

201227003A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

平成25 (2013) 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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成25（2013）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        | 公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野  | 副参事研究員 |
| 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        | 山梨大学医学部肝疾患地域先端医療システム学講座      | 特任講師   |
| 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・生命情報工学研究センター | 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 ----- 17

### 4. C型肝炎ウイルス産生に関与する宿主因子の探索～細胞内コリンの重要性～

深澤 征義 ----- 20

### 5. 肝がんのアポトーシス耐性におけるマイクロRNAの関与

竹原 徹郎 ----- 24

### 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 ----- 26

|   |       |    |
|---|-------|----|
| 7. ウイルス肝炎の治療反応性・病態進展における新規バイオマーカーの検索<br>前川 伸哉 | ----- | 29 |
| 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<br>村上 周子          | ----- | 32 |
| 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<br>堀本 勝久       | ----- | 35 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                           | ----- | 39 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷                               | ----- | 43 |

## 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

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た。肝幹細胞マーカーであるEpCAMとCD90陽性肝癌との関係が示された。このEpCAMに強い結合を示すペプチド製剤が作製され、細胞および動物に対する作用が示された。また、それを表面にもつデリバリー医薬品候補が作られた。EpCAMに対する強力なsiRNAも作製され、このデリバリー医薬品候補に導入することに成功した。HCVの生活環にかかわる脂質と関連する分子を探索し複製を阻害する候補の検討を行った。肝癌のアポトーシスに係わるBcl-xLを標的にするマイクロRNAとしてlet-7マイクロRNAが同定され作用が示された。診断開発としてC4断片がHCV感染と関連するマーカーであることが明らかとなった。HBV感染モデルにおいてTLR4が線維化の主な要因である可能性が示唆された。さらに、新規診断および治療薬開発に直接的に関連する分子signatureを特定する方法が開発された。

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・リバビリンを中心とする併用療法が行われてきたが、HCVの排除が得られない例も多く、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. 研究方法と結果および考察

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。

(倫理面への配慮)

各種の倫理指針を遵守して研究を実施した。

・研究代表者(金子周一)

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。本年度において、別の癌幹細胞マーカーであるCD90陽性細胞の特徴につき解析し、CD90陽性細胞はEpCAM陽性細胞と独立して存在すること、間葉系細胞の形質を有すること、TGF-betaを産生しEpCAM陽性細胞の遠隔転移を誘導すること、imatinib mesylateに感受性を示すことなどを同定した。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解析を行い、EpCAM結合ペプチドは細胞質内のEpCAMのintracellular domainの分布異常および核移行を抑制しc-Mycの発現を抑制すること、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。さらにこのペプチドを<sup>111</sup>Inで標識しマウスに投与を行い、その体内動態について検討を行った。これらの研究成果から、EpCAM結合特殊環状ペプチド

およびimatinib mesylateが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。

・分担研究者(小原道法)

EpCAM陽性癌幹細胞に極めて高い特異性と治療効果を生み出しうる新規医薬品を開発するために、まずDicer切断同定法によって高活性siRNAを作成した。さらに、開発した核酸の導入効率を飛躍的に高めたエンドソームエスケープリポソーム(DDS)を用いてEpCAM陽性肝がん幹細胞を標的とするドラッグデリバリー系(DDS)を構築した。長鎖の2本鎖RNA(dsRNA)をDicerにより切断し、産生されたsiRNAの混合物(Diced-siRNAs)が高いRNAi活性を持つことを認めた。Diced-siRNAs切断部位から推測して作製したsiRNAのRNAi効果を検討した結果、非常に高いRNAi活性をもつものが同定された。そこで、肝がん幹細胞マーカーであるEpCAMに対する高活性のsiRNAの探索と構築を試みた。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Dicerにより切断した。dicer hunting siRNAを12種類作成した。このうちの1種類は数pMでHep3B細胞のEpCAMを効率よくノックダウンできることが示され、超高効率siRNAの作成に成功した。さらにsiRNAを効率よく肝臓に導入するためのDDSとしてpH感受性のエンドソームエスケープリポソームの検討を行った。

