

課題番号 : 29指1007

研究課題名 : 非ウイルス性肝硬変進展機序の解明と肝線維化・発癌マーカーの臨床的有用性の検証

主任研究者名 : 考藤 達哉

分担研究者名 :

キーワード : 肝線維化、非 B 非 C 型肝癌、癌関連線維芽細胞 (CAF)、うっ血性肝硬変

研究成果 :

肝癌 CAF 遺伝子 (BMP4 など) のエピゲノム修飾機構の解明

非 B 非 C 型肝がん症例を含む肝がん切除例 10 例から、癌部線維芽細胞 (CAF)、非癌部線維芽細胞 (NF) を別々に採取樹立した。肝硬変症例 (2 例) から同様に硬変部線維芽細胞 (LCF) を樹立した。CAF と NF、LCF の遺伝子発現を比較し、CAF において BMP4 が高発現することを明らかにした。BMP4 は線維芽細胞の活性化、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生、肝癌細胞の浸潤能を増強し、肝癌の悪性化に関与することを明らかにした (論文投稿中)。

CAF/NF/LCF のエピゲノム修飾に関して Infinium Array による網羅的メチル化解析 (48 万プローブ) を実施した。PCA 解析によって、LCF は別のクラスターに分離されたが、CAF と NF は同一症例が屢々同一のクラスターに分類され、CAF 特異的メチル化プロファイルは同定し得なかった。同一症例の CAF と NF の比較検定によって有意差を認めたものは 20,783 プローブ検出され、更に CAF と LCF の比較検定でも有意差を認めたものは 760 プローブであった。Pathway 解析により、肝癌 CAF で特異的に DNA メチル化される遺伝子が集積する分子経路を検討すると、神経系幹細胞分化経路、G 蛋白シグナル経路、脂質代謝経路、PTFA シグナル経路などであった。CAF における各経路関連分子の機能的意義の解析を進めている。

非 B 非 C 型肝癌における診断・治療効果・予後関連バイオマーカー探索と有用性の検証

非アルコール性脂肪肝炎 (NAFLD/NASH) における肝線維化には、マクロファージの分化・活性化が重要である。血管新生関連細胞 TEM はマクロファージ系列細胞であり、肝癌患者血液中、肝組織中で増加している。分子標的薬 Sorafenib は血管新生に重要な VEGF 経路の阻害活性も持っている。当施設を含む多施設共同研究により Sorafenib 治療を受けた肝癌患者では、治療開始 1 ヶ月後の TEM 頻度の増加は生存率低下と関連していた。TEM は Sorafenib 治療効果予測のバイオマーカーとして有用であることを明らかにした (Shoji H et al. Int J Cancer 2017)。肝癌切除後の予後関連バイオマーカーを明らかにするために、共同研究施設で肝切除を施行された 694 例を対象として、肝切除組織の miRNA 発現と術後再発、生存率との関連を検討した。その結果、肝組織 miR-125b 発現と肝内転移の有無が術後早期再発 (1 年以内) と関連していた (Shimagaki T, et al. Hep Res 2017)。

肝癌の新たな診断・予後判別マーカーの探索を行い、既存の AFP, PIVKA-II よりも感度、特異度に優れ、肝切除後の予後に関与する新規 Biomarker を同定した。同マーカーは胆管細胞癌や良性腫瘍では変化を認めず、今後の臨床応用が期待される (論文作成中)。

新規非ウイルス型 (非炎症型) 肝線維化モデルの樹立

重症心不全や先天性心疾患術後により長期間右心不全が存在すると、肝臓の低酸素環境と相俟ってうっ血性肝硬変を発症する。非ウイルス性 (非炎症性) 肝線維化進行に係るバイオマーカーや治療法を明らかにするために、マウス大静脈部分結紮によるうっ血肝のモデルを樹立した。今後、本モデルマウスを用いて肝線維化の機序の解明、診断法・治療法の検討を行う予定である。

Subject No. : 29-shi-1007

Title : Exploration of the mechanisms of non-viral liver fibrosis/cirrhosis and the development of feasible biomarkers of liver fibrosis or liver cancer.

Researchers : Tatsuya Kanto

Key word : liver fibrosis, Non-B, Non-C liver cancer, cancer-associated fibroblast (CAF), congestive liver cirrhosis

Abstract :

Risk factors or driving force in non-viral or minimal inflammatory HCC, including NASH, has yet to be clarified, thus hampering effective strategies for the prevention and treatment against such entity. Tumor microenvironment (TME), consisting of cancer-associated fibroblasts (CAF), precursors of angiogenesis or immune cells, has been drawing much research attention for the understanding of pathogenesis of various cancers. In this research project, we aim to clarify the interaction of various cellular components in TME and sought to determine the therapeutic targets or diagnostic biomarkers for the prevention or control of non-viral liver cirrhosis and HCC.

1) Investigation of regulatory mechanisms of CAF-related genes

- We established methods of harvesting primary fibroblasts from the resected liver and maintaining CAFs ex vivo. We identified various CAF-related genes by comprehensive gene analysis. We established a co-culture system consisting of CAFs, non-CAFs, immune cells and hepatoma cells for the functional analysis of CAFs. By using this system, we demonstrated that CAFs are functionally potent in inducing malignant phenotype of adjacent HCC.
- We performed genome-wide DNA methylation analysis on CAFs recovered from liver tissues and showed that the patterns of DNA methylation alterations in CAFs are distinct from that of non-CAFs. We found that 20,783 gene probes are different between CAFs and non-CAFs, 760 of which are of significance. Pathway analyses revealed that such genes are placed in the signaling of neuronal stem cells, G-protein coupled receptors, lipid metabolism and PTFA. Functional investigation of these pathways in CAFs are currently underway.

2) Exploration of diagnostic or prognostic biomarkers of non-viral liver cirrhosis and HCC and its application to the clinics

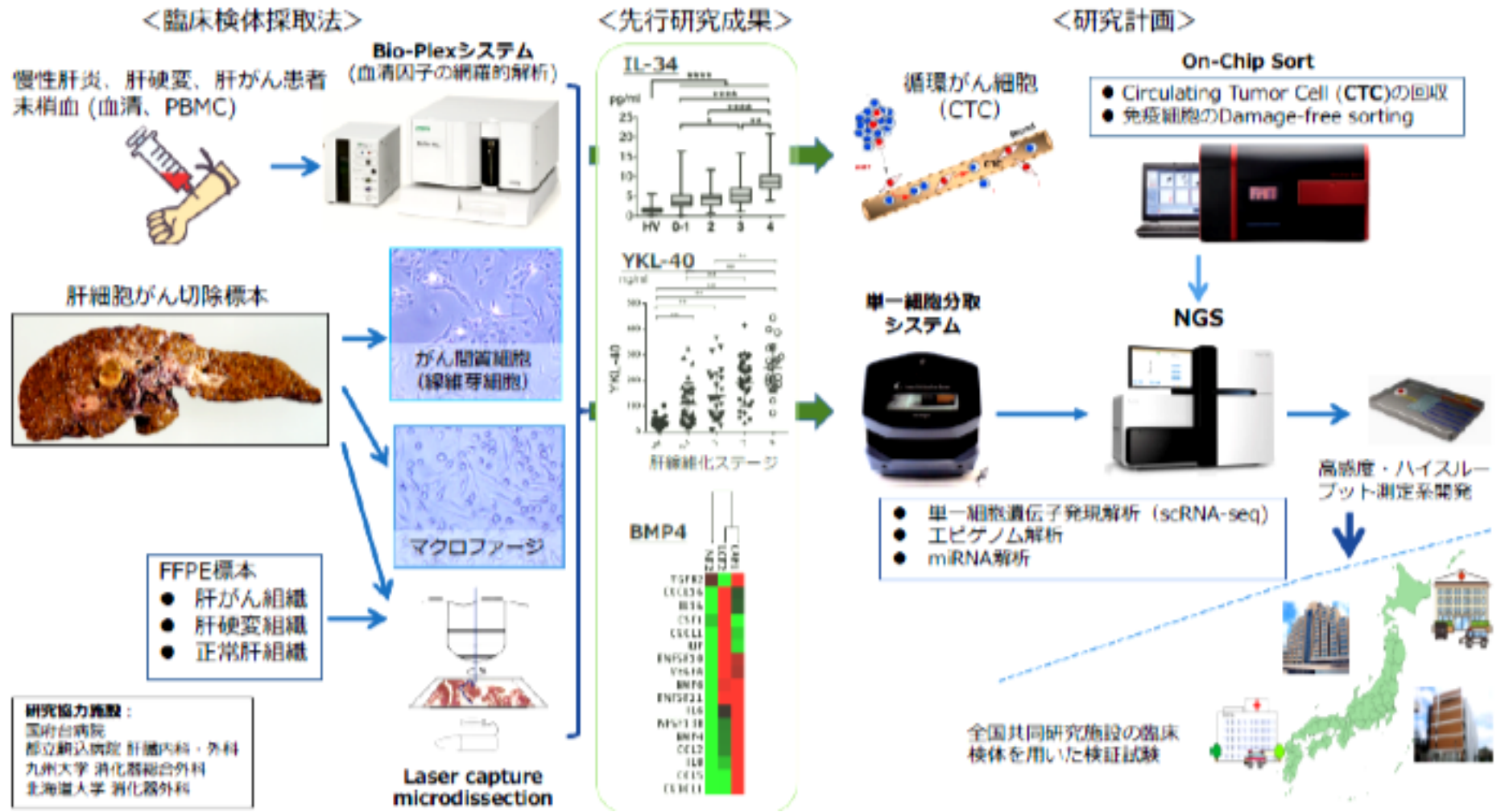
- We found that Tie2-expressing monocytes (TEMs), angiogenesis precursors, are increased in patients with HCC. We demonstrated that the increase of TEMs in HCC patients at 1 month after the sorafenib treatment was strongly correlated with poorer prognosis. Alternatively, we showed that miR-125b expression in liver specimens of resected HCC was correlated with post-operative early recurrence (<1year). We found a novel diagnostic and prognostic biomarker of HCC, the sensitivity and specificity of which are superior to AFP or DCP.

3) Establishment of novel model of non-viral, non-inflammatory and congestive liver fibrosis

- We have established mouse model of non-inflammatory and congestive liver fibrosis by partial ICV ligation (pIVCL). In this model, liver fibrosis developed within 6 weeks after the pIVCL, with lesser liver inflammation compared to other NASH-like models. We are investigating the mechanisms of liver fibrosis in this model, in order to find diagnostic markers or therapeutic targets of such disease entity.

Researchers には、分担研究者を記載する。

非ウイルス性肝硬変進展機序の解明と肝線維化・発癌マーカーの臨床的有用性の検証



<平成29年度目標>

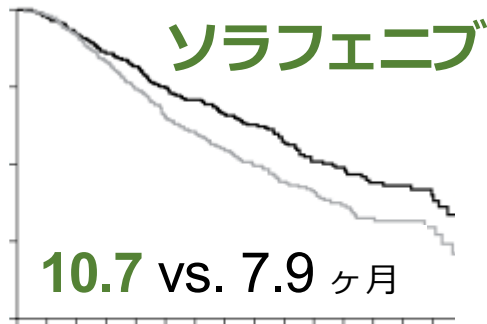
- 肝癌CAF遺伝子のエピゲノム修飾機構の解明
- 非B非C型肝癌におけるバイオマーカー探索と有用性の検証
- 非ウイルス性 (非炎症性) 肝線維化モデルの樹立

TEMは肝がん患者に対するソラフェニブ治療において予後に寄与する

(多施設共同前向きパイロット研究)

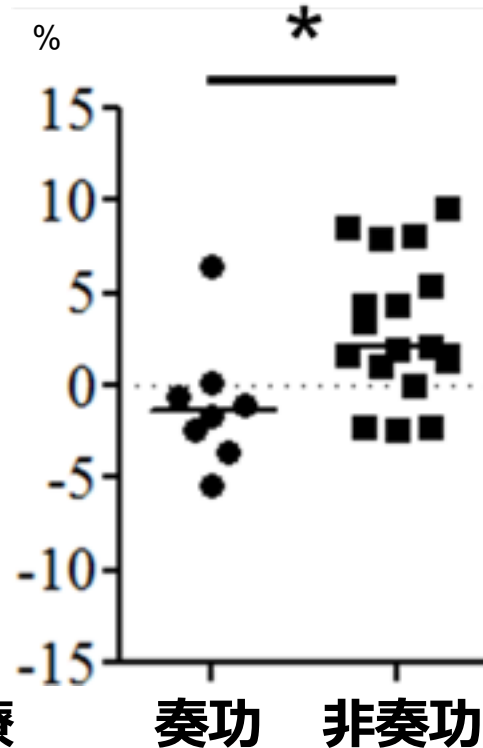
ソラフェニブ
(マルチキナーゼ阻害剤)
血管新生抑制
肝がん細胞増殖抑制

SHARP試験

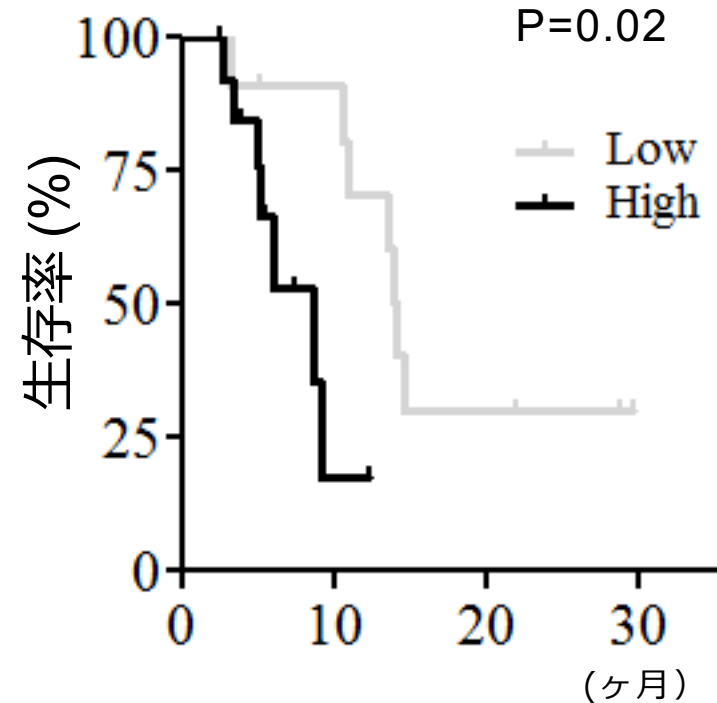


ソラフェニブ治療に合併する
手足症候群

治療開始後1ヶ月
TEM頻度



生存率



研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1007

研究課題名：非ウイルス性肝硬変進展機序の解明と肝線維化・発癌マーカーの臨床的有用性の検証

主任研究者名：考藤達哉

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
MicroRNA-125b expression and intrahepatic metastasis are predictors for early recurrence after hepatocellular carcinoma resection.	Shimagaki T, Yoshizumi T, Harimoto N, Yoshio S, Naito Y, Yamamoto Y, Ochiya T, Yoshida Y, <u>Kanto T</u> , Maehara Y.	Hepatol Res	Oct 6. doi: 10.1111/hepr.12990. [Epub ahead of print]	2017
Pro-angiogenic TIE-2-expressing monocytes/TEMs as a biomarker of the effect of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma.	Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Doi H, Sugiyama M, Osawa Y, Kimura K, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aoki Y, Fukai M, Taketomi A, Mizokami M, <u>Kanto T</u> .	Int J Cancer	141(5):1011-1017.	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
MicroRNA-125bは肝細胞癌切除後早期再発予測因子である	島垣智成、播本憲史、由雄祥代、土肥弘義、本村貴志、長津明久、伊藤心二、原田昇、池上徹、副島雄二、溝上雅史、 <u>考藤達哉</u> 、吉住朋晴、前原喜彦。	消化器外科学会 (JDDW2017)	福岡	2017年10月
Tie2養成単球 (TEM) は切除不能進行肝癌患者におけるソラフェニブ治療効果に寄与する	由雄祥代、正司裕隆、島垣智成、土肥弘義、杉山真也、大澤陽介、青木孝彦、新井泰央、糸川典夫、厚川正則、木村公則、溝上雅史、 <u>考藤達哉</u> 。	第21回肝臓学会大会 (JDDW2017)	福岡	2017年10月

研究発表及び特許取得報告について

MicriRNA-125b expression levels and intrahepatic metastasis are predictors for early recurrence after hepatocellular carcinoma resection.	Shimagaki T, Yoshizumi T, Harimoto N, Yoshio S, Motomura T, Itoh S, Harada N, Ikegami T, Soejima Y, Mizokami M, <u>Kanto T</u> , Maehara Y.	AASLD2017	ワシントン（ア メリカ）	2017年10月
---	---	-----------	-----------------	----------

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこ