

201125019A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

# ウイルス性肝疾患に対する 分子標的治療創薬に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

平成24 (2012) 年3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬  
に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成24（2012）年 3月

ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究

研究組織

<u>研究代表者</u>		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
<u>研究分担者</u>		
小原 道法	(財) 東京都医学総合研究所・感染制御プロジェクト	プロジェクト リーダー
菅 裕明	東京大学大学院理学系研究科・化学専攻	教授
深澤 征義	国立感染症研究所細胞化学部	室長
竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学	教授
宇都 浩文	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 消化器疾患・生活習慣病学	講師
前川 伸哉	山梨大学大学院医学工学総合研究部 肝疾患地域先端医療システム学講座	講師
村上 周子	名古屋市立大学大学院医学研究科	助教
堀本 勝久	独立行政法人産業技術総合研究所	研究チーム長

# 目 次

## I. 総括研究報告

ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究

金子 周一 ----- 1

## II. 分担研究報告

1. ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究

金子 周一 ----- 7

2. 高活性型siRNAを用いたウイルス性肝炎および肝がんに対する創薬研究

小原 道法 ----- 14

3. 特殊ペプチドを用いたC型肝炎ウイルスに対する創薬研究

菅 裕明 ----- 20

4. C型肝炎ウイルス産生に関与する宿主因子の探索と創薬への応用

深澤 征義 ----- 23

5. 肝がんにおけるマイクロRNA発現変化とアポトーシス耐性

竹原 徹郎 ----- 28

6. プロテオミクスによるウイルス性肝疾患のバイオマーカー探索と臨床的意義の検討

宇都 浩文 ----- 31

7. 血清RANTES濃度とHaplotypingを用いたC型肝炎治療反応性の検討	
前川 伸哉	35
8. B型肝炎ウイルス感染系を用いた抗線維化薬物の研究	
村上 周子	38
9. 分子標的創薬に向けた細胞内活性化ネットワークの推定研究	
堀本 勝久	41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	49

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
総括研究報告書

ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

**研究要旨：**本研究では、新たなウイルス性肝炎、肝がん治療薬の効果を予測する診断法を開発するとともに、ウイルス性肝炎の進展阻止、線維化阻止、発がん抑制を目指した核酸医薬、特殊ペプチド製剤の創薬研究を行っている。診断法の開発研究では、肝がん幹細胞マーカーであるEpCAMを用いた分類の前向きな予後解析を行った。また、新規にApoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) が背景肝の肝線維化を反映してHCC群で上昇することを明らかにした。肝炎の診断研究ではRANTESのハプロタイプによって治療反応性が規定されていることを示した。治療薬の開発ではEpCAMに高い親和性で結合することが可能な特殊ペプチドを作製し、ペプチドが細胞膜から細胞質へ移行すること、細胞質内のEpCAMのintracellular domainの分布異常および核移行を抑制していること、EpCAM陽性癌細胞の遊走浸潤活性を抑制することを同定した。また、*let-7*マイクロRNAの低発現がアポトーシス抑制性と関連するBcl-xLの高発現を誘導している可能性を示した。C型肝炎の治療創薬ではDDSを用いたsiRNAによる抗ウイルス効果を解析するとともに、HCV E2タンパク、およびClaudin-4に対するペプチドを作製した。肝線維症に対する創薬ではキメラマウスにHBVを感染させ、PEG-IFN $\beta$ および抗TLR4抗体の効果を検討した。細胞内ネットワークの解析では発現遺伝子情報から少数の実験検証候補の提案する方法の開発を行った。

#### A. 研究目的

B型(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)感染から肝硬変に進行、あるいは肝細胞がん(肝がん)を併発して死亡する患者数は我が国だけでも年間5万人に及ぶ。HBVに対して核酸アナログ製剤が使用されているが薬剤抵抗株の出現と長期間にわたる服薬が問題となっている。HCVに対してペグインターフェロン・リバビリン併用療法が行われてきているがHCVの排除が得られる率は5割

に過ぎず、新しいプロテアーゼ阻害剤も、その効果や副作用が問題となっている。ウイルス性肝炎では肝硬変にいたると発がん率が極めて高く、治療後の再発率も高い。国内外でHBVに対する新規核酸アナログ、HCVに対する新たなプロテアーゼおよびポリメラーゼ阻害薬、発がんあるいはがんの再発を抑える薬物の開発が進められている。しかし、患者による治療効果の違い、不十分な治療効果、重篤な副作用、および薬剤

抵抗性の出現が問題となっている。

本研究の目的は、新たなウイルス性肝炎、肝がん治療薬の効果を予測する診断法を開発するとともに、ウイルス性肝炎の進展阻止、線維化阻止、発がん抑制を目指した核酸医薬および特殊ペプチド製剤などの創薬研究を行うことである。

## B. 研究方法と研究結果

研究班として診断薬および創薬の候補分子を抽出し、その開発研究を行った。本年度はいくつかの分子が班の標的分子となり、その成果が示された。以下に研究者ごとに記載した。分担研究者の報告は、それぞれに分担研究報告書がつけられているため総括して記載した。

### ・研究代表者(金子周一)

がん幹細胞と、がん組織の維持、浸潤転移や抗がん剤抵抗性との関連が明らかになってきている。我々は肝幹細胞マーカーであるEpCAMを用いた新たな肝細胞癌分類システムを構築してきた。本年度はEpCAM分類の妥当性に関する前向きな予後解析を行い、特に全生存期間については既存のTNMステージやBCLCステージに比してより正確に肝切除術後の予後が予測されることを明らかにした。さらに、EpCAMに高い親和性で結合することが可能なペプチドがEpCAM陽性細胞に与える影響について、Confocal Time-Lapse Image解析を行い、EpCAM結合ペプチドはEpCAM陽性細胞の細胞膜から細胞質へ移行すること、細胞質内のEpCAMの intracellular domainの分布異常および核

移行を抑制していること、EpCAM陽性癌細胞の遊走浸潤活性を抑制することを同定した。

### ・研究分担者(小原道法)

C型肝炎および肝がんに対して核酸医薬のひとつであるsiRNA治療創薬を行っている。本年度はHCV遺伝子発現慢性肝炎発症トランスジェニックマウスを用いてsiRNA投与とエンドソームエスケープリポソームによるDDSを用いてHCV遺伝子発現を効果的に抑制でき、肝炎が正常化することを示した。EpCAMに対する高活性のsiRNAの探索と構築をするため、EpCAM mRNAをオーバーラップする4領域(R1, R2, R3, R4)に分割して、それぞれ400塩基長の2本鎖RNAを作成し、これまで開発を進めてきたDicerにより切断する方法を用いて研究を行った。

### ・研究分担者(菅 裕明)

HCVあるいは肝がんの新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指している。本年度は、金沢大学との共同研究でEpCAMペプチドを作製し解析を行った。また、HCVがヒト細胞に感染する際に重要に役割を果たすグライコタンパク質E2の化学合成、ならびに新規標的としてClaudin-4に対する特殊環状ペプチドの探索を行った。RaPIDシステムをバキュロウイルスに提示させた膜タンパク質を標的とした探索に応用した。

### ・研究分担者(深澤征義)

HCV生活環の特徴として細胞内脂肪滴や



脂質ラフトといった脂質と密接に関連した部位が重要な役割を果たしている。プロテオーム解析から、今回新たにC14orf166分子がHCV増殖に関与することを見出した。一方、遺伝学的手法を用いたHCV生活環に関与する宿主因子の探索も進めた。これまでに、HCV耐性を指標としてHCV生活環に必須であるCD81やClaudin1等が欠損した宿主細胞変異株の分離に成功した。CD81及びClaudin1を過剰発現したHuh7.5.1細胞にヒトshRNAレンチウイルスライブラリーを導入した細胞群を樹立し、これを親株としてHCV耐性宿主変異株の分離を行った。PI4KIII $\alpha$ 、MafB等の欠損株が分離され、これら分子のHCV生活環への関与が明らかとなった。

#### ・研究分担者(竹原徹郎)

肝がんにおけるBcl-xLの発現増強にマイクロRNAが関与しているかどうかを検討し、Bcl-xLの発現を抑制する可能性のあるマイクロRNAとして*let-7*が抽出された。*Let-7*のトランスフェクションにより肝がん細胞株のスタウロsporin誘導性アポトーシスが促進された。ヒト肝がん試料において*let-7*が低発現している肝がん組織ではBcl-xLの発現が亢進していた。肝がんではBcl-xLが高発現するメカニズムとして*let-7*マイクロRNAの低発現が関与していることが示された。

#### ・研究分担者(宇都浩文)

肝がんを合併したHCV関連慢性肝疾患患者の血清中にApoptosis Inhibitor of

Macrophage (AIM、別名CD5もしくはSp $\alpha$ )が高濃度に存在する事を見出した。HCC群のAIM値は非HCC群より有意に高値であった。AIMの肝がん判別能 (ROC曲線のAUC;0.77)はAFP(0.82)やPIVKA-II (0.73) とほぼ同等であった。一方、HCC群のAIM値はAFPやPIVKA-IIとは相関せず、血小板と有意に逆相関し、非HCC群では肝線維化の進行とともにAIM値は増加した。

#### ・研究分担者(前川伸哉)

治療開始前血清中RANTES濃度がPEG-IFN+RBV併用療法の反応性に関連することを報告してきた。本年度は症例数を増やしてこれまでの結果を検証するとともに、RANTESプロモーター部分を含むRANTESゲノムのSNPとPEG-IFN+RBV併用療法の反応性について検討し、治療反応性はRANTESゲノムのハプロタイプによっても規定されることを明らかとした。

#### ・研究分担者(村上周子)

HBV感染による肝線維化発症メカニズムの解析を目的として、HBVを感染させたヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた検討を行った。キメラマウス(10週齢以上)にHBV genotype C (HBV/C, 10<sup>5</sup> copies)を接種した。感染確認後、ヒト型またはマウス型 PEG-IFN $\beta$ 、あるいは抗TLR4抗体をそれぞれ投与した。

#### ・研究分担者(堀本勝久)

予後データや検体サンプル背景などの表現型データから分子機能を推定する新規方

法のプロトタイプを開発し、新規診断および治療薬開発により直接的に関連する分子機能の特定を試みた。遺伝子発現データのみの解析により、解析における表現型指向の性能についてテストを行った。非環式レチノイド投与に関する遺伝子発現サンプルについて表現型指向解析法を適用し、非環式レチノイド投与後の再発に関与する遺伝子セット及びそのセットに含まれる主要遺伝子を同定した。既知の知識を利用した絞り込みによって少数実験検証候補の提案の可能性を示すことができた。

#### D. 考察

研究班として、EpCAM、AIM、RANTESという3つの診断の候補分子が絞られ、その臨床的価値が明らかになりつつある。また、治療の標的分子についてはHCVおよびEpCAMおよびlet-7を標的分子とした。既に有用な核酸医薬と特殊ペプチドが得られており、動物において効果を示しており、研究計画は予定よりも良好な進捗を示している。また、ウイルス生活環を標的として分子が抽出された。

以下に、今後の計画を研究者ごとに記載した。

##### ・研究代表者(金子周一)

現在用いられている TNM や BCLC は癌の進展度や肝予備能力を反映しているが、癌の悪性度は考慮されておらず、このことが EpCAM/AFP 分類では反映されているために予後予測がより有効に行われているものと考えられた。

EpCAM 結合環状特殊ペプチドが HpSC-HCC 培養細胞に与える影響を検討、EpCAM ペプチドが EpICD を介して細胞の遊走浸潤を抑制している可能性が示唆された。HpSC-HCC は門脈浸潤傾向が高いことが予後不良に直結しており、EpCAM ペプチドは門脈浸潤を抑制する、新しいクラスの抗悪性腫瘍薬として重要な候補と考えられた。

##### ・研究分担者(小原道法)

dicerによるdsRNA切断部位を同定することで、非常にRNAi活性の高いsiRNAを作製できることが示された。これにより、高いRNAi活性をもつsiRNAと高効率DDSを組み合わせることにより、臓器レベルでの遺伝子発現抑制を可能にした。

##### ・研究分担者(菅 裕明)

抗 Claudins 環状特殊ペプチドについては、現在クローンをディスプレイした系においてはその結合が確認されたので、今後化学合成を行い、阻害活性を確認する予定である。

##### ・研究分担者(深澤征義)

C14orf166はRNA代謝関連過程(RNA複製など)、複製、さらには病原性との関連があるかもしれない。C14orf166分子はHCVコア蛋白質との相互作用を介して脂肪滴画分にリクルートされていることが考えられ、ウイルス産生におけるC14orf166とHCVコア蛋白質の相互作用や脂肪滴局在の重要性についてさらに検討を行いたい。PI4KIII $\alpha$ 、MafBについても、今後、薬標的としての有

用性をさらに検討したい。

#### ・研究分担者(竹原徹郎)

我々は Bcl-xL が肝がんにおいて機能亢進するメカニズムのひとつとして脱アミド化の抑制が関与することを報告したが (Takehara T, et al., Cancer Res 2003)、発現亢進についてはマイクロ RNA が関与することを明らかにした。

#### ・研究分担者(宇都浩文)

AIM は、マクロファージのアポトーシスを抑制するとともに、脂肪酸合成酵素の機能を抑制することにより脂肪細胞の脂肪滴を融解する。また、CD36 を介して、AIM が幼若な脂肪前駆細胞の成熟を妨げ、抗肥満作用を有することが報告されている。

AIM は HCC の新しい診断マーカーとしての臨床応用が期待できる。さらに、HCC 群の AIM 濃度は HCC の無い慢性肝疾患における AIM 値と比較して非常に高値となっていたことから、HCC 群における AIM 値の上昇には肝線維化とは関連しない上昇機序も存在する可能性があり、今後のさらなる検討が必要である。

#### ・研究分担者(前川伸哉)

血清 RANTES 濃度は他の治療抵抗因子である HCV NS5A や core のアミノ酸変異、IL-28B SNP などを入れて多変量解析を行っても独立した因子として抽出され、従来知られている治療関連因子とは異なる機序で治療反応性を規定している可能性が考えられた。今後、臨床的な応用として、治療

開始前 RANTES を調べることで、治療反応性をより正確に予測できることが考えられた。

#### ・研究分担者(村上周子)

キメラマウスを用いた HBV 肝線維化誘発モデルは、このマウスが免疫不全であることから免疫抑制下での肝線維化メカニズムの解明につながる。薬剤による長期間での試験を行うことで、線維化に与える因子や、関連する経路を同定し、病因の解明をめざす。

#### ・研究分担者(堀本勝久)

表現型から分子機能を推定する新規方法によって探索された候補遺伝子の検証は最終的には実験検証が必要である。今後さらに炎特異的活性化ネットワークを同定する。

### E. 結論

本年度は計画通りに初年度に抽出した分子に対して診断法の開発研究と創薬研究を実施した。最終年度にはスクリーニングを終了し、ヒトにおける診断薬としての可能性を明らかにするとともに、当初の計画通り動物における治療効果の可能性を示すことができると考えている。

とりわけ、EpCAM に対する診断および創薬の研究は良好な進捗を示しており、国際的にも独創的で有力な開発研究の成果が期待される。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

各分担研究報告書を参照。

## H. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特になし

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

ウイルス性肝疾患に対する分子標的治療創薬に関する研究

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

**研究要旨：**肝細胞癌は我が国における第3の癌死亡原因であり、多くがB型もしくはC型肝炎ウイルス感染による慢性肝炎、肝硬変を背景に発症する難治性の癌である。近年癌細胞の一部に幹細胞性を有する癌細胞（癌幹細胞）が存在し、癌組織の維持、浸潤転移や抗癌剤抵抗性に深くかかわっているという仮説、癌幹細胞仮説が注目を集めている。我々はこれまでに肝幹細胞マーカーであるEpCAMとAFPを用いた新たな肝細胞癌分類システムを構築し、EpCAM陽性AFP陽性肝癌は若年発症、門脈腫瘍浸潤、予後不良を呈し、EpCAM陽性癌幹細胞が存在することを明らかにした。本年度はEpCAM/AFP分類の妥当性に関する前向きな予後解析を行い、特に全生存期間については既存のTNMステージやBCLCステージに比してより正確に肝切除術後の予後が予測されることを明らかにした。さらに、EpCAMに高い親和性で結合することが可能なペプチドがEpCAM陽性細胞に与える影響について、Confocal Time-Lapse Image解析を行い、EpCAM結合ペプチドはEpCAM陽性細胞の細胞膜から細胞質へ移行すること、細胞質内のEpCAMのintracellular domainの分布異常および核移行を抑制していること、EpCAM陽性癌細胞の遊走浸潤活性を抑制することを同定した。EpCAM陽性癌幹細胞は高い腫瘍形成浸潤能力や抗癌剤抵抗性を認めており、本年度の研究成果からはEpCAM結合特殊環状ペプチドを用いた癌幹細胞を標的とした新規診断治療法の開発につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝細胞癌は全世界で年間約62万人が罹患する第3の癌死亡原因である。肝細胞癌の殆どはB型もしくはC型慢性肝炎、肝硬変を背景に発症する。肝発癌のメカニズムとしてはウイルス蛋白そのものに加えて、繰り返す壊死、炎症、再生過程を背景に遺伝子異常が蓄積され、前癌病変から高分化型肝癌、進行肝癌へと進行していくと考えられている。この過程において異常をきたす

様々な遺伝子・蛋白異常が報告されているが、全体像については未だ不明な点が多い。

近年、血液癌や一部の固形癌において幹細胞様の特徴を示す細胞群（癌幹細胞）の存在が明らかになり、癌の維持、転移や治療抵抗性のメカニズムに深く関わっている可能性が示唆されている。肝細胞癌においてもいくつかの幹細胞マーカーを用いた癌幹細胞の分離が行われ、免疫不全マウスを用いた検討で強い腫瘍形成能力と自己複製能

力、非対称性分裂能力を有していることが報告されている。さらに、癌幹細胞は従来用いられている抗癌剤や放射線療法に対して高い抵抗性を有し、癌治療後の再発への関与が示唆されていることから、癌治療における重要な標的として認識されている。

最近我々は肝幹細胞マーカーである EpCAM と AFP を用いることで肝細胞癌を幹細胞タイプと肝細胞タイプに分類する方法を確立、発症年齢や Wnt シグナル活性の違い、肝切除後の予後など腫瘍としての特徴が大きく異なることを見出した。特に EpCAM 陽性細胞は幹細胞タイプの肝細胞癌において癌幹細胞の特徴を有し、抗癌剤抵抗性を呈することから、肝細胞癌治療における重要なターゲットと考えられる。

本年度の研究において、我々は EpCAM と AFP を用いた肝細胞癌分類が患者の予後予測における有用性につき前向きに検討した。さらに、EpCAM 陽性細胞に特異的に結合することが可能な環状特殊ペプチドが癌細胞に与える影響について、培養細胞および Confocal Time-Lapse Image 解析を用いて *in vitro* で評価した。

## B. 研究方法

サンプル 金沢大学附属病院で 2008 年から 2011 年 8 月にかけて肝切除が行われた 70 例の肝細胞がんとその背景肝組織を解析に用いた。培養細胞は HuH7、HuH1、Hep3B、HLE、HLF、SK-Hep-1 細胞を用い、DMEM-10%FBS 培地で培養した。

免疫組織化学 手術時に採取された手術標本の一部をホルマリン固定し、EpCAM の

発現を免疫組織化学で評価した。クエン酸バッファーを用いて抗原賦活を行った後に、EnVision+キット (DAKO)、抗 EpCAM 抗体 VU1D9 (Merck Chemicals) で免疫染色を施行した。陽性細胞数を腫瘍部の 4 か所で測定し、5%以上陽性細胞が存在するケースを EpCAM 陽性と診断した。

予後評価 外科切除時に採取された肝細胞癌組織について免疫染色を行い、EpCAM 陽性細胞数が 5%以上認められるものを EpCAM 陽性肝癌、血清 AFP が 300ng/ml 以上のサンプルを AFP 陽性肝癌と規定した。切除サンプルは EpCAM 陽性 AFP 陽性の幹細胞様肝癌 (HpSC-HCC)、EpCAM 陽性 AFP 陰性の胆管細胞様肝癌 (BDE-HCC)、EpCAM 陰性 AFP 陽性の前駆細胞様肝癌、EpCAM 陰性 AFP 陰性の肝細胞様肝癌 (MH-HCC) のいずれかに分類した。分類後に再発の有無、死亡の有無を約半年に一度前向きに評価を行った。

蛍光免疫染色および Confocal Time lapse Image 解析 FAM を結合した特殊ペプチドは東京大学大学院理学系研究科生物有機化学教室、菅裕明教授からご供与いただいた。チャンバースライド上に細胞を培養した後に Dil で蛍光標識を行い、1  $\mu$ M の濃度でペプチドを投与した後に Andor iQ システムおよび 37 度加温 5%CO<sub>2</sub> chamber 内で細胞を培養し、経時的に観察を行った。また、ペプチドが細胞内外の EpCAM の分布に与える影響については細胞外ドメイン (EpEX) および細胞内ドメイン (EpICD) に特異的に結合する抗体 (Santa Cruz Biotechnologies) を用いて解析した。

細胞遊走浸潤解析 細胞の遊走浸潤能の評価にはマトリゲルチャンバーおよびコントロールチャンバーを用い、無血清培地、10% FBS 培地および HuH7 を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

サンプルを提供する患者には、研究内容の説明及び研究協力への依頼につき説明文書を用いて説明し(①遺伝子、転写産物、蛋白発現解析について、②研究の目的・方法、③研究用サンプルを提供することに伴う危険性及び利益、④同意撤回及びサンプルの廃棄、⑤プライバシーの保護及び機密保持、⑥経済的な利益等の項目)、研究協力への同意が得られた患者のサンプルを解析に用いた。

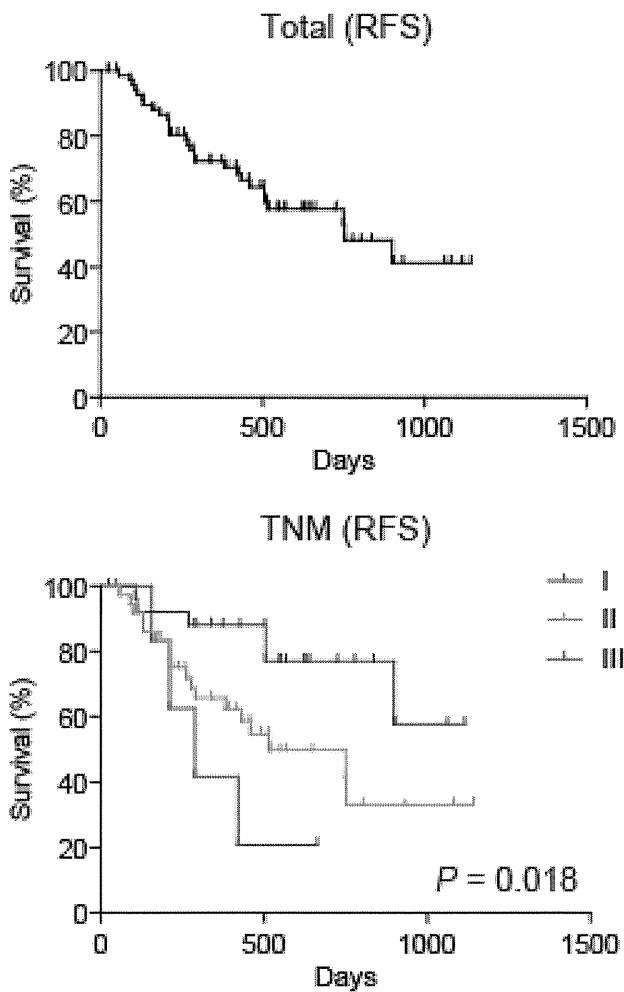
個人に関する情報の保護と管理は、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行った。連結可能匿名化後、金沢大学大学院医学系研究科環境医科学専攻恒常性制御学講座にて個人情報分担管理者の管理の下保存、データは研究室に設置した専用コンピュータにて一括管理し、データアクセスは研究従事者がパスワードを用いて行った。

### C. 研究結果

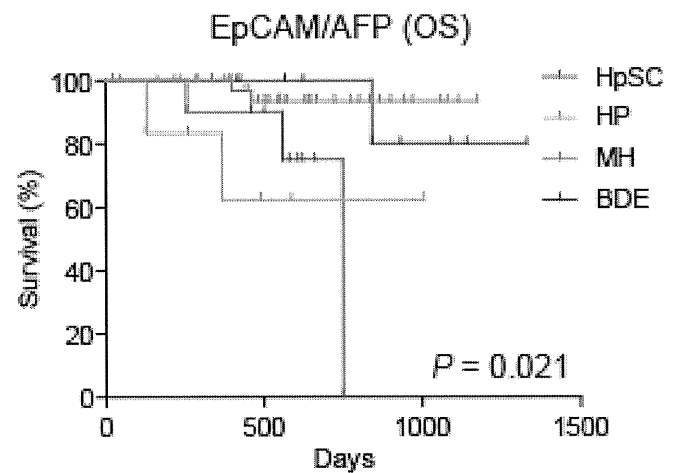
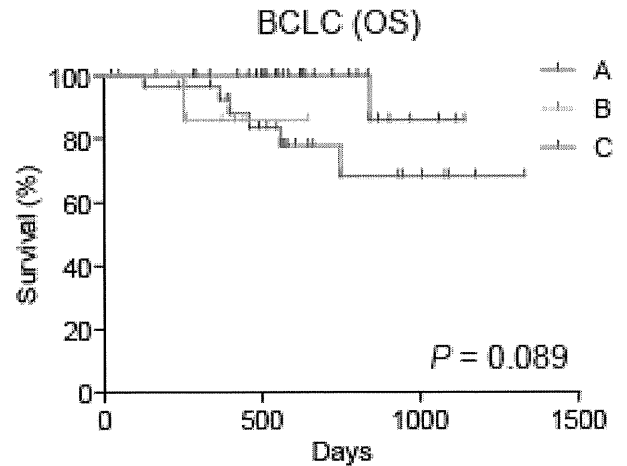
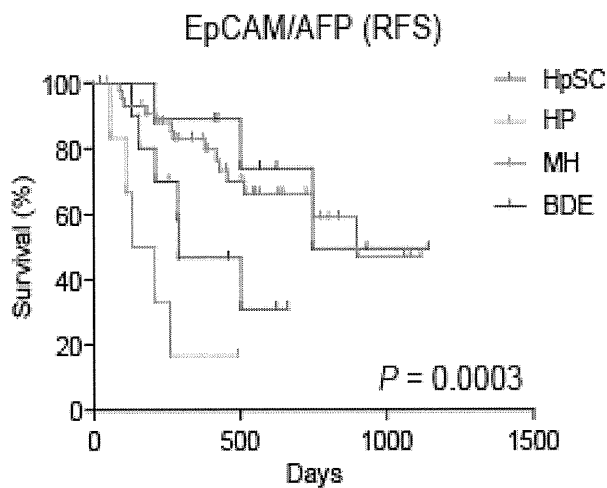
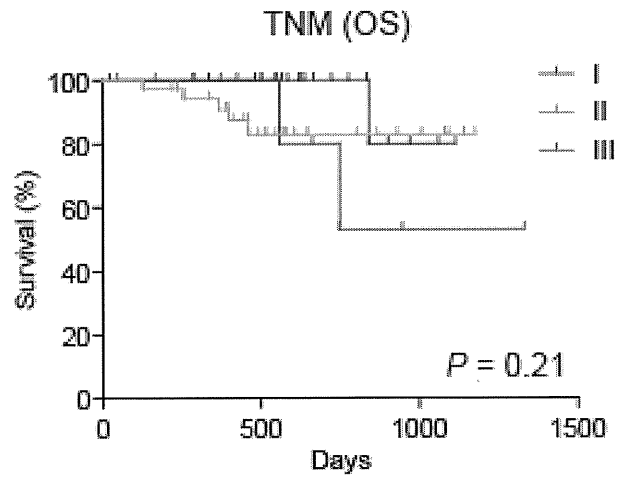
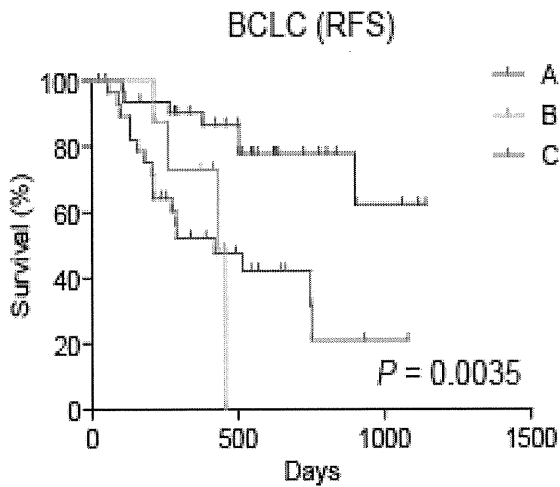
2008年から2011年8月までに肝切除が行われた肝細胞癌 70 サンプルについて EpCAM/AFP 分類を行ったところ、EpCAM が 20 例陽性、AFP が 16 例陽性であり、HpSC-HCC 10 例、BDE-HCC 10 例、HP-HCC 6 例、MH-HCC 44 例であり、MH-HCC が約 63%と最

も多く、既報の 45%に比べ比率が高い傾向であった (Yamashita et al, Cancer Research 2008)。次いで、2011年12月まで経過観察を行った後に生存や死亡、再発の有無につき検討を行ったところ、70例中 28 例が再発、8 例が死亡していた。無再発生存の中央値が 752 日、全生存率については未だ中央値が規定できない状態であった。無再発生存率については TNM、BCLC、EpCAM/AFP 分類ともに予後に統計的に有意に相関が認められたが、特に EpCAM/AFP 分類で予後に差が認められた (図 1)。

図 1 無再発生存率

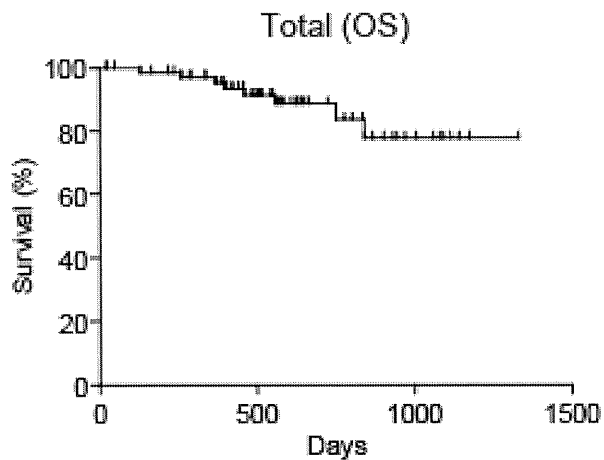






一方全生存率についてはTNM、BCLCでは予後に有意差が認められず、EpCAM/AFP分類でのみ有意差が認められた (図2)。

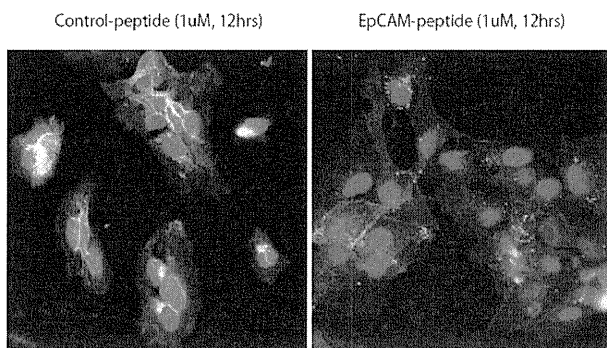
図2 全生存率



次いで、予後不良のHpSC-HCCに対する新規治療法開発の一環として行っている、EpCAMに対する環状特殊ペプチドがHpSC-HCCに与える影響について評価を行った。EpCAM環状特殊ペプチドをHpSC-HCCに属する培養細胞であるHuH7に投与しConfocal

Time lapse Image Analysisで解析したところ、12時間後には細胞質内にEpCAMペプチドが取り込まれていることが明らかになった。そこで、EpCAM結合ペプチドがEpCAMの細胞外ドメイン(EpEX)および細胞質ドメイン(EpICD)に与える影響を蛍光免疫染色で解析したところ、EpCAM結合ペプチドはコントロールペプチドに比べて投与12時間後でEpICDの凝集を引き起こし、EpICDの核への移行を阻害していることが判明した(図3)。

図3 蛍光免疫染色



赤:EpICD、緑:EpEX、青:核

更に、コントロールペプチドに比べEpCAM結合ペプチドは細胞の遊走、浸潤とともに抑制した(図4、5)。

図4 細胞遊走試験

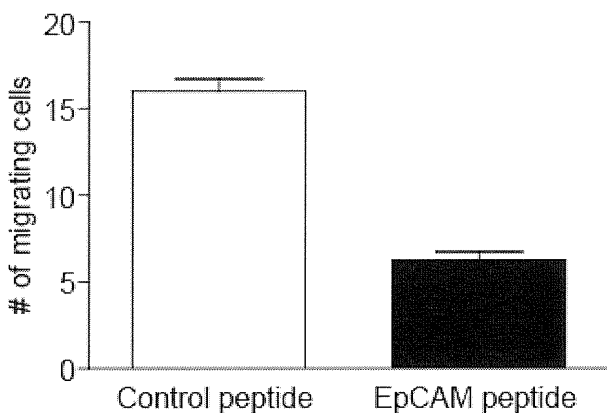
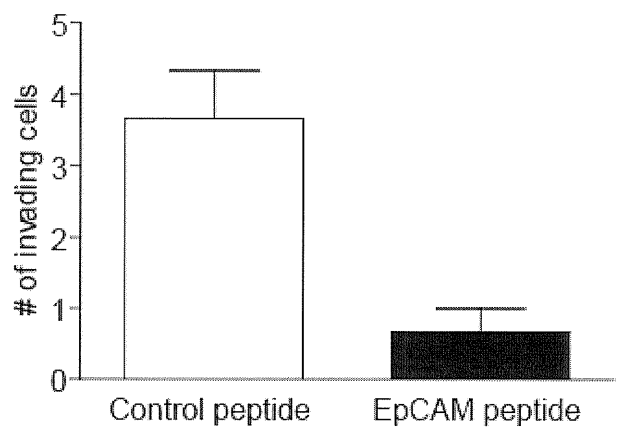


図5 細胞浸潤試験



#### D. 考察

現在の肝細胞癌診療は末梢血液を用いた腫瘍マーカー測定と造影剤を用いた主に癌部における血流変化を指標とした画像診断が用いられている。この方法では腫瘍マーカーを産生する癌や血流変化をきたす癌の検出は可能であるが、癌細胞そのものの動態を捉えているわけではなく、かつ悪性度を評価するには限界がある。一方マイクロアレイをはじめとする遺伝子や蛋白発現の網羅的解析は癌そのものを対象とし、かつその生物学的悪性度を評価するには理想的な方法である一方、再現性や組織処理の問題などクリアできていない問題が未だ存在する。これまでに我々はEpCAMとAFPという2つのマーカーを用いることで肝細胞癌の悪性度評価が可能であることを提唱してきたが、本年度の前向き研究においてこの分類が既存のTNMやBCLCに比べて、特に全生存を予測するのに有用であることを確認した。現在用いられているTNMやBCLCは癌の進展度や肝予備能力を反映しているが、癌の悪性度は考慮されておらず、

このことが EpCAM/AFP 分類では反映されているために予後予測がより有効に行われているものと考えられた。さらに、このような悪性度の高い HpSC-HCC に対する有用な診断治療法の確立を目指し、EpCAM 結合環状特殊ペプチドが HpSC-HCC 培養細胞に与える影響を検討、EpCAM ペプチドが EpICD を介して細胞の遊走浸潤を抑制している可能性が示唆された。HpSC-HCC は門脈浸潤傾向が高いことが予後不良に直結しており、EpCAM ペプチドは門脈浸潤を抑制する、新しいクラスの抗悪性腫瘍薬として重要な候補と考えられた。

#### E. 結論

EpCAM/AFP 分類は本邦における肝細胞癌の予後予測分類として有用であることが、前向き研究から明らかになった。EpCAM 結合環状特殊ペプチドは腫瘍の血管浸潤を抑制する新しいクラスの抗悪性腫瘍薬として重要な候補と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamashita T, Honda M and Kaneko S. Differentiation of Cancer Stem Cells. In Stanley Shostak (eds): "Cancer Stem Cells - The Cutting Edge" InTech pp337-350, 2011.
- 2) Yamashita T, Honda M and Kaneko S. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. J Gastroenterol Hepatol. 26(6):960-4, 2011.

- 3) Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, and Kaneko S. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 129(7):1576-85, 2011.
- 4) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, and Kaneko S. Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. Clin Exp Immunol. 163(2):165-77, 2011.

##### 2. 学会発表

- 1) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Nio K, Hara Y, Wang XW, and Kaneko S. Distinct liver cancer stem cells defined by EpCAM and CD90 in human hepatocellular carcinoma. American Association of Study of Liver Diseases Annual Meeting 2011, San Francisco, U.S.A., 2011.
- 2) Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Cancer Stem Cells in Hepatocarcinogenesis. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference 2011, Jeju, Korea, 2011.
- 3) 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞形質の多様性、日本臨床腫瘍学会総会、横浜、2011
- 4) 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞の特徴に応じたテーラーメイド

医療の検討、日本肝臓学会総会、東京、  
2011

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし