 2016 年 4 月 21 日 東京 (口演発表)
4. **中馬 誠**, 坂本直哉、神山俊哉 : 肝細胞癌の早期再発予測に関する血清バイオマーカー シンポジウム 7 第 18 回 日本肝臓学会大会 2014 年 10 月 23 日 神戸 (口演発表)
5. **中馬 誠** 進行肝細胞癌に対する分子標的治療、肝動注療法の位置づけと今後の展開. 第 52 回日本癌治療学会 シンポジウム 18 2014 年 8 月 30 日 横浜 (口演発表)
6. **中馬 誠**, 永坂 敦、坂本直哉 核酸アナログ投与症例における肝発癌に関する

検討 : HBcrAg, HBs 抗原量の推移と肝発癌予測因子としての検討. 第 50 回 日本肝臓学会総会 シンポジウム 2 2014 年 5 月 30 日 東京 (口演発表)

〔図書〕(計 1 件)

1. **Chuma M.** Heat shock factor, Chapter 13: HSF supports cancer. Springer 2015; 978: 55850-7.

〔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

6 . 研究組織
 (1) 研究代表者
 中馬 誠 (CHUMA MAKOTO)
 横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授
 研究者番号 : 30860910

(2) 研究分担者
 坂本 直哉 (SAKAMOTO NAOYA)
 北海道大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号 : 10334418

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

〔その他の研究協力者〕
 ()