

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591603

研究課題名（和文）肝細胞癌の Mesenchymal Transition 機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of mesenchymal transition in HCC.

研究代表者

高村 博之（TAKAMURA HIROYUKI）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：40377396

研究成果の概要（和文）：ラジオ波焼灼療法(RFA)や肝動脈塞栓療法(TACE)による肝細胞癌(HCC)治療後の肝内局所再発でしばしば見られる治療抵抗性への形質転換（高度な浸潤・転移・増殖能の獲得）である Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) を、臨床検体を用いて明らかにした。さらに *in vivo* 実験系を用いて HCC の EMT 化に HIF-1 α がきわめて重要な働きをしていることを明らかにし、その阻害剤を用いることで EMT 化が抑制されることを証明した。

研究成果の概要（英文）：I clarified epithelial mesenchymal transition (EMT) which was transformation to treatment resistance to be often seen in local recurrence in the post-treatment (RFA and TACE) liver of the hepatocellular carcinoma (HCC). Furthermore I elucidated the molecular mechanism about EMT of HCC and clarified molecular target to prevent EMT with *in vivo* experimental model. It was probed that HIF-1 α has had extremely important role in EMT of the HCC and the EMT was restrained by using a repressor of HIF-1 α such as valproic acid (VPA).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

HCC の患者は、背景にウイルス性肝炎・肝硬変を合併している頻度が高く、その際の唯一絶対的な根治療法は文字通り肝移植である。しかし脳死肝移植が進まない日本の現状では、肝切除やラジオ波焼灼療法

(Radio-frequency ablation: RFA)、肝動脈塞栓療法(TCAE)などを組み合わせた集学的治療が基本であり、その治療成績は文字通り世界のトップレベルとって過言ではない。特にここ数年は、その保険適応が認可されたことから RFA が積極的に選択されるようになり、耐術性に問題のある患者の HCC の治

療成績を飛躍的に向上させた。局所のコントロールという観点からみれば、RFA や TACE よりも肝切除の方が勝っている。しかし、HCC は多中心性発症のリスクがきわめて高いため、肝内再発・多発病巣に対して繰り返し何度でも行うことが可能な RFA と TACE の組み合わせは HCC 治療のもう一方の主役に躍り出た。その反面、外科的切除と異なり局所の不十分な処理（焼灼、塞栓）が原因で、腫瘍がより低分化な細胞や肉腫（間葉系腫瘍）様細胞へと形質転換(EMT 化)してしまい、その浸潤・転移能を急速に高めて生命予後を著しく低下させてしまう負の遺産も見逃すことができなくなった。HCC はその再発・多発率が決して低くないにもかかわらず肝内胆管癌と比べて予後良好とされるのは、一般的に浸潤・転移能が低く、再発時の積極的治療が効を奏しているからに他ならない。もしも再発時の治療に失敗すれば、肝内胆管癌と同様にその予後はきわめて不良といわざるを得ない。しかし、RFA 後の再発に際して形質転換(EMT)を抑えることができれば、HCC の予後はさらに改善し、RFA 療法の意義は益々大きなものになると考えられる。不完全な RFA や TACE 時の腫瘍の EMT 化が抑えられれば、真に外科的切除と肩を並べる治療となるかもしれない。そのためには HCC の EMT 化の分子メカニズムを解明し、それを防止するための分子標的を明らかにすることが重要であった。

