

「肝癌由来増殖因子のエピゲノミック制御による新規肝癌治療法の開発」

兵庫医科大学 内科学 肝・胆・膵科

榎本平之

1 研究の背景と目的

近年肝細胞癌に対する治療面の発展は著しく、局所療法が発達や手術の安全性の向上などにより、その予後は徐々に改善されつつある。しかしながら肝細胞癌は、依然として日本人の死亡率の上位に位置する疾患であり、肝細胞癌の発症およびその増殖に関するメカニズムの解明は重要な課題と考えられる。

我々は肝癌の増殖に関与する新たな因子を求め、完全無血清培地で増殖可能な肝癌細胞株 Huh-7 の培養上清より Hepatoma-derived growth factor (以下 HDGF と記す) を発見し、更にその cDNA のクローニングにも成功した。

我々は、HDGF が肝癌細胞に対する増殖促進作用を有することや、HDGF の発現レベルが肝臓癌手術後の患者の再発や予後の指標となることを示してきた。以上のことより HDGF は肝癌細胞の増殖に深く関与する因子と考えられ、HDGF の作用を明らかにすることは、肝細胞癌の病態究明に有用と考えられる。

本研究では、我々が見出した新規増殖因子 HDGF の肝癌細胞株に対する作用の解析を行い、肝癌細胞の増殖機構を明らかにすることを目指した。これまで遺伝子導入や発現抑制、またウエスタンブロット、レポーターアッセイなどで HDGF の機能解析を行ってきたが、本研究では新たにエピゲノミックな視点から microRNA に注目して HDGF の作用と発現制御の解明を行い、新たな肝細胞癌治療法の開発へつながる知見の獲得を目指した。

2 研究方法・研究内容

1) HDGF の肝癌増殖作用に関する解析

肝癌細胞株 SK-Hep1 および HepG2 細胞を用い、培養液に recombinant HDGF タンパク (100ng/mL) を添加して増殖刺激を加えた。その後 total RNA を抽出し、アレイシステムを用いて HDGF の作用によって誘導あるいは抑制される microRNA を同定した。

2) HDGF 抑制と Sorafenib の併用による肝癌増殖抑制の検討

我々は SK-Hep1 肝癌細胞を用い、HDGF の発現抑制で Sorafenib の肝癌増殖抑制効果を *in vitro* において増強しうる可能性を最近見出した。本研究では HDGF の発現抑制による Sorafenib の抗腫瘍効果増強が *in vivo* でも生じうるのか更に検討を行うこととした。そのため HDGF の発現を抑制した SK-Hep1 肝癌細胞株とコントロール (mock) 細胞をヌードマウスに移植し、5 週間から 2 週間連続で Sorafenib を投与して *in vivo* における腫瘍増殖抑制効果を比較した。

3 研究成果

1) HDGF の肝癌増殖作用に関する解析

上記の内容で HepG2 細胞および SK-Hep1 細胞に対して HDGF タンパクで刺激を与え、誘導される microRNA を同定した。HepG2 細胞および SK-Hep1 細胞は、いずれも肝癌由来の細胞として分類されるが、興味深いことに HDGF の刺激で変動する microRNA は大きく異なっていた。しかしながら HDGF の刺激によって 2 つの細胞株に共通して増加する

microRNA が 32 種 (図 1)、また共通して減少する microRNA が 2 種特定された (図 2)。これらの microRNA は、使用した細胞の種類に関係なく HDGF により誘導あるいは抑制されるものと考えられる。そのため HDGF によって増加した microRNA には肝癌増殖促進作用が、逆に HDGF によって低下した microRNA には肝癌増殖抑制作用が期待される。今後肝癌症例での測定などを通じ、その臨床的な意義を検討したいと考えている。

2) HDGF 抑制と Sorafenib の併用による肝癌増殖抑制の検討

上に記載した手順により HDGF の発現抑制による Sorafenib の抗腫瘍効果増強が *in vivo* でも生じうるのか検討を行った。Sorafenib 投与あるいは HDGF 抑制によって腫瘍増殖は抑制されていた。さらに Sorafenib 投与と HDGF 抑制を組み合わせることで、より強い腫瘍増殖の抑制が認められた (図 3)。

4 生活や産業への貢献および波及効果

多くの増殖因子がこれまでに報告されているが、日本で発見されたものは数少ない。HDGF は我々のグループにより見出されたものであり、本検討は高いオリジナリティを有する研究である。HDGF の作用機構は解明されつつあるものの未だ十分ではなく、今後も新たな発見・展開が大いに期待できる。現在 HDGF については世界の複数の研究室 (米国、ドイツ、台湾など) で解析されており、本研究で得られた知見は兵庫県から世界へ向けて発信される最先端の研究成果となった。

本研究では、肝細胞癌の増殖に関連する可能性を有する microRNA を同定した。したがって、将来的な肝細胞癌の予防や治療につながることを期待される。わが国ではウイルス性肝炎の患者が多いため、本成果は臨床的な貢献へとつながり得るものと思われる。

これまで多数の分子標的薬が開発されたが、残念ながら血管新生の主要因子である VEGF を標的とした Sorafenib 以外の開発は十分でない。本研究はこれまで薬剤開発の行われていない新規の増殖因子の作用と機能制御に関する検討であり、新たな治療法につながる可能性がある。また最終的に肝細胞癌の発症や再発の予測、新規治療開発に貢献する新知見の獲得も期待できる。

また近年 HDGF は腎臓、心・血管、肺、腸管といった種々の臓器における癌の増殖過程に関与することも報告されている。実際我々は胃癌、膵臓癌といった肝細胞癌以外の癌でも HDGF の発現レベルが、術後の再発および予後の指標となることを報告している。したがって、本研究は肝癌細胞株を用いた検討ではあるが、肝臓以外の臓器の癌の研究にも応用され得るものと思われる。すなわち本研究の成果は、幅広い臓器の癌研究に対して貢献できるものと考えられる。

図表

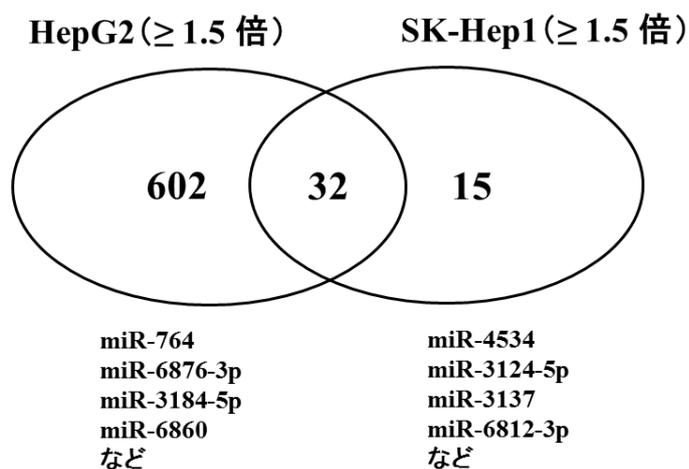


図 1 : HDGF による増殖刺激と microRNA の上昇

HDGF の添加によって肝癌細胞株で 1.5 倍以上に増加する microRNA を検索した。HepG2 細胞で 634 種、SK-Hep1 細胞で 47 種類が抽出され、うち 32 種類は共通していた。

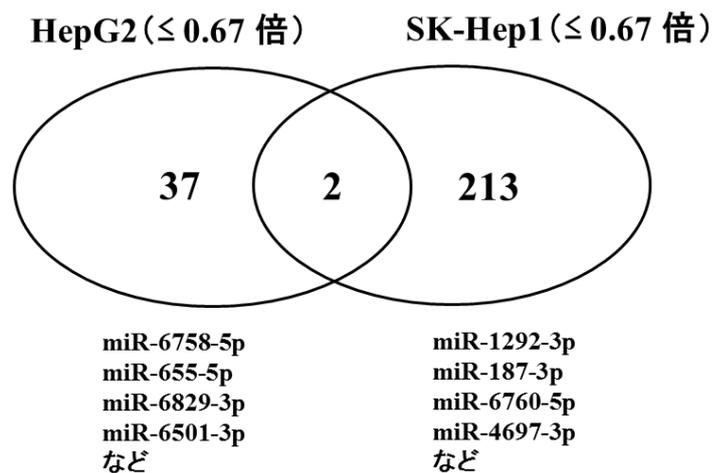


図 2 : HDGF による増殖刺激と microRNA の低下

HDGF の添加によって肝癌細胞株で 0.67 倍 (2/3) 以下となる microRNA を検索した。HepG2 細胞で 39 種、SK-Hep1 細胞で 215 種類が抽出され、うち 2 種類が共通していた。

腫瘍サイズ(%)

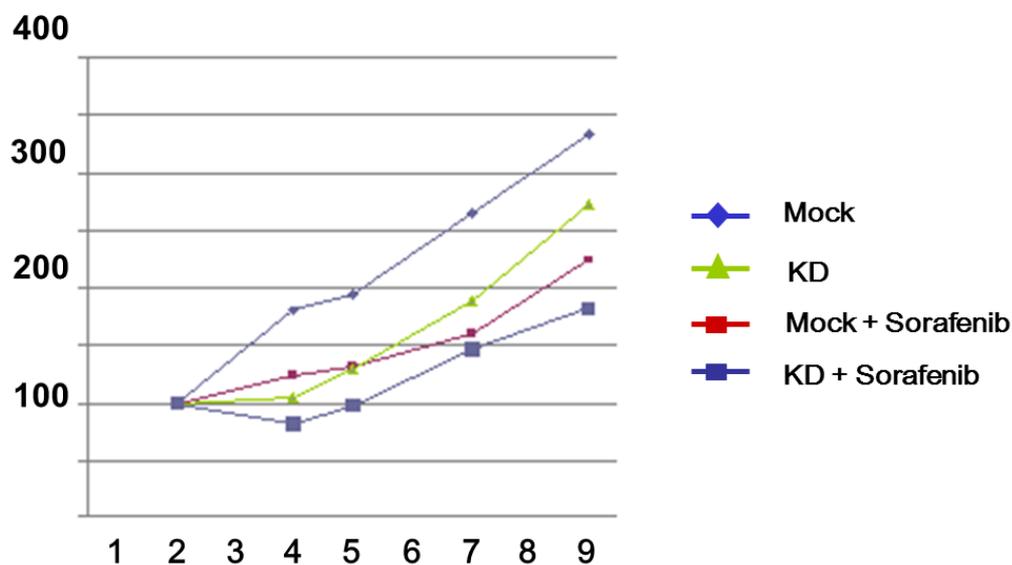


図3 : HDGF の発現抑制による肝癌増殖抑制

HDGF の発現を抑制した SK-Hep1 肝癌細胞株とコントロール (Mock)細胞をヌードマウスに移植し、Sorafenib を投与して *in vivo*における腫瘍増殖抑制効果を比較した。Sorafenib 投与あるいは HDGF 抑制によって腫瘍増殖は抑制されていた。さらに Sorafenib 投与と HDGF 抑制を組み合わせることで、より強い腫瘍増殖の抑制が認められた。なお投与開始時の腫瘍サイズを 100%として表示している。