・分担研究者(菅 裕明)

RaPIDシステムを駆使し、C型肝炎ウイルス



スあるいは肝癌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。本研究期間に、肝臓がん幹細胞に強発現されているEpCAMに強力に結合するリガンド、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ならびにClaudinタンパク質に結合するリガンド特殊環状ペプチドを発見し、それらの応用研究を進めた。

・分担研究者（深澤征義）

網羅的解析手法および遺伝学的解析手法の2つのアプローチにより創薬標的となり得る宿主因子の同定を目指してきている。細胞内脂肪滴や脂質ラフト、網状膜構造といった脂質と密接に関連した部位がHCV生活環に重要な役割を果たしていることがわかってきており、本年度はこれら脂質・脂質代謝関連代謝物に特に注目し、メタボローム解析の結果を利用したHCV産生に関与する宿主因子の探索を行った。HCV持続感染細胞を用いた比較メタボローム解析の結果から、持続感染細胞では細胞内コリン含量が顕著に上昇していることが見出された。そこで様々な検討を行った結果、培地中からコリンを除去すると、HCV産生が顕著に抑制されることが明らかとなった。また、細胞内へのコリン取り込み阻害剤を用いた検討から、細胞内へのコリンの取り込みがHCV産生に重要であることが強く示唆された。さらに、各種コリントランスポーターの関与を検討した結果、CTL1を介したコリンの取り込みがHCV産生に重要であることが明らかとなった。

・分担研究者（竹原徹郎）

本研究ではBcl-xLの高発現のメカニズムとしてマイクロRNAによる転写後調節に焦点をあてて、研究を行った。肝がんにおけるBcl-xLの発現増強のメカニズムとしてマイクロRNAの関与について検討した。前年度までの研究により *in silico* 解析およびチップによる網羅的解析を行うことによりBcl-xLを標的にするマイクロRNAとして *let-7* マイクロRNAを同定し、肝がん細胞において *let-7* がBcl-xLの発現を抑制していることを明らかにした。またヒト肝がんの手術標本において *let-7* が低発現している症例では、対照に比し有意にBcl-xLの発現が亢進していた。そこで、肝がん治療時におけるBcl-xLの機能について解析を行った。ソラフェニブにBcl-xL阻害剤であるABT-737を併用することにより肝がん細胞株のアポトーシスが促進され、Bcl-xLのソラフェニブ治療抵抗性への関与が示された。また *let-7* が低発現である肝がん細胞株に *let-7* を導入したところ、ソラフェニブによる抗腫瘍効果が増強された。肝がんで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、治療の標的となりうることが示唆された。

・分担研究者（宇都浩文）

補体C4断片化とHCV由来蛋白との関連について検討することを目的とした。補体C4とNS3/4Aプロテアーゼを混合すると、約17kDaと15kDaの蛋白断片が検出され、このC4断片出現は、セリンプロテアーゼ阻害剤（VX-950）により抑制された。また、感作

羊赤血球を用いた溶血試験にて、NS3/4Aプロテアーゼは濃度依存的にC4活性を低下させ、この活性低下はVX-950により阻害された。以上のことから、HCV NS3/4AプロテアーゼはC4を切断することにより、補体の活性化を阻害し、宿主免疫応答を減弱させることで持続感染を維持する可能性があると考えられた。

・分担研究者（前川伸哉）

HCVによる肝発癌に関連するSNPとしてMICAとDEPDC5が報告された。しかしながらMICAとDEPDC5の本来の分子機能については解明されておらず、肝発癌マーカーとしての両SNPの有用性について未だ十分な追試・検討はされていない。さらにこれらのSNPの有無とC型慢性肝炎の臨床像がどのように関与しているのか、まったく知られていない。2011年度までにPEG interferon (PEG-IFN) +ribavirin (RBV) 併用療法における治療効治療反応性規定因子としてRANTESの有用性を明らかとしてきた。最終年度である2012年度は、近年肝発癌への関与が報告されたヒトゲノムの領域MICA・DEPDC5 SNPsに注目し、両SNPの肝病態進展におけるバイオマーカーとしての意義について、SNPの有無ごとの肝疾患の臨床的特徴、また実際の肝発癌への関与について検討した。

・分担研究者（村上周子）

ヒト肝細胞キメラマウスにHBVを感染させることで、HBVが肝組織に与える傷害性、特に肝線維化に関して検討を行っている。キメラマウス（10週齢以上）にHBV

genotype C (HBV/C,  $10^5$  copies) を接種し、感染確認後に抗ヒトまたは抗マウスTLR4抗体をそれぞれ16週間投与した。その結果、抗マウスTLR4抗体を投与したマウスの肝組織像のみ肝線維化の抑制傾向が認められた。一方、抗ヒトTLR4抗体により線維化は抑制されなかったことから、抗マウス抗体により中和されたのはマウス由来非実質細胞のTLR4であることが考えられる。以上より、キメラマウスHBV感染モデルにおいて、TLR4が線維化の主要因である可能性が示唆された。

・分担研究者（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改良し、新規診断および治療薬開発に直接的に関連する分子signatureの特定を試みた。新規改良法は、プロトタイプでの表現型の相異に関与するパスウェイの同定に加え、それらから分子signatureを抽出することができる。本年度は、プロテオミクスデータの解析により、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。具体的には、肺がん細胞株41種について、細胞表面、細胞溶液、細胞質の3か所のタンパク質量分布データについて表現型指向解析法を適用し、EGFR及びK-RASにおける突然変異の有無に関するサンプルの相異を表現する、それぞれ75、78のタンパク質セットを同定した。さらに、これらタンパク質セットも基づき予後データに関する生存解析を行った結果、共に有意確率0.001以下を得た。この結果は、これらタンパク質セットがEGFR及びK-RASに

における突然変異に関するサンプル間の相異を代表するだけでなく、突然変異の有無が関与する予後予測のマーカーセットとして有効であることを示している。

### C. 結論

本年度は研究の最終年度であった。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。また、診断法の開発についても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した。動物における治療効果の可能性を示すことができた。

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、肝癌幹細胞の標的分子に対する極めて高い結合を示す医薬品候補が作製され、その特徴を示すことができた。国際的にも独創的で有力な開発研究が実施できた。

### D. 健康危険情報

なし

### E. 研究発表

各分担研究報告書を参照。

### F. 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。本年度において、我々は別の癌幹細胞マーカーであるCD90陽性細胞の特徴につき解析し、CD90陽性細胞はEpCAM陽性細胞と独立して存在すること、間葉系細胞の形質を有すること、TGF-betaを産生しEpCAM陽性細胞の遠隔転移を誘導すること、imatinib mesylateに感受性を示すことなどを同定した。また、我々は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解析を行い、EpCAM結合ペプチドは細胞質内のEpCAMのintracellular domainの分布異常および核移行を抑制しc-Mycの発現を抑制すること、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。さらにこのペプチドを<sup>111</sup>Inで標識しマウスに投与を行い、その体内動態について検討を行った。これらの研究成果から、EpCAM結合特殊環状ペプチドおよびimatinib mesylateが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。一方EpCAM陽性細胞単独ではマウス皮下移植モデルにおいて遠隔転移能力を示さないにも関わらず、実際のヒト肝癌肺転移組織ではEpCAM陽性細胞が認められることから、EpCAM陽性細胞を転移させる何らかの機序が存在するものと想定されてきた。

本年度の研究において、我々はもう一つの癌幹細胞マーカーであるCD90に着目し、CD90陽性細胞が肝細胞癌の遠隔転移に果たす役割について検討した。さらに我々はEpCAM結合環状特殊ペプチドの特性についてin vitroおよびin vivoで評価を行った。

## B. 研究方法

サンプル 金沢大学附属病院で2008年から2012年4月にかけて肝切除が行われた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(Merck Chemicals)、抗CD90抗体(Stem Cell Technologies)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およびCD90陽性と診断した。

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DiI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。