2. 研究の目的

研究 1. HCC に対する RFA や TACE などの局所療法を不十分な形で繰り返すことで、癌細胞の形質転換を招き、癌の浸潤・転移・増殖能が増して、その後の治療を困難なものにすることは臨床の場でよく経験されるが、その科学的な証明は十分に行われていなかった。そのため、申請者の施設で採取された RFA 施行前の生検による HCC 病理組織像と、RFA 後の局所再発巣の切除標本の病理組織像を、免疫染色学的手法を用いてその分子マーカーの発現を比較検討し、EMT 化が治療抵抗性の本体であることを明らかにする。本研究開始前に臨床検体を用いた詳細な病理学的検索を行い、RFA・TACE 後の局所再発巣は RFA 前の病理組織像に比べて分化度が低く、時に肉腫（間葉系細胞）様形態を呈することを明らかにしていた。また、同時に、HCC 合併肝硬変患者の肝移植後の治療成績が移植前の HCC の状態によって大きく異なることが世界的に証明されていた。特に Milan 基準内の症例と基準外の症例を比較すると、基準内の症例の方が有意に予後良好である。本邦の HCC に対する生体肝移

植の成績もまさしくその通りであり、Milan 基準を満たすことが、生体肝移植の保険適応の絶対的な条件になっている。そのため、HCC 合併肝硬変患者に対する生体肝移植後の治療成績と HCC の EMT 化との間に関係がないかどうかを明確にする。

研究 2. 申請者は HCC の不完全な局所療法 (RFA, TACE) 後の治療抵抗性への形質転換を獲得するメカニズムが EMT 化であると考えていたが、さらに HIF-1 α が EMT 化のきわめて重要な役割を担っていると予想していた。そこで、臨床検体の免疫組織学的検討によって明らかにされた治療抵抗性の分子表現マーカーを指標とし、HCC の cell line を用いた *in vitro* 実験系で、HIF-1 α が EMT 化を引き起こすかどうかを検証した。また、HIF-1 α は低酸素条件下でその発現が増すため、実際に HCC の cell line を低酸素環境下におくことで、EMT 化が認められるかどうかを検証し、同時にこの変化に可塑性が認められるかどうかを検証した。

さらに、HIF-1 α の各種阻害薬を用いて HIF-1 α の機能を抑えることにより、低酸素環境下においても EMT 化が抑えられるかどうかを検証し、さらに HIF-1 α を強制的に高発現させることで EMT 化を認めている HCC cell line においても阻害薬を用いることで浸潤能が抑えられるかどうかを検証し、臨床応用への足掛かりとすることを最終目標とした。

3. 研究の方法

研究 1). HCC の臨床検体を用いた RFA・TACE 治療後局所再発巣の形質転換の免疫組織学的評価を行った。申請者の施設で採取された RFA 施行前の生検による HCC 病理組織像と、RFA 後の局所再発に対して肝切除を行った症例の切除標本の病理組織像を、免疫染色学的手法を用いてその分子マーカー (E-cadherin, β catenin, N-cadherin, Vimentin, α -SMA, Snail, Twist, slug, etc) の発現を詳細に検討するとともに、それが EMT 化といえる変化かどうかを検証した。

同様に HCC 合併肝硬変で生体肝移植を施行された患者の切除肝の HCC の病理組織標本を用いて、EMT 化の分子マーカー (E-cadherin, β catenin, N-cadherin, Vimentin, α -SMA, Snail, Twist, slug, etc) の発現を免疫組織学的に検討し、肝移植後の HCC 再発と EMT 化の関係について検証した。

研究 2). HCC cell line (Hep G2) に対する

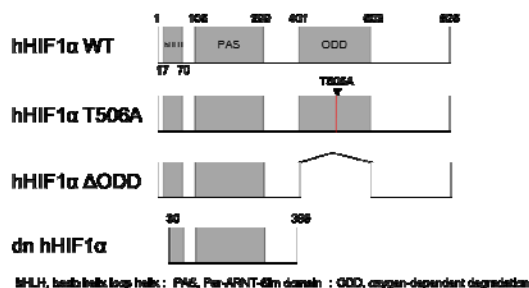
hypoxia 処理 (1% 酸素環境化で 72 時間培養) による HIF-1 α の発現状況の変化と EMT 化の有無を評価した。

Hep G2 に hypoxia stress をかけることで、細胞の形態や HIF-1 α の発現と EMT marker の発現にどのような変化が認められるかを、無処理細胞 (negative control) や twist 遺伝子導入細胞 (positive control) と比較検討した。標的蛋白の発現は免疫組織染色や western blotting にて評価し、mRNA の発現は RT-PCR で評価した。また、この変化が再酸素化により可塑性が認められるかどうかを検証した。

次に、HIF-1 α 遺伝子の ① wild type と ② degradation domain に変異が存在する mutant type (HIF-1 α の degradation が抑制) 及び ③ degradation 領域である ODD domain を欠失させることで HIF-1 α の恒常的発現を認める Δ ODD type, ④ ODD 以下を欠失させた dominant negative の四つの遺伝子発現ベクターを作成 (図 1) し Hep G2 に遺伝子導入を行った。それにより、mutant type と Δ ODD type で低酸素環境下と同じような EMT 化が認められるかどうかを検証した。その際の positive control として twist 遺伝子導入 HepG2 細胞を使用した。

さらに、EMT 化を分子表面マーカーのみならず invasion assay を用いて浸潤能を評価した。

図 1



上記実験系で証明された事実を元に、HIF-1 α の阻害薬である Hsp90 阻害薬 (radicicol), 微小管阻害剤 (タキサン系), トポイソメラーゼ阻害剤 (topotecan), HDAC 阻害剤 (valproic acid), PI3K 阻害剤 (rapamycin), チオレドキシシン阻害薬 (PX-12, pleurotin) を用いて、in vitro 実験系で EMT 化の抑制効果を検討した。即ち、阻害薬を用いることで、低酸素環境下の EMT 化が抑制されるかどうかを、また mutant type と Δ ODD type で浸潤能が抑制されるかどうかを評価した。特に抗がん剤以外では、既に抗てんかん薬として長年臨床の場で使用され臨床応用が直ちに可能な valproic acid

(VPA) の効果を中心に検討を行った。

4. 研究成果

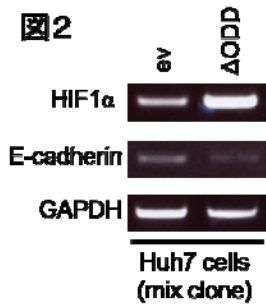
研究 1. RFA, TACE 後の局所再発巣は RFA, TACE 前の病理組織像と比べて分化度が低く、Vimentin, N-cadherin, β -catenin の発現が増加していることが明らかとなった。また E-cadherin の発現が低下し、snail や twist の発現が亢進していた。さらに α -SMA 陽性間質の増生が認められた。即ち、この形質転換が EMT に他ならないことを明らかにした。

また、HCC 合併肝硬変で生体肝移植を受けた症例において、再発例は無再発例に比べて Vimentin, N-cadherin, β -catenin の発現が増加していることが明らかとなった。また肝移植後 HCC 再発例では、E-cadherin の発現が低下し、snail や twist の発現が亢進していた。さらに α -SMA 陽性間質の増生が認められた。即ち、生体肝移植後の HCC 再と HCC の EMT 化が密接な関係にあることが明らかとなった。

以上より、不十分な局所療法 (RFA, TACE) により HCC が EMT 化し、また HCC の EMT 化が肝置換 (肝移植) 後の再発に関与することが明らかとなった。

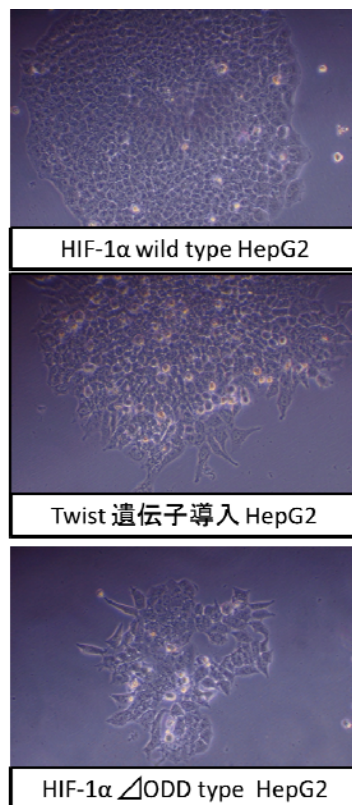
研究 2. Hep G2 を低酸素 (hypoxia : 1% 酸素環境下で 72 時間培養) 処理による HIF-1 α の発現状況の変化や EMT 様形態変化の有無について評価を行ったところ、Hypoxia stress により HIF-1 α 発現亢進と、細胞の形態が紡錘形に変化し、EMT 化の分子表現マーカーの発現が確認された。また invasion assay で浸潤能の亢進も確認された。一方、低酸素処理後に normoxia に戻すと EMT 化が認められなくなった。即ち腫瘍細胞の EMT 化の可塑性が確認された。

そこで、HIF-1 α 遺伝子の ① wild type と ② degradation domain に変異が存在する mutant type (HIF-1 α の degradation が抑制), 及び ③ degradation 領域である ODD domain を欠失させることで HIF-1 α の恒常的発現を認める Δ ODD type, ④ dominant negative type の四つの遺伝子を導入した Hep G2 のクローンを作成し、HIF-1 α の詳細な機能解析を行った。その結果、mutant type と Δ ODD type で E-cadherin の発現低下、 β -catenin の発現亢進、間葉系細胞形態への変化が認められた (図 2)。



特に Δ ODD type で浸潤能の亢進が確認され、EMT 化がより強く認められた。既に報告されている twist 遺伝子導入による HepG2 の EMT 化よりもさらに高度な EMT 化が確認された (図 3)。

図 3



癌の EMT 化において HIF1 α がきわめて重要な働きをしていることを解明した。

さらに HIF-1 α の各種阻害である Hsp90 阻害薬 (radicol), 微小管阻害剤(タキサン系), トポイソメラーゼ阻害剤(topotecan), PI3K 阻害剤 (rapamycin) などの抗がん剤や HDAC 阻害剤(valproic acid) を用いて, in vitro 実験系で EMT 化の抑制効果を検討した。これらの薬剤を用いて低酸素環境下の HepG2 の EMT 化が抑制されるかどうかを、また Δ ODD type HepG2 で浸潤能が抑制されるかどうかを invasion assay を用いて検討した。これらの HIF-1 α 阻害薬を用いることで HepG2 の低酸素環境下の EMT 化が抑制され、さらに Δ ODD type HepG2 の浸潤能が低下することが明らかとなった。抗がん剤は細胞増殖抑制効果が強いいため EMT 化抑制効果のみを推し量ることができなかったが、既に抗てんかん薬として長年臨床の場で使用されており直ちに臨床応用可能な valproic acid (VPA) の EMT 化抑制効果はより明確なものであった。現在、VPA の臨床応用を開始している。また、論文投稿に向けて最終準備中である。

かを、また Δ ODD type HepG2 で浸潤能が抑制されるかどうかを invasion assay を用いて検討した。これらの HIF-1 α 阻害薬を用いることで HepG2 の低酸素環境下の EMT 化が抑制され、さらに Δ ODD type HepG2 の浸潤能が低下することが明らかとなった。抗がん剤は細胞増殖抑制効果が強いいため EMT 化抑制効果のみを推し量ることができなかったが、既に抗てんかん薬として長年臨床の場で使用されており直ちに臨床応用可能な valproic acid (VPA) の EMT 化抑制効果はより明確なものであった。現在、VPA の臨床応用を開始している。また、論文投稿に向けて最終準備中である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①「HCC に対する LDLT 後の再発における EMT の意義と再発予防に向けた取り組み」

JDDW (肝臓学会 etc) H22 年 10 月 14 日 パシフィコ横浜 高村博之, その他.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高村 博之 (TAKAMURA HIROYUKI)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：40377396

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし