

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

平成25年 3月15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 國 土 典 宏
所属機関名： 東京大学
所属部署名： 医学部附属病院 職名： 教授
所 在 地： 東京都文京区本郷7-3-1
電 話： 03-3815-5411 内線： 33339



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

システムバイオロジー技術を駆使した肝細胞癌の病態制御機構の総括的解析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 國 土 典 宏	職名： 教授
所属機関名： 東京大学	部署名： 医学部附属病院
中国側研究者氏名： 敖 平	職名： 教授
所属機関名： 上海交通大学	部署名： システム生物医学研究院

4. 当該研究における発表論文等

(1). Zhong YS, Deng MH, Xu RY, Kokudo N, Tang W. Pseudomyxoma peritonei as an intractable disease and its preoperative assessment to help improve prognosis after surgery: A review of the literature. Intractable & Rare Diseases Research. 2012; 1:115-121.

- (2). Song PP, Feng XB, Zhang KM, Song TQ, Ma KS, Kokudo N, Dong JH, Yao LN, Tang W. Screening for and surveillance of high-risk patients with HBV-related chronic liver disease: Promoting the early detection of hepatocellular carcinoma in China. Biosci Trends. 2013; 7:1-6.
- (3). Xia JF, Gao JJ, Inagaki Y, Kokudo N, Tang W. Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: Recent approaches using HepG2 cell line. Drug Disco & Ther. 2013; *in press*.

5. 成果の概要

肝細胞癌特有の病態機構をターゲットとした診断技術や化学療法剤の開発が癌の早期発見や進行癌患者の予後改善に有効であると考え、DCP 及び c-Met の臨床病理学的解析を実施し、両因子の発現性に関連性があることを示唆した。また、これらの因子の発現を蛍光で検出することで、高感度かつリアルタイムな診断技術、光線力学的治療技術への応用が可能であると考え、ICG を投与した移植癌モデルで検討を実施した。その結果、蛍光物質を利用した高感度診断及び光線力学的治療を検討する *in vivo* 解析系を構築できたと示唆される。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

本研究における中国側研究者の役割は、DCP 及び c-Met の臨床病理学的解析を担当。中でも、両因子の発現性を評価する段階に従事した。さらに、システムバイオロジー技術を駆使した因子の発現評価システムの構築を試みた。

システムバイオロジー技術を駆使した肝細胞癌の病態制御機構の総括的解析

研究代表者：國土 典宏

日本研究機関：東京大学医学部附属病院・肝胆膵外科学

中国側共同研究代表者：敖 平

中国所属機関：上海交通大学・システム生物医学研究院

要旨：肝細胞癌は、外科的切除術の発展などにより予後が改善しつつある癌疾患であるが、罹患者数の増加と進行癌患者に対する化学療法の開発が課題となっている。肝細胞癌の病態悪化にはDCPやc-Metといった特有の因子の関与が示唆されてきたが、臨床上の意義は十分に解明されていない。そこで、肝細胞癌特有の病態機構をターゲットとした診断技術や化学療法剤の開発が癌の早期発見や進行癌患者の予後改善に有効であると考え、DCP及びc-Metの臨床病理学的解析を実施し、癌の病態との関連性を検討した。その結果、DCP及びc-Metの高発現は癌部組織及び周辺の非癌部組織の双方で検出された。また、両因子の高発現が同時に検出される症例が有意に高頻度であったことから、両因子の発現性に関連性があることが示唆された。また、これらの因子の発現を蛍光で検出することで、高感度かつリアルタイムな診断技術、光線力学的治療技術への応用が可能であると考え、ICGを投与した移植癌モデルで検討を実施した。肝細胞癌培養細胞由来の腫瘍組織を形成させたマウスにICGを投与したところ、腫瘍組織に集積するICGの蛍光を高感度かつ特異的に検出した。さらに、このICGを集積した腫瘍組織に近赤外光を照射したところ、腫瘍組織の拡大は有意に抑制された。従って、蛍光物質を利用した高感度診断及び光線力学的治療を検討する*in vivo*解析系を構築できたと示唆される。DCP及びc-Metの高発現と蛍光検出技術を融合させることにより、肝細胞癌の病態を評価可能な診断技術や進行した病巣に有効な治療技術の開発が期待される。

キーワード：肝細胞癌、c-Met、DCP、診断、治療

1. 導入

肝細胞癌は、世界的に罹患者数が増加しており、日本及び中国を含むアジア地域においては特に顕著である。外科的切除術の発展により肝細胞癌患者の予後は改善されつつあるが、癌患者の早期発見や進行癌患者に対する治療に関する技術はまだ開発途上にあり、手術不適応になった患者の予後は悪い状況にある。この臨床上の課題を克服するためには、肝細胞癌の病態機構を解明し、癌が進行する前の早期発見を可能とする診断技術や進行癌

患者の予後改善に貢献する化学療法の開発が求められる。

本研究グループでは、これまでに肝細胞癌に特有の病態機構に着目した臨床病理学的あるいは生化学的研究を実施してきた。肝細胞癌の診断マーカーとして知られるDes- γ -carboxyprothrombin (DCP) が、癌部組織だけでなく周辺の非癌部組織でも発現し、その高発現が癌患者の予後の悪化と相関することを見出した。また、培養細胞を用いた基礎医学的研究では、DCPが癌細胞の増殖を促進させる活性をもつことを示し、その働きに癌細胞の細胞膜に発現する肝細胞成長因子受容体c-Metが重要な役割を果たすことを示唆した。従って、これらのタンパク質をターゲットとした診断技術の開発や治療薬の創出などが有効であると考えられた。

肝細胞癌組織を術中にリアルタイムで画像提示し、癌組織の大きさの分析や切除範囲の決定を可能とする技術が当研究グループによって開発された。その技術では、肝細胞癌細胞に取り込まれ、細胞内に長期的に維持されるIndocyanine green (ICG) という蛍光物質を用いている。その特性を利用して、癌組織を高感度に検出することを可能としている。一方、ICGが特定の波長をもつ近赤外光を吸収して熱を発することから、光線力学的な治療法の確立に有用であると考えられた。また、この蛍光標識技術を駆使して上述したDCPやc-Metをターゲットとした癌組織の描出法を構築することにより、癌の病態に基づく診断や治療技術の開発の可能性が期待された。そこで、本研究ではDCP及びc-Metの癌患者由来組織における発現性を組織化学的に解析して、これらの因子と癌の病態との関連性を検討した。そして、ICGを投与したマウス移植癌モデルを用いて、癌の診断及び治療における蛍光描出技術の有用性を*in vivo*の実験系で明らかにすることとした。

2. 方法

2.1 DCP 及び c-Met の発現性と臨床病理学的解析

肝細胞癌組織 153 例についてホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、抗 DCP 抗体あるいは抗 c-Met 抗体を用いた免疫組織化学的手法による解析を実施した。各種抗原の発現性は、癌部組織及び非癌部組織における局在性を観察すると共に、無作為に選出した 10 区域における陽性細胞の割合を算出して比較解析した。

2.2 蛍光ナビゲーションシステムによる肝細胞癌組織の描出

肝細胞癌培養細胞株HuH-7及びHepG2を10%牛血清含有Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地にて培養し、 5×10^6 個の細胞をBALB/cヌードマウスの皮下に移植した。約10日後、移植した癌組織が50～1000 mm³となったことを確認した後、ICGを5 mg/mLの濃度で尾静脈から血中投与した。24時間後、蛍光イメージングシステムを用いてICGの癌組織へ

の取り込みを観察した。

2.3 近赤外光照射

肝細胞癌培養細胞株HuH-7細胞をDMEM培地にて培養し、 5×10^6 個の細胞をBALB/cヌードマウスの皮下に移植した。約10日後、移植部位に腫瘍組織が形成されたことが確認できたマウスに対してICGを5 mg/mLの濃度で投与し、ICG投与から24時間後に蛍光発光を確認した。なお、同時にICGを投与しない移植癌マウスも作出した。これらのICG投与・非投与の移植癌マウスの腫瘍組織に対して160 mW/cm²の光線密度で3分間近赤外光を照射し、その後3日おきに腫瘍組織の大きさを測定した。

3. 結果及び考察

3.1 DCP 及びc-Met の発現性と臨床病理学意義の解明

当研究グループでは、肝細胞癌特有の異常タンパク質である DCP が c-Met と協調して肝細胞癌の病態悪化に関与することを培養細胞を用いた基礎医学的解析により示唆した。しかし、肝細胞癌患者由来の組織での DCP 及び c-Met の発現性とその臨床病理学的意義に関しては不明であった。そこで、これらの因子の発現性を免疫組織化学的手法により解析し、肝細胞癌の病態との関連性を検討した。その結果、DCP 及び c-Met の発現は癌部組織において高頻度に検出されたが、非癌部組織においても検出された（表 1）。また、DCP が高発現している症例では c-Met の高発現が高頻度に認められたことから、これらの因子の発現の有無には連関性が示唆された（表 2）。さらに、c-Met の高発現が認められた症例群では、術後の予後が有意に悪化していた。以上の結果から、DCP と c-Met が予後の悪い症例の癌組織において協調的に発現していたことから、肝細胞癌の病態悪化に寄与することが癌患者由来の組織においても示唆された。また、これらの因子が、予後の悪い患者のスクリーニングを目的とした免疫組織化学的診断法の開発に有効であると考えられる。

3.2 移植癌モデルマウスを用いた ICG による肝細胞癌組織の描出

ICG は、肝細胞癌患者の肝予備能の診断という目的で臨床医療の場において用いられている。ICG は蛍光物質であり、癌細胞に取り込まれると長期的に維持される性質を有することから、癌組織を高感度に検出することを可能としている。この現象が、移植癌モデルマウスを用いた *in vivo* 条件下においても再現可能であるかを検討する目的で、肝細胞癌組織を形成させたマウスに対して ICG を投与し、蛍光を観察した。その結果、癌細胞腫によって強度は異なるものの、腫瘍組織の位置に ICG 由来の蛍光が検出された（図 1）。一方で、腫瘍組織周辺の非癌部組織は蛍光を示さなかったことから、この蛍光は腫瘍組織において

特異性高く観察された。以上の結果から、ICG の蛍光が、肝細胞癌細胞由来の腫瘍組織の検出に有効であることが、移植癌モデルマウスを用いた *in vivo* 実験でも証明された。この解析系の確立は、次項の ICG の更なる応用に関する研究に必須であるほか、上述した DCP や c-Met をターゲットとした診断や治療技術の開発にも応用可能であると考えられる。蛍光を検出する技術と病態制御に関わる因子の発現を融合させることにより、高感度な新規診断法を構築できると期待される。

3.3 ICG 蛍光法を応用した光線力学的治療法の確立

上述したように、ICG は静注後に肝細胞癌組織に特異性高く集積し、腫瘍組織の高感度検出を可能とすることを *in vivo* モデルで示した。そして、ICG は特定波長の近赤外光を吸収して発熱を呈することから、光線力学的な治療に有用であるとされてきた。そこで、この ICG の性質と当研究グループが明らかにした ICG による肝細胞癌組織の描出技術とを融合させることにより、肝細胞癌に対する高い特異性を有する光線力学的治療が可能であると考え、*in vivo* モデルを用いた解析を実施した。ICG の投与によって蛍光を呈した肝細胞癌組織に対して近赤外光を照射して腫瘍の大きさを継続的に観察したところ、照射していない肝細胞癌組織に比べて腫瘍組織の拡大が抑制された（図 2）。また、この効果は ICG を投与していない組織に近赤外光を照射しても誘導されなかった。なお、腫瘍組織周辺の正常組織には、近赤外光照射による顕著な障害は観察されなかった。以上の結果から、ICG は肝細胞癌組織の描出だけでなく、近赤外光照射による光線力学的治療への応用にも有効であることが示唆された。本技術は、ICG と同様の性質を有する物質が肝細胞癌の光線力学的治療法に有効であるか否かの評価に利用できる。

総括

本研究では、肝細胞癌組織における DCP と c-Met の高発現が関連性を有することを組織化学的解析により示した。細胞を用いた過去の研究において、DCP が c-Met を介して癌細胞の増殖と浸潤を活性化することが示唆されたことから、その現象が肝細胞癌患者の病態悪化に寄与していることが考えられる。一方、本研究では蛍光物質を利用した肝細胞癌組織の高感度検出と光線力学的治療に関する解析を可能とする *in vivo* 実験系の構築を達成した。DCP や c-Met といった肝細胞癌特有の病態関連因子を蛍光標識する技術、関連因子の発現性に基づく数理プログラムを用いた病態機構予測技術を構築することで、患者個々の癌の病態を評価できる方法の確立が期待される。

表 1. 肝細胞癌患者組織における発現性

Sub-group	DCP n (percent)	c-Met n (percent)
C(+)NC(+)	15 (9.8%)	36 (23.5%)
C(+)NC(-)	82 (53.6%)	66 (43.1%)
C(-)NC(+)	5 (3.3%)	8 (5.2%)
C(-)NC(-)	51 (33.3%)	43 (28.1%)
Total cases	153	153
C(+)	97 (63.4%)	102 (66.7%)
NC(+)	20 (13.1%)	44 (28.8%)

C：癌部組織、NC：非癌部組織

表 2. 肝細胞癌患者由来組織における DCP と c-Met の発現の関連性

Sub-group	DCP _c ↔c-Met _c	DCP _{nc} ↔c-Met _{nc}	DCP _w ↔c-Met _w
DCP(+)c-Met(+) cases	78 (51.0%)	11 (7.2%)	89 (58.2%)
DCP(-)c-Met(-) cases	32 (20.9%)	100 (65.4%)	30 (19.6%)
DCP(+)c-Met(-) cases	19 (12.4%)	9 (5.9%)	13 (8.5%)
DCP(-)c-Met(+) cases	24 (15.7%)	33 (21.6%)	21 (13.7%)
Total cases	153	153	153
p value	< 0.0001	0.0054	< 0.0001

DCP_c：癌部組織での DCP の発現、c-Met_c：癌部組織での c-Met の発現、DCP_{nc}：非癌部組織での DCP の発現、c-Met_{nc}：非癌部組織での c-Met の発現、DCP_w：組織全体での DCP の発現、c-Met_w：組織全体での c-Met の発現

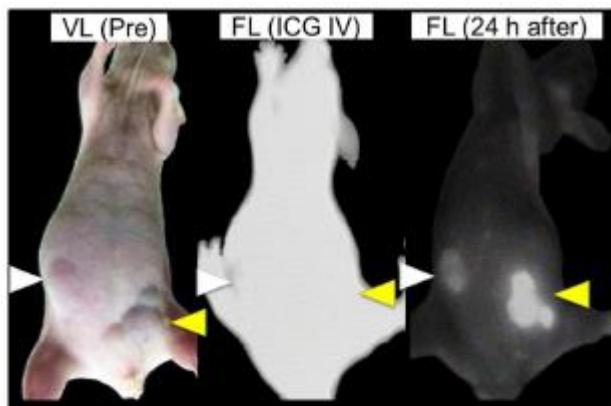


図 1. ICG を投与した移植癌マウスにおける蛍光発光。左側腹部に HuH-7 を移植し（黄矢印）、右側腹部に HepG2 を移植した（白矢印）。ICG 投与直後は全身で蛍光が検出されたが（図中央、FL(ICG IV)）、投与 24 時間後では蛍光が腫瘍組織特異的に検出された（図右、FL(24h after)）。

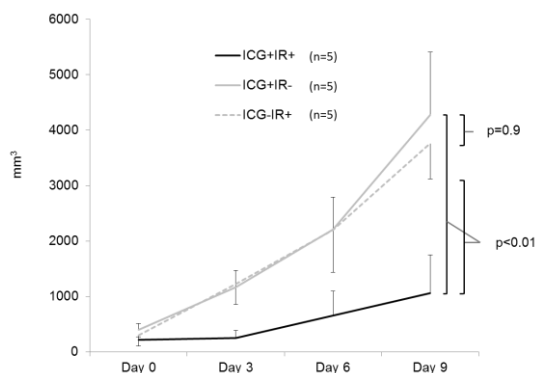


図 2. 近赤外光照射による肝細胞癌組織の拡大の抑制。近赤外光照射から 3 日ごとに腫瘍の大きさを測定したところ、ICG を投与して近赤外光を照射したマウスの腫瘍組織（ICG+IR+）は、ICG を投与して近赤外光を照射していないマウスの腫瘍組織（ICG+IR-）及び ICG を投与せず近赤外光を照射したマウスの腫瘍組織（ICG-IR+）と比較して 9 日後の体積が有意に小さかった（p<0.01）。