

201227003B

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22年度～24年度 総合研究報告書

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22年度～24年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

### 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	-----	5
-------	-------	---

### 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	-----	15
-------	-------	----

### 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	-----	21
------	-------	----

### 4. C型肝炎ウイルス産生に關与する宿主因子の探索

深澤 征義	-----	26
-------	-------	----

### 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	-----	35
-------	-------	----

### 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	-----	39
-------	-------	----

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 前川 伸哉	-----	45
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	-----	50
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	-----	54
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	65

# 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）

総合研究報告書

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：** 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。本研究は新たな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、独創的な技術であるsiRNA製剤および特殊ペプチド製剤の創薬研究を行うことを目的とした。研究は、1) ウイルス性慢性肝炎、線維化、発がんに対する創薬をめざした分子の解析研究（金子、竹原、宇都、前川、村上、堀本）、2) 治療効果を予測する診断法を開発する研究（金子、竹原、宇都、前川、村上、堀本）、3) HBVおよびHCVの複製を阻害する薬物、線維化の進展、発がんを抑制する薬物の開発研究（金子、竹原、深澤、小原、菅、堀本）が実施された。計画通りに創薬を目指した分子の解析研究が進められ、EpCAM、let7、脂質代謝、線維化に対して創薬研究が進められた。診断法の開発もMnSOD、AIM、補体C4断片、RANTESの診断薬としての可能性を明らかにした。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、活性の強いsiRNA製剤および極めて高い結合を示す特殊ペプチド製剤が作製され、培養細胞および動物実験において効果が示された。

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。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)

関連する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)

ウイルス性肝疾患の進展に関与する分子を解析し EpCAM が肝がん診断と治療の標的とすべき分子であることを明らかにした。小原、菅分担研究者と EpCAM 陽性細胞肝がんに対する新たな診断および分子標的薬の開発研究を行った。EOB-MRI 所見との関連を明らかにし画像診断による肝がんの分類を示した。

- 1) EpCAM、CD90 および AFP は肝がん幹細胞の分子マーカーである。
- 2) EpCAM と AFP 陽性の肝がんは生命予後が有意に悪い(Cancer Res 2010)。
- 3) EpCAM 陽性は脈管浸潤が多く CD90 陽性は肺転移をおこしやすい(Hepatology 2012)。
- 4) EpCAM 陽性は dUTPase の発現が高く 5 FU に対する感受性が低い(Liver Int 2010)。
- 5) 肝がんの MRI 所見 (Radiology 2010、2012) と EpCAM 陽性がんとの関連を明らかにし画像による肝がん分類を行った。

### ・研究分担者(小原道法)

- 1) EpCAM を標的として EpCAM 発現を強力に抑制する anti-sense 配列を同定し新規の siRNA を作製した。
- 2) EpCAM 陽性細胞を標的とするため、分担研究者の菅が作製した高親和性環状ペプチドをリガンドとして修飾した MEND リポソームの開発を行った。
- 3) ワクチニアウイルスを用いた HCV 感染の排除法を開発した (Plos ONE 2012)。

### ・研究分担者(菅 裕明)

- 1) EpCAM を標的にして 1.7 nM の解離定数をもつ特殊ペプチドを獲得した。
- 2) C 末端に蛍光ラベル、およびアイソトープ標識することで EpCAM 細胞を標識可能とし、まったく新規のイメージング法を開発した。
- 3) HCV の抗 E2 特殊ペプチドが SPR において強い結合能力を示し、感染阻害を示した。

### ・研究分担者(深澤征義)

HCV の生活環に係わる宿主因子の解析から新たな標的分子を同定した (J Gen Virol 2011)。

- 1) HCV 感染細胞の脂肪滴画分の比較プロテオーム解析から DDX3、C14orf166、PABP1、PABP4 がウイルス産生に重要であり DDX1、IMP1、IMP3 が HCV 産生に阻害的に働くことを明らかにした。
- 2) PI4KIII  $\alpha$ 、MafB の HCV 生活環への関与を明らかにした。
- 3) Importin 遺伝子ノックダウンにより



HCV 産生が上昇することを見だし特許申請した。

・研究分担者(竹原徹郎)

マイクロ RNA 解析を行い、肝がんに対する新たな治療標的分子として *let-7* を同定した。

- 1) 肝がんで高発現の Bcl-xL を抑制するマイクロ RNA *let-7* を同定した (J Hepatology 2010)。
- 2) Bcl-xL が高発現するメカニズムとして *let-7* 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)

ウイルス性肝疾患の進展に関与する分子機序を解析し新たな診断法を作製した。

- 1) C manganese superoxide dismutase (MnSOD) が HCV 関連肝癌で高値であり肝予備能と関連し、関連肝癌の予後予測マーカー候補であることを示した (World J Gastroenterol 2011)。
- 2) HCV 肝疾患患者血清中に増加するタンパクとして Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM、別名 CD5L) を同定し、肝線維化マーカー候補であることを明らかにした。
- 3) C4 断片が HCV 感染と関連するマーカーであることを明らかにした (Mol Med Report 2012)。

・研究分担者(前川伸哉)

ウイルス性肝疾患の進展に関与する分子機序を解析し、新たな診断法の開発研究を行った。

- 1) ペグインターフェロン・リバビリン療法において RANTES 高値によって治療反応性が規定されることを明らかにした (Hepatol Res 2012)。
- 2) 病態進展と肝発癌に関してバイオマーカーとして用いるためには各分子の characterization が必要であることを示した (Hepatology 2012)。

・研究分担者(村上周子)

HBV による肝線維化の病態をヒトキメラマウスを用いて解析した。

- 1) 高容量の HBV を接種した群はウイルス量が急増し ALT の上昇が見られ肝障害も早期に認めたが、感染時のウイルス量と 3 ヶ月後の線維化との関連はなかった。
- 2) HBV 感染確認後に抗マウス TLR4 抗体を投与した群で線維化の抑制が認められた。

・研究分担者(堀本勝久)

ウイルス性肝疾患の進展を抑制する新たな分子標的創薬に貢献するための標的分子探索法を開発した。単一標的候補分子の絞り込みによるドロップの危険性回避、標的候補分子に関する薬効の作用・副作用メカニズムの推定などに有用であることを示した (Gastroenterology 2010)。

- 1) 活性化ネットワークのデータ駆動型の推定と異なり、計測データとの整合性を算出することで既知ネットワーク群から活性化ネットワークを抽出する知識駆動型で、特異的条件下活性化しているタンパク質相互作用ネットワーク

を推定する方法を開発した。

- 2) 通常分子データの統合により表現型を推定するボトムアップ型とは異なり、予後データで規定されるサンプルの特徴から分子機能を推定するトップダウン型の方法で、予後データや検体サンプルの特徴などの表現型から分子機能を推定する方法を開発した。

#### C. 結論

計画通りに創薬を目指した分子の解析研究が進められ、EpCAM、let7、脂質代謝、線維化に対して創薬研究が進められた。診断法の開発も MnSOD、AIM、補体 C4 断片、RANTES の診断薬としての可能性を明らかにした。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、活性の強い siRNA 製剤および極めて高い結合を示す特殊ペプチド製剤が作製され、培養細胞および動物実験において効果が示された。

今後考えられる課題として下記があげられた。

- 1) 肝炎から肝がんへの進展に重要であるサイトカイン・増殖因子・インターフェロン応答分子が幹細胞を中心とする肝組織に及ぼす分子病態を解明する。
- 2) 肝炎ウイルス感染などの侵襲が EpCAM 陽性がん幹細胞などに及ぼす影響を明らかにする。
- 3) EpCAM 陽性細胞などの標的分子・細胞に対する診断・治療法の開発と事業化をすすめる。

#### 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。本研究で我々は肝幹細胞マーカーを用いた新たな肝細胞癌分類システムの妥当性に関する前向きな予後解析を行い、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。また、我々は癌幹細胞が均質な単一集団ではなく極めて多様な細胞集団であることを幹細胞マーカーであるEpCAMとCD90を用いて明らかにし、特に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ことを同定した。さらに我々は環状特殊ペプチド創薬技術を用いてEpCAMに特異的に結合するペプチド39Dの機能解析を行い、39DはEpCAMによって活性化するEpEX-EpICD/beta catenin/c-Mycシグナルを阻害しEpCAM陽性細胞の遊走浸潤を抑制すること、<sup>111</sup>In標識39D-DOTAを用いたSPECTにより39Dによるin vivo imagingが可能である事を明らかにした。本研究成果から肝癌幹細胞の多様性、性質が分子レベルで明らかになり、各癌幹細胞の特性に応じた分子診断、個別化治療への応用が期待できる。

A. 研究目的

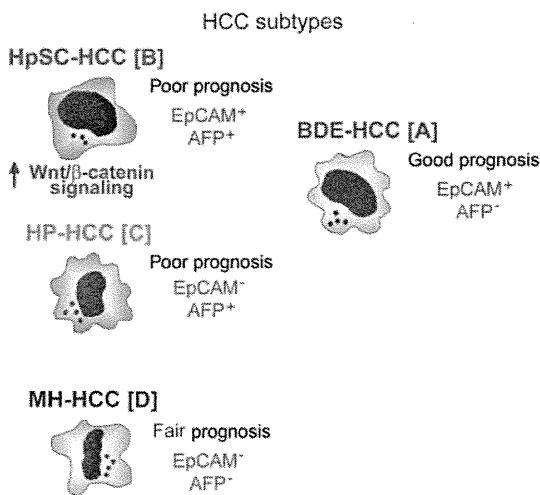
肝細胞癌は全世界で年間約70万人が罹患する第3の癌死亡原因である。肝細胞癌の殆どはB型もしくはC型慢性肝炎、肝硬変を背景に発症する。肝発癌のメカニズムとしてはウイルス蛋白そのものに加えて、繰り返す壊死、炎症、再生過程を背景に遺伝子異常が蓄積され、前癌病変から高分化型肝癌、進行肝癌へと進行していくと考えられている。この過程において異常をきたす様々な遺伝子・蛋白異常が報告されているが、全体像については未だ不明な点が多い。

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。

本研究では、これまでに我々が提唱してきた肝幹細胞マーカーである EpCAM と AFP を用いた分類 (図 1、Yamashita et al, Cancer Research 2008 より引用) の外科切除症例における有用性を他のステージングシステムと前向きに比較検討した。また、我々は EpCAM と CD90 という 2 つの異なる癌幹細胞マーカーに着目し、CD90 陽性細胞が肝発癌過程に果たす役割について検討した。さらに我々は環状特殊ペプチド創薬技術を用いて合成された EpCAM に結合する環状ペプチド 39D の特性について in vitro、in vivo で評価を行い、新規画像診断マーカーおよび分子標的薬としての有用性について評価を行った。

図 1 幹細胞性に基づいた肝細胞癌分類



## 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。

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 DiI で蛍光標識を行い、1 μM 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。

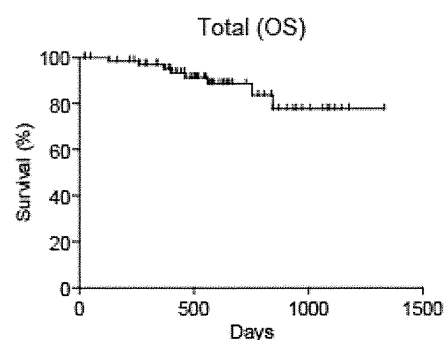
個人に関する情報の保護と管理は、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行った。連結可能匿名化後、金沢大学大学院医学系研究科環境医科学専攻恒常性制御学講座にて個人情報分担管理者の管理の下保存、データは研究室に設置した専用コンピュータにて一括管理し、データアクセスは研究従事者がパスワードを用いて行った。

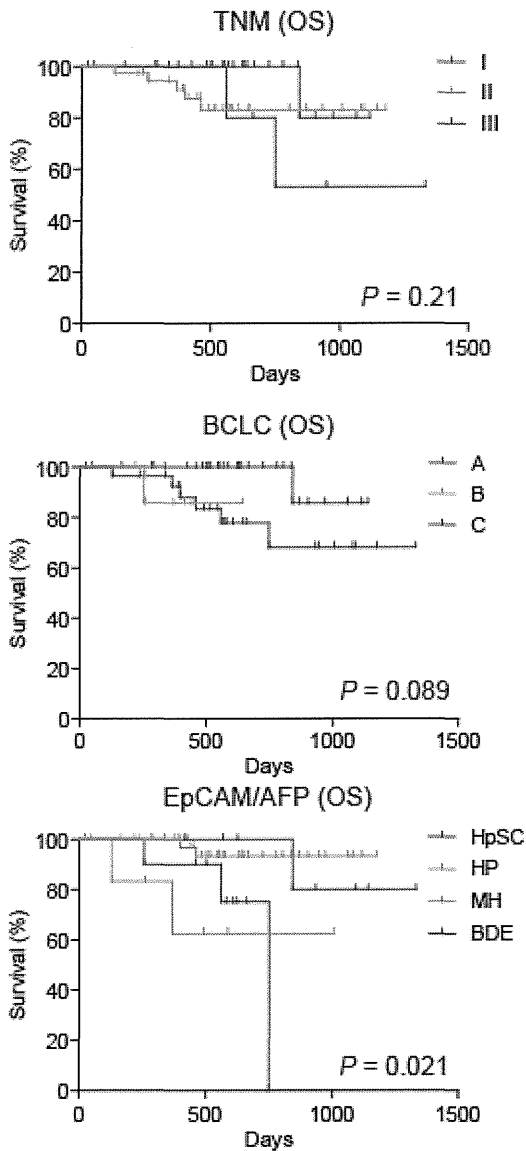
## C. 研究結果

### 肝癌分類システムの評価

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。さらに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





#### 肝癌幹細胞マーカー陽性細胞の特性

これまでに複数の肝癌幹細胞マーカーが報告されているが、各マーカーで規定される癌幹細胞が同じ集団なのか、それとも多様な集団であるのかについては見解が分かっている。そこで、過去に我々が報告した EpCAM 陽性細胞 (Yamashita et al, Gastroenterology 2009) と別のグループが報告した CD90 陽性細胞 (Yang et al, Cancer Cell 2008) の発現について免疫組織化学を用いて外科切除標本を用いて評価した。興味深いことに、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 3、Yamashita et al, Hepatology 2012 In press より引用)。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。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 4)。

図 3 免疫組織化学

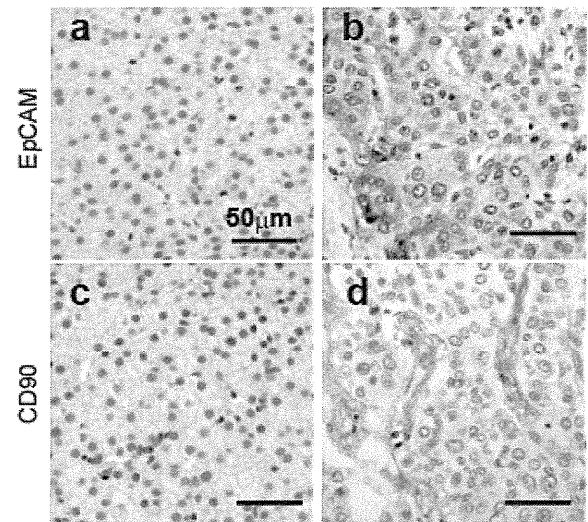
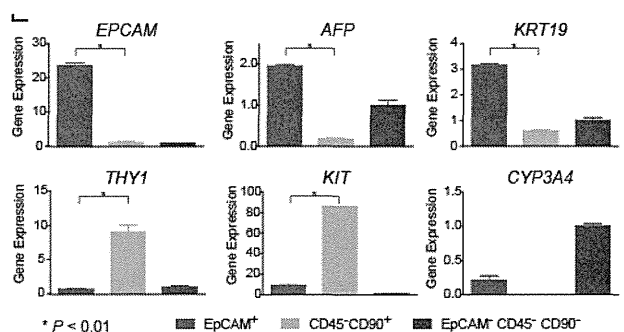
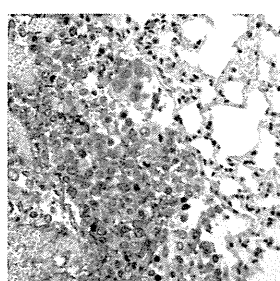


図 4 リアルタイム RT-PCR



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。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）



Lung metastasis (Yes/No)	
HuH7	0/8
HuH7 + HLF	4/4
HuH7 + HLF + IM	0/8

$P = 0.0008$

肺組織におけるEpCAM陽性細胞の転移巣（Yamashita et al, Hepatology 2012 In press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。

#### EpCAM結合環状特殊ペプチドの特性

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、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7）。

図6 Time Lapse Image 解析

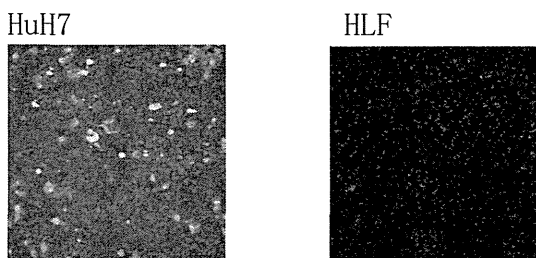
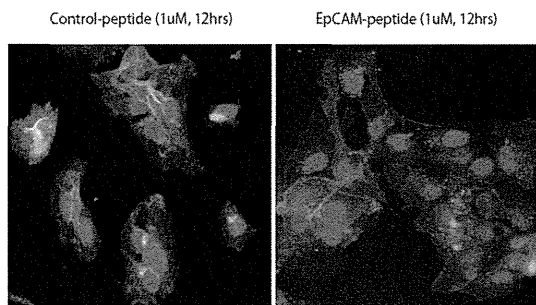


図7 蛍光免疫染色

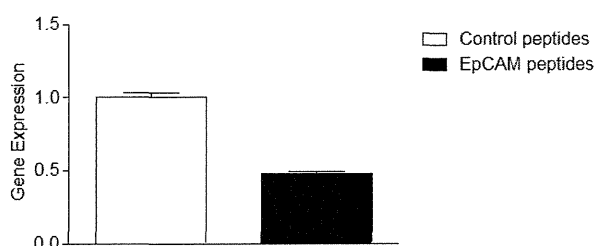


赤:EpICD、緑:EpEX、青:核



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8）。

図8 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9）。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9 SPECT imaging (<sup>111</sup>In-39D-DOTA)



#### 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。

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。特に 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。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

本研究から、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。また、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ことが判明した。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 陽性細胞における c-Kit 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。さらに、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ことが示された。<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(7):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(10):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(17):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(3):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(5):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(16):3044-54.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res* 2010;70(11):4687-97.
- 14) Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S. dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2010;30(3):438-46.
- 15) Hodo Y, Hashimoto S, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics* 2010;95(4):217-23.
- 16) Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Chapter 16. Heterogeneity of Liver Cancer Stem Cells. In: *Molecular Genetics of Liver Neoplasia.* Springer New York 2010.
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
- 6) 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.