

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08992

研究課題名(和文) 肝細胞癌における表面抗原発現パターンに基づいた癌幹細胞標的新規治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of new therapy for HCC based on stemness surface markers

研究代表者

大石 尚毅(OISHI, NAOKI)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20507040

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)：肝細胞癌において上皮間葉系移行が癌幹細胞に与える影響を評価し、新規治療法の解明を行った。上皮性肝細胞癌ではEpCAMとCD133が高発現し、ヒストン修飾蛋白であるHDAC1の活性化が予後不良であった。一方、間葉性肝細胞癌ではCD56とCD90が高発現し、DNAメチル化制御蛋白であるDNMT1及びDNMT3bの活性化が予後不良であった。上皮性肝細胞癌ではHDAC阻害剤が抗腫瘍効果を示し、間葉性肝細胞癌ではDNMT阻害剤が抗腫瘍効果を示した。上皮性肝細胞群では、DNA作用型抗がん剤との併用でHDAC1阻害薬との相乗効果がみられ、肝細胞がんに対する新たな治療戦略となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：I evaluated the relationship between epithelium-Mesenchymal transition and features of hepatic cancer stem cells. Moreover, I identified new therapy based on a pattern of stemness surface markers. In epithelial-like HCC cases, highly expression of EpCAM or CD133, or activation of HDAC1 pathway indicated poor prognosis. While, in mesenchymal-like HCC cases, highly expression of CD56 or CD90, or activation of DNMT1 or DNMT3b pathways were poor prognostic marker. HDAC1 inhibitor suppressed tumor proliferation and invasion in Epithelial-like HCC cells. On the other hand, DNMT inhibitor showed the anti-tumor effect in Mesenchymal-like HCC cells. In Epithelial-like HCC cells, combination DNA-effected anti-cancer drugs and HDAC inhibitor indicated synergistic effect in the suppression of tumor proliferation and invasion. This combination therapy may be new therapy for Epithelial-like HCC cases.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝細胞癌 上皮間葉系移行 ヒストン修飾タンパク阻害薬 DNAメチル化制御タンパク阻害薬 癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は本邦において罹患率、死亡数ともに4番目に多い癌である。手術などの治療により根治が得られても高率に再発すること、食生活の欧米化に伴い、アルコール性肝硬変や非アルコール性脂肪肝炎を背景にした肝細胞癌が増え、進行した状態で発見される症例が増えたことなどが原因として考えられている。

近年、癌幹細胞が抗癌剤への薬剤耐性や多臓器への浸潤・転移などの予後不良な病態に関与していることが明らかとなり、予後不良癌の治療として、癌幹細胞を標的とした治療法の開発が望まれている。また、エピジェネティクス制御が癌幹細胞の維持に重要とされ、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤や DNA メチル化酵素 (DNMT) 阻害剤が新たな癌幹細胞の治療薬として注目を集めている (Mario L. et al. Science 339, 1567 (2013))。癌幹細胞は微小環境の影響により誘導される EMT で細胞特性を変化させることが知られ、特性に応じた治療法の確立が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、第一段階として上皮様と間葉様の特性に応じた特異的癌幹細胞表面抗原の同定を行う。そして、表面抗原の発現パターンごとに、HDAC 阻害剤、DNMT 阻害剤を中心とした癌幹細胞を標的とした効果的な新規治療法の開発を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) EMT と癌幹細胞表面抗原発現パターンの検討

#### EMT と癌幹細胞の関係の検討

培養肝癌細胞株に肝細胞増殖因子および TGF- $\beta$  を培養液に添加し EMT を誘導する。上皮系細胞表面抗原 (CDH1) 及び間葉系細胞表

面抗原 (VIM、CDH2) の発現パターンを評価する。EMT 誘導前後で癌幹細胞表面抗原である EpCAM、CD133、CD56、CD90 の発現パターンを評価する。肝癌細胞株としては、Huh7 細胞、Huh1 細胞、Hep3B 細胞、HLF 細胞、HLE 細胞、PLC-PRL 細胞の他、申請者の所属する研究室で肝癌患者の切除標本より樹立された6種類の細胞株を用いて検討する。

#### 癌幹細胞表面抗原発現パターンと臨床的特徴の解析

臨床背景の判明している肝細胞癌 244 例、139 例のマイクロアレイデータを用いて検討する。上皮様特性群における2群 (EpCAM 陽性、EpCAM 陰性 CD133 陰性) 間葉様特性群における2群 (CD56 陽性、CD56 陰性) と臨床的特徴 (発症年齢、浸潤・転移の有無、無再発生存期間、全生存期間) の検討を行う。上皮様および間葉様特性の分類は、244 例および139 例のマイクロアレイデータ、144 例の免疫組織染色の解析から、mRNA 発現量では CDH1/VIM 値が有用であると考えている。CDH1/VIM、癌幹細胞表面抗原発現量は中央値により分類する。

### (2) HDAC 阻害剤、DNMT 阻害剤感受性と癌幹細胞表面抗原の関連性の検討

上皮様特性群における HDAC 阻害剤、間葉様特性群における DNMT 阻害剤の効果の検討

上皮様特性を有する細胞の培養液に HDAC 阻害剤を加え投与前後での変化を評価する。特に癌幹細胞表面抗原の発現量、極性の変化に注目する。また、自己複製能、遊走・浸潤能、腫瘍形成能を評価し癌幹細胞性の変化の検討も行う。間葉様特性を有する細胞に関しても同様の検討を行う。

癌幹細胞表面抗原発現パターンによる HDAC 阻害剤、DNMT 阻害剤の抗腫瘍効果の評価

上皮特性群において EpCAM 陽性群、EpCAM 陰性群の 2 群に細胞を分離し、HDAC 阻害剤の感受性を評価する。間葉系特性群において CD56 陽性群、CD56 陰性群の 2 群に分離し、DNMT 阻害剤の抗腫瘍効果を評価する。

( 3 ) HDAC 阻害剤、DNMT 阻害剤の感受性に関わる因子の検討および新規治療法の開発  
従来の抗がん剤との併用による新規治療法の検討

DNA 作用型抗がん剤を HDAC 阻害剤または DNMT 阻害剤と併用し、低感受性群における相乗効果を評価する。

#### 4 . 研究成果

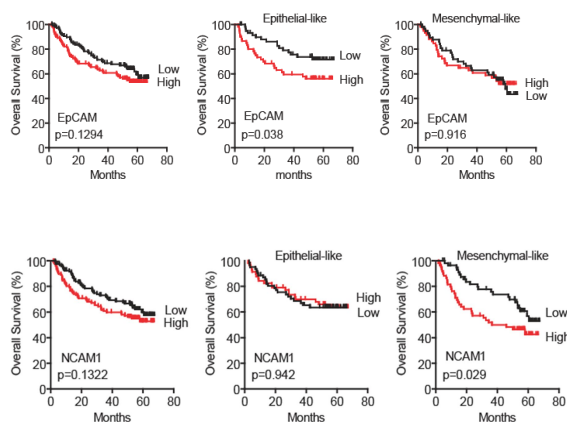
( 1 ) EMT と癌幹細胞の関係の検討

培養肝細胞癌株に肝細胞増殖因子および TGF- $\beta$  を添加し EMT を誘導したところ、細胞の形態は紡錘状に変形、CDH1 の発現は抑制され、VIM、CDH2 の発現が誘導された。特に CDH1 と VIM の発現量は強い負の相関関係を示していた。癌幹細胞表面抗原の検討では、EMT 誘導により CD56、CD90 の高発現を認めた。

( 2 ) 癌幹細胞表面抗原と臨床的特徴

	Epithelial-like		Mesenchymal-like		p value
	# of cases observed	%	# of cases observed	%	
EpCAM	53	43	70	57	0.041
NCAM1	59	48	64	52	0.61
CD133	52	42	71	58	0.022
TGFB1	45	36	78	64	<0.0001
ZEB2	44	35	79	65	<0.0001
Metastasis	47	39	73	61	0.0008
Prognosis	24	20	56	46	<0.0001
P53 mutations	24	20	22	18	0.746

244 例の肝細胞癌症例のマイクロアレイデータ、遺伝子解析データを用いた検討において、間葉様特性を有する肝細胞癌症例では、TGF- $\beta$  の活性化がみられ、間葉系マーカーである ZEB2 が高発現し、強い転移能を示していた。上皮様特性を有する肝細胞癌症例と比較し予後不良であった。



EpCAM および NCAM1 ( CD56 ) は単独では肝細胞癌の予後不良マーカーとはならず、上皮間葉系特性を用いて検討を行った。

上皮様特性を有する肝細胞癌では EpCAM 高発現症例が有意に予後不良であった。一方、間葉様特性を有する肝細胞癌では CD56( NCAM1 ) 高発現症例が有意に予後不良であった。

パスウェイ解析 ( Ingenuity pathway analysis ) にて、上皮様特性を有する肝細胞癌症例では、EpCAM 高発現群で HDAC 経路が活性化していた。また、間葉様特性を有する肝細胞癌では、CD56 高発現群で DNMT 経路が活性化していた。

独立した 139 例の肝細胞癌症例のマイクロアレイデータ、144 例の肝細胞癌症例の免疫組織染色によるデータの検討でも同様の結果が得られた。

( 3 ) HDAC 阻害剤、DNMT 阻害剤と癌幹細胞表面抗原の関連性、抗腫瘍効果の検討

上皮様特性を有する肝細胞癌において HDAC が、間葉系特性を有する肝細胞癌において DNMT が予後不良に重要な因子と考えられ、これらはそれぞれの群において癌幹細胞性の維持に関与していることが判明した。そのことから、それらの阻害剤を用いて腫瘍抑制能を検討した。

上皮様特性を有する肝細胞癌細胞において、HDAC 阻害剤は EpCAM 高発現細胞で有意に高い

抗腫瘍効果（増殖能抑制、浸潤能抑制）を示したが、EpCAM 低発現群では抗腫瘍効果はわずかであり有意とはならなかった。

一方、間葉様特性を有する肝細胞癌においては、DNMT 阻害剤は CD56 高発現群で抗腫瘍効果を認めたが有意ではなく、CD56 低発現群では抗腫瘍効果を認めなかった。

#### (4) DNA 作用型抗がん剤と HDAC 阻害剤の併用療法の検討

上皮様特性を有する EpCAM 高発現肝細胞癌細胞で HDAC 阻害剤の腫瘍増殖抑制効果。浸潤能抑制効果が示されており、上皮様特性を有する肝細胞癌細胞にて検討を行った。

用いた併用薬剤は、HDAC がエピジェネティクスの制御を担っていることから、DNA を標的とした抗癌剤（Cisplatin、Bleomycin、Mytomycin-C、Etoposide）とした。

Cisplatin および Bleomycin は HDAC 阻害剤との併用により相乗効果が認められたが、ほかの 2 剤では相乗効果を認めなかった。特に Cisplatin では有意に高い抗腫瘍効果が認められた。

一方、間葉様特性を有する CD56 高発現肝細胞癌細胞では、これらの薬剤と DNMT 阻害薬の相乗効果は認められなかった。

以上の結果より、肝細胞癌は CDH1 と VIM の発現量により上皮様特性を有する群と間葉様特性を有する群に分類され、それぞれの群で EpCAM、CD56 が予後不良マーカーとなることが示された。さらに上皮様特性群では HDAC1 阻害剤、間葉様特性群では DNMT 阻害剤が抗腫瘍効果を示し、上皮様特性群では Cisplatin の併用によりより高い抗腫瘍効果を示すことが判明した。

#### 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)

Xuyang, Naoki Oishi, Shimakami Tetsuro, Yamashita Taro, Honda Masao, Murakami Seishi, Kaneko Shuichi, Hepatitis B virus X protein induces hepatic stem cell-like features in hepatocellular carcinoma by activating KDM5B, World Journal of Gastroenterology, (23) 3252~3252, 2017 査読あり

Yoshida Mariko, Yamashita Taro, Okada Hikari, Oishi Naoki, Nio Kouki, Hayashi Takehiro, Nomura Yoshimoto, Hayashi Tomoyuki, Asahina Yoshiro, Ohwada Mika, Sunagozaka Hajime, Takatori Hajime, Colombo Federico, Porretti Laura, Honda Masao, Kaneko Shuichi, Sorafenib suppresses extrahepatic metastasis de novo in hepatocellular carcinoma through inhibition of mesenchymal cancer stem cells characterized by the expression of CD90, Scientific Reports, (7), 2017 査読あり

[学会発表](計2件)

大石尚毅、幹細胞および上皮間葉系移行表面抗原による予後不良肝癌の同定と EpCAM 発現調節機構の解明、第 102 回日本消化器病学会総会、東京、2016 年 4 月 21 日

大石尚毅、トランスクリプトーム解析による予後不良肝癌の病態と治療標的の解明、第 51 回日本肝臓学会総会、熊本、2015 年 5 月 21 日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 尚毅 (Oishi Naoki)  
金沢大学・医学系・協力研究員  
研究者番号：20507040