マウス皮下移植モデル 癌幹細胞の腫瘍形成能については希釈系列を用いたNOD/SCIDマウスへの皮下腫瘍形成について経時的に評価を行った。

(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ーにて一括管理し、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

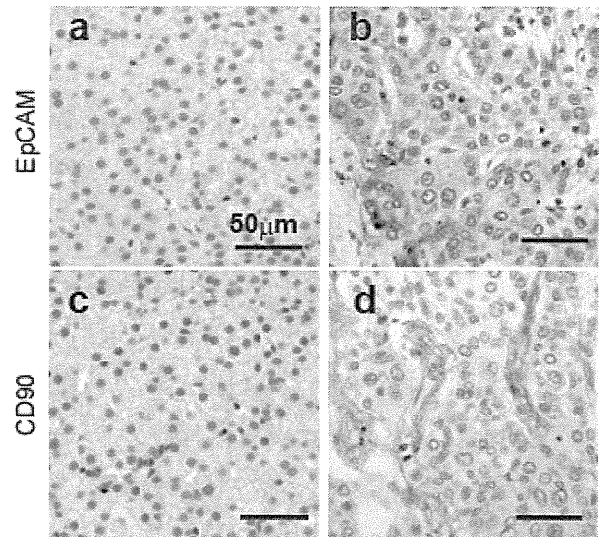
外科切除標本を用いて肝細胞癌における EpCAM 陽性細胞と CD90 陽性細胞を免疫組織化学で評価したところ、EpCAM 陽性細胞は癌上皮細胞の形態を有する一方、CD90 陽性細胞は間葉系細胞の形態を呈していた(図1)。

さらに、FACS 解析を行い EpCAM 陽性細胞と CD90 陽性細胞の分布を確認したところ、これらの細胞はそれぞれ独立して存在していることが明らかになった(図2)。

遺伝子発現の特徴をリアルタイム RT-PCR を用いて解析したところ、EpCAM 陽性

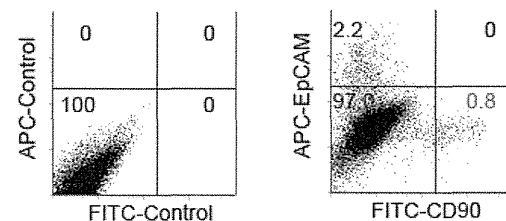
細胞では肝幹細胞マーカーである AFP や CK19 の発現が認められる一方、CD90 陽性細胞ではこれらの発現は極めて低く、間葉系マーカーである KIT が高発現していることが明らかになった(図3)。

図1 免疫組織化学



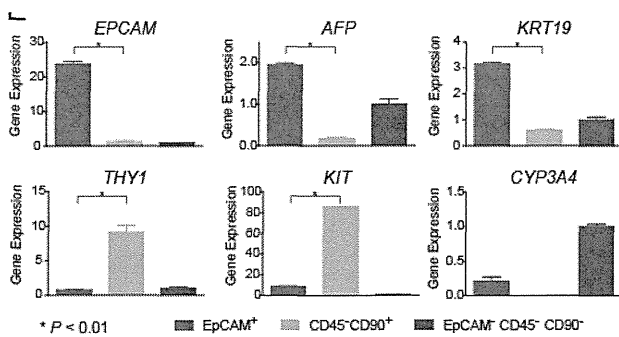
パネル a, c dysplastic nodule パネル b, d HCC (Yamashita et al, Hepatology 2012 より引用)

図2 FACS



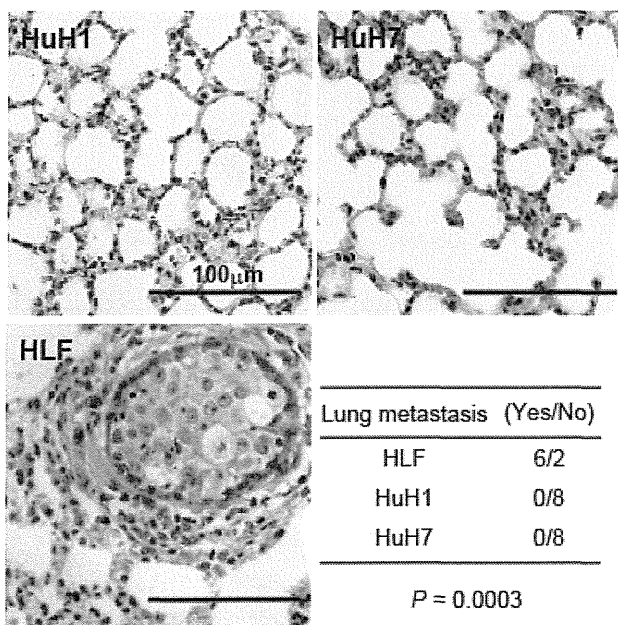
(Yamashita et al, Hepatology 2012 より引用)

図3 リアルタイムRT-PCR



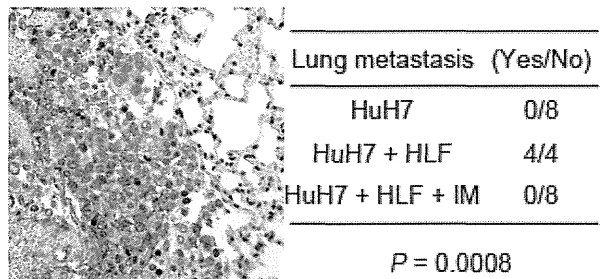
興味深いことに、CD90陽性細胞は腫瘍の形成能力はEpCAM陽性細胞に比して劣るものの、細胞の遊走、浸潤能力が高く、in vivoにおいて高い遠隔転移能力を呈した(図4)。また、CD90陽性細胞は自身が高い遠隔転移能力を有するのみならず、共培養することによりEpCAM陽性細胞の遊走能力、遠隔転移能力を誘導することが明らかになった。さらに、この遠隔転移誘導能力はimatinib mesylate投与により完全に抑制された(図5)。

図4 マウス皮下移植モデルにおける肺転移 (HE染色)



(Yamashita et al, Hepatology 2012 より引用)

図5 マウス皮下移植モデルにおける肺転移 (免疫組織化学、表)



肺組織におけるEpCAM陽性細胞の転移巣 (Yamashita et al, Hepatology 2012より引用)

このCD90陽性細胞の遠隔転移誘導能力をさらに検討したところ、CD90陽性細胞はTGF-betaの発現が高いこと、imatinib mesylate投与はTGF-betaの発現を抑制すること、共培養システムでの検討でCD90陽性細胞はEpCAM陽性細胞のTGF-beta経路を活性化することにより細胞の遊走能を活性化していること、などを同定した。

上記の検討から、imatinib mesylateは遠隔転移を誘導するCD90陽性癌幹細胞を標的として遠隔転移を抑制する分子標的薬であることが明らかになった。しかしながら、imatinib mesylateはEpCAM陽性細胞そのものの増殖には影響を与えず、原発巣については全く抗腫瘍効果を示さないことから、EpCAM陽性細胞を標的とする新たな治療法の開発が望まれる。そこで、我々は環状特殊ペプチド創薬技術を用いたEpCAM結合特殊ペプチド39Dの特性につき検討を行った。

39DはEpCAM陽性であるHuH7細胞内に取り



込まれるが、CD90陽性細胞であるHLF細胞には全く取り込みが認められなかった（図6）。そこで、39DのEpCAM陽性細胞に対する細胞遊走、浸潤能力への影響を評価したところ、control peptideに比し39Dは有意に遊走、浸潤ともに抑制、そのメカニズムとしてEpEX-EpICD/beta-catenin経路を抑制することでc-Mycの遺伝子発現抑制が関わるものと考えられた（図7）。

図6 Time Lapse Image Analysis

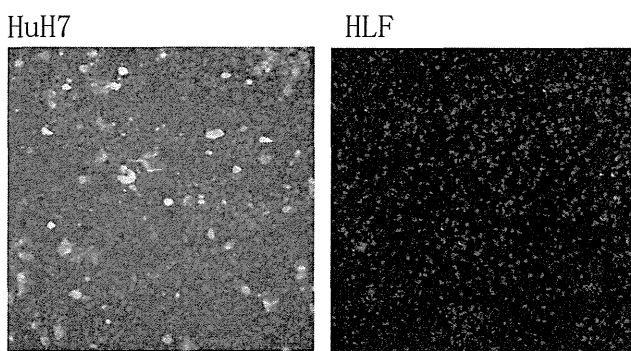
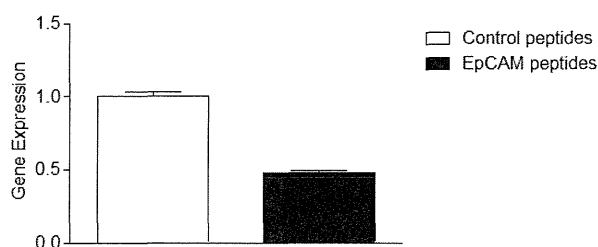


図7 リアルタイム RT-PCR (*c-Myc*)



最後に、39Dを用いたEpCAM陽性肝癌の新規画像診断法の可能性について、<sup>111</sup>In標識39D-DOTAを用いたSPECT解析を行ったところ、39Dは腎に排泄され、肝腫瘍イメージングに使用可能であることが明らかになった（図8）。ただし、皮下移植モデルにおいては腫瘍への明らかな取り込みは認められず、多くが短時間のうちに腎尿細管に取り込まれることで十分に腫瘍組織に到達し

ていない可能性が示唆された。

図8 SPECT imaging (<sup>111</sup>In-39D-DOTA)



#### D. 考察

本研究において、肝癌幹細胞は均質な集団ではなく、むしろ多様性を有し肝癌の個性を反映している可能性が示された。特にCD90陽性細胞はc-Kit陽性でimatinib mesylateに高い感受性を示し、遠隔転移を制御することが明らかとなり、そのメカニズムとしてTGF-beta経路の活性化が一部関与していることが示された。このことは、特に遠隔転移傾向の強い肝癌においてc-Kit阻害剤が有用である可能性を示唆している。一方、c-Kit阻害剤は高い門脈浸潤傾向、腫瘍形成能力を有するEpCAM陽性癌細胞に対しては抗腫瘍効果を示さないことから、別の分子標的薬を組み合わせる必要があるものと考えられる。

本研究において開発された、EpCAM結合環状特殊ペプチド39DはEpCAM陽性癌幹細胞に結合し遊走浸潤能力を抑制、そのメカニズムとしてEpEX-EpICD/beta-cateninシグナル伝達系の抑制が起こっているものと考えられた。ただし、この抑制効果は比較的短時間に起こり一過性であることから、抗腫瘍効果を検討するうえでは、薬剤投与ル

ートや修飾による半減期の調節など更なる検討が必要であると考えられる。また、<sup>111</sup>In標識39D-DOTAが皮下腫瘍に集積しない現象についても、ペプチドの結合はin vitroで明らかであることから、ペプチドの荷電を変えることで血液への滞留性を上げるなど、in vivoに最適化することで解決できる可能性があることから、今後の検討が重要と考えられた。

## E. 結論

EpCAM と CD90 は独立した肝癌幹細胞マーカーであり、EpCAM 陽性細胞は腫瘍形成、門脈浸潤傾向が強く、CD90 陽性細胞は遠隔転移を制御する。その機序として Wnt, c-Kit, TGF-beta シグナル伝達系の関与が認められ、imatinib mesylate は CD90 陽性細胞を標的とすることで遠隔転移を阻害する分子標的薬であることが明らかになった。また、EpCAM 結合特殊環状ペプチド 39D は EpCAM によって活性化する EpEX-EpICD/beta catenin/c-Myc シグナルを阻害、EpCAM 陽性細胞の遊走浸潤を阻害する。<sup>111</sup>In 標識 39D-DOTA を用いた SPECT によりこのペプチドの新規肝画像診断、治療法開発における有用性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells

in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (in press)

2) Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Arihara F, Kagaya T, Yamashita T, Fushimi K, Kaneko S. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (in press)

3) Mizuno H, Honda M, Shirasaki T, Yamashita T, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2012;32:1146-55.

4) Mizukoshi E, Fushimi K, Arai K, Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2012;32:1516-26.

5) Okada H, Honda M, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res* 2012;72:4459-71.

6) Kitao A, Matsui O, Yoneda N, Kozaka K, Kobayashi S, Koda W, Gabata T, Yamashita T, Kaneko S. Nakanuma Y, Kita R, Arii S. Hypervascular hepatocellular

carcinoma: correlation between biologic features and signal intensity on gadoxetic acid-enhanced MR images. *Radiology* 2012;265:780-9.

7) Oishi N, Kumar MR, Roessler S, Ji J, Forgues M, Budhu A, Zhao X, Andersen JB, Ye QH, Jia HL, Qin LX, Yamashita T, Woo HG, Kim YJ, Kaneko S, Tang ZY, Thorgeirsson SS, Wang XW. Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2012;56:1792-803.

8) Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A. Nucleostemin in injury-induced liver regeneration. *Stem Cells Dev* 2012;21:3044-54.

## 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 for Cancer Research Annual Meeting, Poster, Chicago, U.S.A. Apr 4<sup>th</sup> 2012

2) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Colombo F, Porretti L, Wang XW, and

Kaneko S. The evolution of diverse cancer stem cells in human liver cancer. American Association of Study of Liver Diseases Annual Meeting, Poster, Boston, U.S.A. Nov 10<sup>th</sup> 2012.

3) 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. 日本癌学会学術集会 2012、口演、札幌、2012年9月19日

4) 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞の多様性と進化、シンポ、JDDW2012、口演、神戸、2012年11月11日

5) 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝細胞癌の分子分類、教育基調シンポ、第48回日本肝癌研究会、口演、金沢、2012年7月20日

## 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

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

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 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

**研究要旨：**長鎖の2本鎖RNA (dsRNA) をDicerにより切断し、産生されたsiRNAの混合物 (Diced-siRNAs) が高いRNAi活性を持つことを認めた。Diced-siRNAs切断部位から推測して作製したsiRNAのRNAi効果を検討した結果、非常に高いRNAi活性をもつものが同定された。そこで、肝がん幹細胞マーカーであるEpCAMに対する高活性のsiRNAの探索と構築を試みた。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Dicerにより切断した。我々が開発して方法を用いてdicer hunting siRNAを12種類作成した。このうちの1種類は数pMでHep3B細胞のEpCAMを効率よくノックダウンできることが示され、超高効率siRNAの作成に成功した。さらにsiRNAを効率よく肝臓に導入するためのDDSとしてpH感受性のエンドソームエスケープリポソームの検討を行った。

A. 研究目的

本研究はEpCAM陽性がん幹細胞に極めて高い特異性と治療効果を生み出しうる新規医薬品を開発する。そのために、まずDicer切断同定法によって高活性siRNAを作成する。さらに、開発した核酸の導入効率を飛躍的に高めたエンドソームエスケープリポソーム(DDS)を用いてEpCAM陽性肝がん幹細胞を標的とするドラッグデリバリー系(DDS)を構築する。Dicer切断同定法によって高活性のsiRNAの探索と構築を試み、高活性siRNAを上記のDDSに組み込むことで、EpCAM陽性がん幹細胞に選択的かつ高効率にsiRNAを導入し、薬剤標的分子の発現を抑制することで高い抗腫瘍効果を生み出す新技術を開発する。

B. 研究方法

肝がん幹細胞マーカーであるEpCAMのmRNAをオーバーラップする4領域(R1, R2, R3, R4)に分割して、in vitroでDiced-siRNAsを作製し、これら4種類のDiced-siRNAsをHep3B細胞に導入した。阻害活性はウエスタンブロット法によりHep3B細胞に対するRNAi効果を検討した。さらに、siRNAを効率よく標的細胞に導入し、RNAi活性を発現させるために新たなデリバリー系としてエンドソームエスケープ膜融合ペプチドを検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。また、東京都医学総合研究所動物実験委員会の承認を得ている。