

令和元年9月5日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04695

研究課題名(和文) 肝細胞がんの多様性・変幻性におけるMT1-MMP依存性分子経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of MT1-MMP-dependent molecular pathways in the diversity and transformation of hepatocellular carcinoma

研究代表者

清木 元治 (Seiki, Motoharu)

金沢大学・医学系・特任教授

研究者番号：10154634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんは多様な性質を持つがん細胞から構成されており、治療への感受性も細胞ごとに異なる。がんにはがん幹細胞が存在するとされており、そこから実際のがん細胞が生じる。従って、がんの理解にはがん幹細胞を理解することが不可欠である。ヒト肝臓がんではEpCAM陽性とCD90陽性の異なるタイプのがん幹細胞が知られており、両タイプの相違は造腫瘍性や浸潤・転移などの病態に反映される。本研究ではがんの悪性形質を制御する膜型マトリックスメタロプロテアーゼ(MT1-MMP)と本分子により駆動される分子経路の要となる分子の発現と機能を二つのタイプのがん幹細胞で発現していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓がん幹細胞としてEpCAM陽性タイプの細胞とCD90陽性タイプの存在が知られており、これら細胞の特徴は肝がんの臨床像に反映される。悪性化を促進する膜型プロテアーゼ(MT1-MMP)とそれによって駆動される分子経路をそれぞれのタイプの幹細胞での発現と働きを明らかにした。その結果、新しい腫瘍マーカーや治療法の開発につながる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Cancer is composed of cancer cells with various properties, and the sensitivity to treatment also varies from cell to cell. Cancer stem cells are believed to be present, from which actual cancer cells arise. Therefore, understanding cancer stem cells is essential to understanding cancer.

In human liver cancer, different types of cancer stem cells of EpCAM-positive and CD90-positive are known, and the difference between both types is reflected in the pathogenesis such as tumorigenicity, invasion and metastasis. In this study, we confirmed two types of the cancer stem cells express membrane-type matrix metalloproteinase (MT1-MMP), which controls malignant characteristics of cancer, and the key molecules of the molecular pathway driven by this molecule are functional in the cells.

研究分野：がんの分子生物学

キーワード：肝臓がん がん幹細胞 がんの増殖・浸潤・転移 MT1-MMP HIF-1 Mint3 EpCAM CD90

## 1. 研究開始当初の背景

本研究で着目するがん腫は肝がん(HCC)である。肝がんは、世界で約62万人が罹患し、60万人が死亡し、死亡原因の第3位である。ICGC によるゲノム解析結果が報告されており (Shibata & Aburatani, Nature Reviews, 2014)、多様な遺伝子変異の蓄積が観察されるものの、強力なドライバー遺伝子の高頻度変異は認められていない。しかし、幾つかの特徴的遺伝子変異、増幅、エピゲノム修飾が報告されている。臨床では、分子標的薬としてソラフェニブが用いられるが、治療は困難である。発がんの原因となるのは、HCV, HBV 等のウイルス感染や環境の変異原などであり、肝炎、肝硬変を伴って発がんに至る。また、脂肪肝、糖尿病、アルコール性肝疾患も発がんを促進する。これらの要因によって炎症が亢進すると、間質の細胞が活性化され、産生されたコラーゲンの蓄積により、肝組織の線維化が亢進し、肝機能が障害される。同時に、発がんリスクが上昇する。分担者の金子、山下らは、消化器がんの病態解析を病理組織学に加えて、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームレベルで行っている。血中 RNA を用いた診断薬キットも開発し、臨床試験を行っている。また、臨床材料からマウス PDX に展開する系、マウス発がんモデル、各種の HCC 細胞株を持ち、基礎研究と臨床研究を双方向性に展開できる体制を構築している。これらの実験系を駆使して、HCC がん細胞集団が均一ではなく、一定の割合で幹細胞の表面マーカー EpCAM, CD133, CD90, Lgr5, CD44 などを持つがん幹細胞様の細胞が存在することを明らかにしている。中でも、EpCAM 陽性細胞と CD90 陽性細胞はお互いに独立して存在しており、HCSC にも不均一性があることを明らかにした(Yamashita, et al. Gastroenterology, 2009)。これらの細胞は in vitro で sphere 形成能を有しており、免疫不全マウスに腫瘍を形成できる。腫瘍形成能は EpCAM 細胞に強く、CD90 細胞は弱い。しかし、CD90 細胞には強い転移形成能が認められる。CD90 細胞は TGF- $\beta$  の産生をしており、EpCAM 陽性細胞と共存すると転移能を増強させる。EpCAM 陽性 HCSC を含む細胞を抗がん剤によるストレスに暴露すると CD90 陽性細胞へと転換する現象も観察している。

研究代表者らは膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT1-MMP) を発見し、同分子がそのプロテアーゼ作用による基質タンパク質の機能変換および相互作用分子の機能制御を介してがん細胞の増殖と浸潤を強く促進することを明らかにしている。HCC における MT1-MMP の研究は限られているが、MT1-MMP の発現頻度は3割程度で認められ、その発現と予後とは極めて強い相関がある(Maatta, M. et al. Clin Can Res, 2000)。また、金子らは、HCC に於いて、EphA1, EphA2 の mRNA 発現を認めるが、EphA2 タンパクレベルがなんらかの原因で低下していることを見出しており (Iida, H. Gut, 2005)、EphA2 が MT1-MMP により切断されている可能性などが考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、MT1-MMP 依存性の分子経路を、臨床材料の解析で得られたがん細胞の多様性、可塑性、変幻性の実態に落とし込んで理解することを目指している。MT1-MMP とそれにより駆動される分子経路に関して、臨床の実態に即した evidence を取得する。このことにより、肝がんて本分子経路に着目した診断や治療が可能かも検討する。

## 3. 研究の方法

これまで、様々な培養細胞を使って MT1-MMP を起点とする複数の分子経路の解明を行ってきた。本研究では、肝臓がんの複雑性、変幻性の中で、これらの分子経路が、がん組織で使われている実態に迫る解析を行う。そのために、臨床材料で観察される複雑性や可塑性を反映することを確認している肝がん細胞株を用いた研究を開始する。そこで、MT1-MMP が発現する細胞集団を特定し、さらに MT1-MMP により駆動されるどの分子経路が働いていることを確認する。臨床材料での評価にはマウス PDX モデルを用いて、細胞株での知見の確認と機能評価を行う。また、病理組織での評価も行う。

## 4. 研究成果

- (1) 肝細胞がんの多様性をごん幹細胞マーカーに着目して検討した。上皮間葉転換の性質を有する CD90 陽性細胞では、EpCAM 陽性細胞に比し、MT1-MMP 遺伝子発現、免疫チェックポイント分子である PD-L1、PD-L2 の遺伝子発現が高い。上皮間葉転換と MT1-MMP の活性化、免疫監視機構からのエスケープ現象との関連が示唆された。
- (2) 肝がんの腫瘍マーカーとして知られる AFP や PIVKA-II は EpCAM 陽性がん細胞で発現が高く、CD90 陽性がん細胞では MT1-MMP の基質であるラミニン 2 単鎖 (Ln-2m) の高い発現が観察され、Ln-2m は新たな腫瘍マーカーとなり、AFP や PIVKA-II を補完する可能性が示された。一方で、上皮間葉転換を制御する TWIST1、SNAI1 の遺伝子発現を抑制したところ、CD90、PD-L1、PD-L2 の遺伝子発現変化は認められなかった。
- (3) また、PDGF-CTg/TP53-/-マウスから肝がん細胞株を3種類作成し、C57/BL6 における生

着能を有する EpCAM 陽性肝がん細胞株、CD90 陽性肝がん細胞株の作成に成功した。これらの細胞は抗 PD-1 抗体治療に対し抵抗性を示した。

(4) 浸潤能が高い生細胞を分別回収できるアッセイ装置を開発し、MT1-MMP 発現と浸潤の関係を調べたところ、正の相関が確認できた。

(5) MT1-MMP 発現は HIF-1 の活性化を誘導するが、その実行に関わる Mint3 は肝がんを含む肝臓組織細胞で広範に発現している。Mint3 発現のノックダウンは肝がん細胞の幹細胞性には影響を与えなかったが、肝がん PDX モデルにおける Mint3 ノックダウンは MT1-MMP ノックダウンと同様に造腫瘍能を抑制した。また、PDGF-C Tg 肝発がんモデルマウスへの Mint3 siRNA 投与ではコントロールに比べ有意に肝がんの発症が抑制された。しかし、肝がん細胞の幹細胞特性への影響は見られなかった。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

1. Yasuda H, Nakagawa M, Kiyokawa H, Yoshida E, Yoshimura T, Koshikawa N, Itoh F, Seiki M. Unique Biological Activity and Potential Role of Monomeric Laminin-2 as a Novel Biomarker for Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan;20(1). pii: E226. 査読あり
2. Takahashi Y, Hamasaki M, Aoki M, Koga K, Koshikawa N, Miyamoto S & Nabeshima K. Activated EphA2 processing by MT1-MMP is involved in malignant transformation of ovarian tumours in vivo. *Anticancer Res*. 2018 Jul;38(7):4257-4266. 査読あり
3. Kikuchi K, Kozuka-Hata H, Oyama M, Seiki M & Koshikawa N. Identification of proteolytic cleavage sites of EphA2 by membrane type-1 matrix metalloproteinase on the surface of cancer cells. *Methods in Molecular Biology* 2018; 1731:29-37. 査読あり
4. Suzuki T, Minerva D, Nishiyama K, Koshikawa N, and Chaplain MAJ. Study On The Tumor-Induced Angiogenesis Using Mathematical Models. *Cancer Sci*. 2018 Jan;109(1):15-23. 査読あり
5. Takino T, Sato H, Seiki M. (2018) Simple and cost-effective assay for isolating invasive living cells. *Biotechniques*, 65(3):137-142. 査読あり
6. Shiba I, Kouzaki R, Yamada H, Endo Y, Takino T, Sato H, Kitazato K, Kageji T, Nagahiro S, Uto Y. (2017) Design and synthesis of novel anti-metastatic hypoxic cytotoxin TX-2137 targeting Akt kinase. *Anticancer Research*, 37: 3877-3884. 査読あり
7. Li Z, Takino T, Endo Y, Sato H. (2017) Activation of matrix metalloproteinase (MMP)-9 by membrane-type-1 matrix metalloproteinase/MMP-2 axis stimulates tumor metastasis. *Cancer Science*, 108:347-353.
8. Sakr M, Takino T, Sabit H, Nakada M, Li Z, Sato H. (2016) miR-150-5p and miR-133a suppress glioma cell proliferation and migration through targeting membrane-type-1 matrix metalloproteinase. *Gene*, 587: 155-162.
9. Takino T, Nakada M, Li Z, Yoshimoto T, Domoto T, Sato H. (2016) Tip60 regulates MT1-MMP transcription and invasion of glioblastoma cells through NF- $\kappa$ B pathway. *Clinical & Experimental Metastasis*, 33:45-52.
10. Koshikawa N, Minegishi T, Kiyokawa H, Seiki M. (2017) Specific detection of soluble EphA2 fragments in blood as a new biomarker for pancreatic cancer. *Cell Death Dis*, 8: e3134
11. Blanco, M. J. Rodriguez-Martin, I. Learte, A. I. R. Clemente, C. Montalvo, M. G. Seiki M, Arroyo, A. G. Sanchez-Camacho, C. (2017) Developmental expression of membrane type 4-matrix metalloproteinase (Mt4-mmp/Mmp17) in the mouse embryo, *PLoS One*, 12: e0184767
12. Hara, T. Nakaoka, H. J. Hayashi, T. Mimura, K. Hoshino, D. Inoue, M. Nagamura, F. Murakami, Y. Seiki M, Sakamoto T. (2017) Control of metastatic niche formation by targeting APBA3/Mint3 in inflammatory monocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E4416-E4424
13. Terashima, T. Yamashita T, Arai, K. Kawaguchi, K. Kitamura, K. Yamashita, T. Sakai, Y. Mizukoshi, E. Honda, M. Kaneko S. (2017) Beneficial Effect of Maintaining Hepatic Reserve during Chemotherapy on the Outcomes of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer*, 6:236-249
14. Yoshida, M. Yamashita T, Okada, H. Oishi, N. Nio, K. Hayashi, T. Nomura, Y. Hayashi, T. Asahina, Y. Ohwada, M. Sunagozaka, H. Takatori, H. Colombo, F. Porretti, L. Honda, M. Kaneko S. (2017) Sorafenib suppresses extrahepatic metastasis de novo in hepatocellular carcinoma through inhibition of mesenchymal cancer stem cells characterized by the expression of CD90. *Sci Rep*. 7:11292

15. Nakaoka HJ, Hara T, Yoshino S, Kanamori A, Matsui Y, Shimamura T, Sato H, Murakami Y, Seiki M, Sakamoto T (2016) ECAB3 Promotes Activation of Hypoxia-inducible factor-1 during Normoxia and Enhances Tumorigenicity of Cancer Cells. Sci Rep. 6: 22784
16. Yoshino S, Hara T, Nakaoka HJ, Kanamori A, Murakami Y, Seiki M, Sakamoto T. (2016) The ERK signaling target RNF126 regulates anoikis resistance in cancer cells by changing the mitochondrial metabolic flux. Cell Discovery 25: 16019 査読あり

〔学会発表〕(計 17件)

1. 越川直彦、星野大輔、清木元治：がん抑制因子から促進因子に変換する EphA2 プロセシングの解明、第 77 回日本癌学会学術総会 2018. 9.27-29.
2. 越川直彦：悪性がんのバイオマーカーとしてのラミニン 2 単鎖、第 27 回日本がん転移学会学術集会、会長講演 2018.7. 19-20.
3. 越川直彦：MT1-MMP による EphA2 の限定分解（プロセシング）を介したがん悪性化進展制御の分子機序の解明、第 50 回日本結合組織学会学術大会 2018.6.29-30.
4. Koshikawa N & Seiki M: EphA2 cleavage by MT1-MMP acts as a switch converting a tumor suppressor into an oncoprotein and could be a possible target for cancer diagnosis, ISOBM 2018, Hamburg, Germany, 2018. 11.23-17
5. 滝野隆久、清木元治：浸潤細胞の捕獲を目的としたアッセイ法の開発、第 77 回日本癌学会学術総会 2018.9.28
6. 滝野隆久、堂本貴寛、佐藤博、清木元治：浸潤細胞の分離・捕獲を目的とした測定方法の開発、第 27 回日本がん転移学会学術総会 2018.7.19
7. Suda, T., Yamashita, T., Kaneko, S., Dickkopf-1 is a new molecular target for the treatment of hepatocellular carcinoma, AASLD Annual Meeting, 2018.11.12, San Francisco, U.S.A.
8. 丹尾幸樹、山下太郎、金子周一：多様な癌幹細胞からなる肝細胞癌に対する最適な分子標的治療の検討、日本消化器関連学会週間（JDDW）総会、2018.11.1
9. 丹尾幸樹、吉田真理子、山下太郎、金子周一：ソラフェニブは CD90 陽性間葉系癌幹細胞を減らし肝細胞癌の遠隔転移を抑制する、第 27 回日本がん転移学会総会、2018.7.19
10. 丹尾幸樹、陳晗、山下太郎、金子周一：肝細胞癌における BMP9 発現の臨床的意義と幹細胞性維持への影響、第 54 回日本肝癌研究会、2018.6.28
11. 坂本毅治、林哲郎、福井優也、鄭裕花、村上善則、清木元治：Mint3 を標的としたがん治療の可能性、第 6 回がんと代謝研究会、2018.5.10、
12. 坂本毅治：腫瘍関連マクロファージの分極化に関わる分子機構の解析、第 27 回日本がん転移学会学術集会・総会、2018.7.20、
13. 坂本毅治：HIF 活性化分子 Mint3 によるがん微小環境制御機構の解明と創薬への応用、招待講演、日本薬学会第 139 年会、2019.3.23
14. 坂本毅治、芳野聖子、福井優也、清木元治、村上善則、井上純一郎：RNA exosome complex 9 (EXOSC9)はがん細胞のストレス耐性と造腫瘍能に必要である、第 41 回日本分子生物学会年会、2018.11.28
15. 滝野隆久、堂本貴寛、佐藤博、清木元治：浸潤細胞の分離・捕獲を目的とした測定方法の開発、第 27 回日本がん転移学会学術総会 2018.7.19
16. 滝野隆久：浸潤・非浸潤細胞の分別回収を目的とした新規浸潤測定方法の開発、第 90 回日本生化学会大会 2017.12.7
17. 滝野隆久、堂本貴寛、吉本泰佑、川尻秀一、遠藤良夫、佐藤博：JIP3 は c-AbI と Arg の基質である、第 75 回日本癌学会学術総会 2017.10.6

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称：EphA2 N 末端フラグメント抗体

発明者：越川直彦、清木元治

権利者：国立大学法人東京大学、神奈川県立病院機構

種類：

番号：特願 2018-534429

出願年月日：2018 年 12 月 4 日

国内外の別：国内

名称：がん細胞浸潤能測定方法及び測定キット

発明者：滝野隆久、佐藤博、遠藤良夫

権利者：国立大学法人金沢大学

種類：

番号：特願 2017-107424  
出願年月日：2018 年 12 月 4 日  
国内外の別：国内

名称：EphA2 N 末端フラグメント抗体  
発明者：越川直彦、清木元治  
権利者：国立大学法人東京大学、神奈川県立病院機構  
種類：  
番号：特願 2018-534429  
出願年月日：2018 年 12 月 4 日  
国内外の別：国内

取得状況（計 1 件）  
名称：がんの予後判定および診断方法  
発明者：中川将利、吉村 徹、吉田栄作、清木元治、越川直彦  
権利者：国立大学法人 東京大学、アポットジャパン（株）  
種類：  
番号：特許第 6328103  
取得年月日：2018 年 4 月 27 日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

清木 元治（SEIKI MOTOHARU）  
金沢大学・医学系・特任教授  
研究者番号：10154634

### (2)研究分担者

金子 周一（KANEKO SYUICHI）  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：60185923

### (3)研究分担者

山下 太郎（YAMASHITA TARO）  
金沢大学・附属病院・准教授  
研究者番号：90377432

### (4)研究分担者

越川 直彦（KOSHIKAWA NAOHICO）  
神奈川県立がんセンター・臨床研究所・部長  
研究者番号：70334282

### (5)研究分担者

坂本 毅治（YSAKAMOTO TAKEHARU）  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号：70511418

### (6)研究分担者

滝野 隆久（TAKINO TAKAHISA）  
金沢大学・GS 教育系・教授  
研究者番号：40322119

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。