

令和元年6月13日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08656

研究課題名(和文)afadinによる肝細胞癌進展機構の解明

研究課題名(英文)Effect of afadin expression on the progression of hepatocellular carcinoma

研究代表者

及川 浩樹(Oikawa, Hiroki)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50285582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌20例に関して、afadinの免疫染色を行うと、全例の非癌部でafadinは高発現を示したが、15例の癌部では、発現の低下を認めた。afadinが低発現の肝細胞癌株HLE、HLFでafadinの発現を亢進させると、有意に浸潤は抑制された。afadinを高発現している肝細胞癌株HepG2において、afadinの発現を抑制すると、有意に浸潤は亢進した。afadinの発現調節により、Srcのリン酸化に有意な変化を認めた。afadinの発現を抑制したHepG2にSrc inhibitorを添加すると、浸潤能は有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍の中で肝細胞癌は世界で5番目の発生率を示す。肝細胞癌の治療は近年進歩しているが、いまだ肝細胞癌は癌死の3番目を占め、その制圧には至っていない。この不良な予後は、腫瘍細胞の浸潤と、それにより導かれる肝内転移、そして肝外転移に依存している。この腫瘍細胞の浸潤には細胞間接着の減弱や破綻が大きく関わっていると考えられている。今回、細胞間接着を構成する分子であるafadinの発現低下がSrcのリン酸化を誘導し、肝細胞癌の浸潤能を亢進させることを明らかにした。以上から新たな治療ターゲットとしてafadinが候補となり得る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Twenty cases of hepatocellular carcinoma (HCC) were immunohistochemically examined for the expression of afadin. Immunohistochemistry showed lower expression of afadin in HCC tissues of 15 cases compared with peritumoral tissues of 20 cases. Stable overexpression of afadin in HLE and HLF suppressed invasion. Inhibition of afadin expression in HepG2 using RNA interference promoted invasion. The regulation of afadin expression changed the phosphorylation of Src. Src kinase inhibitor on HepG2 with inhibition of afadin expression using RNA interference reduced invasion.

研究分野：人体病理、実験病理

キーワード：肝細胞癌 細胞間接着 afadin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の中で肝細胞癌は世界で5番目の発生率を示す。肝細胞癌の治療は近年進歩しているが、いまだ肝細胞癌は癌死の3番目を占め、その制圧には至っていない。この不良な予後は、腫瘍の浸潤としばしば認める肝内転移、そして肝外転移によってもたらされる。このプロセスには細胞間接着の減弱や破綻が大きく関わっている。

上皮細胞間の接着は主に tight junction (TJ) と adherens junction (AJ) により維持されている。これらの接着に関与する分子の中で、AJ の E-cadherin と β -catenin はさまざまな腫瘍の進展に関わっていることが示されている。

afadin は AJ を構成する分子の一つで nectin の細胞内領域と結合することで、AJ の形成の一翼を担っている。afadin には大きな分子である l-afadin と小さな分子である s-afadin の2つのスプライスパリアントがあり、細胞では有意に l-afadin が発現しているため、l-afadin について主に検討されている。afadin は、遊走、増殖、分化、生存、細胞極性の確立といった多彩な細胞機能の調節に関わっている。

最近、afadin の発現変化と癌の進展の関連についても検討されており、乳癌において afadin の発現低下が浸潤、転移を促進し、不良な予後をもたらすことが報告されている。また、afadin の発現低下は、膵癌において snail の発現亢進を誘導し、EMT をもたらすと共に、増殖を亢進させ、転移を促進することも示された。しかし、肝細胞癌の進展に afadin が影響を与えるかは、現在まで報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、afadin の発現変化が肝細胞癌の進展に影響を及ぼすかを明らかにすると共に、それが制御する分子を同定し、更なる研究および治療の足掛かりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト原発性肝細胞癌例の癌部肝組織と周囲非癌部肝組織における afadin の発現の検討

20 例のヒト原発性肝細胞癌例の組織標本に関して afadin の免疫染色を行った。免疫染色の染色強度は -、1+、2+、3+ の4段階で評価し、30%以上の細胞が 2+ 以上を示した時、陽性と判定した。

(2) 肝細胞癌株3種での afadin の発現の検討

Immunoblot および RT-PCR にて afadin の発現を検討した。

(3) afadin の発現亢進における浸潤能の検討

afadin の発現の低い HLE、HLF で afadin を高発現する stable cell line を作製し、matrigel invasion assay にて 24 時間後の浸潤の程度を検討した。Control として mock vector から作製した stable cell line を使用した。

(4) afadin の発現抑制における浸潤能の検討

afadin の発現の高い HepG2 で、siRNA にて afadin の発現を抑制し、matrigel invasion assay にて 24 時間後の浸潤の程度を検討した。コントロールとして control siRNA をトランスフェクションした HepG2 を使用した。

(5) afadin の発現変化で変化する分子の検討

(3) の HLE と HLF の stable cell line と (4) の siRNA をトランスフェクションした HepG2 からタンパクを抽出し、Src、ERK1/2、Akt のリン酸化を検討した。

(6) afadin の発現抑制における Src inhibitor の浸潤能に与える影響の検討

(4) と同様に siRNA で afadin の発現を抑制した HepG2 に対して、Src inhibitor (SU6656) を添加した場合と添加しない場合、また、control siRNA をトランスフェクションした場合に関して、matrigel invasion assay を行い、浸潤能を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト原発性肝細胞癌例の癌部肝組織と周囲非癌部肝組織における afadin の発現の検討

20 例の肝細胞癌例の癌部と周囲非癌部に関して、afadin の発現状態を免疫組織化学的に検討すると、非癌部は強い染色性を示すのに対して、多くの癌部では弱い染色性を示すか、ほぼ染色性を示さなかった。しかし、一部では、広い範囲で癌部が強い染色性を示す症例も認められた。

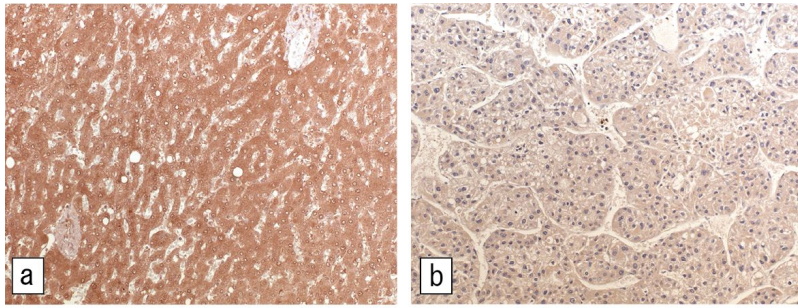


図 1. 肝細胞癌部と周囲非癌部における afadin の免疫染色像

30%以上の細胞が 2+ 以上の染色強度を示す症例を陽性とする、15 例の肝細胞癌部は陰性であったが、周囲非癌部は全例陽性を示し、それぞれの染色性には有意差を認めた。

表 1. 肝細胞癌部と周囲非癌部の afadin 発現の比較

	afadin immunoreactivity		P-value
	Positive	Negative	
HCC tissues	5/20 (25%)	15/20 (75%)	0.001
nontumor tissues	20/20 (100%)	0/20 (0%)	

(2) 肝細胞癌株 3 種での afadin の発現の検討

肝細胞癌株 3 種で afadin の発現を immunoblot および RT-PCR にて検討すると、HepG2 で afadin の発現が高く、HLE、HLF では発現が低いのを認めた。

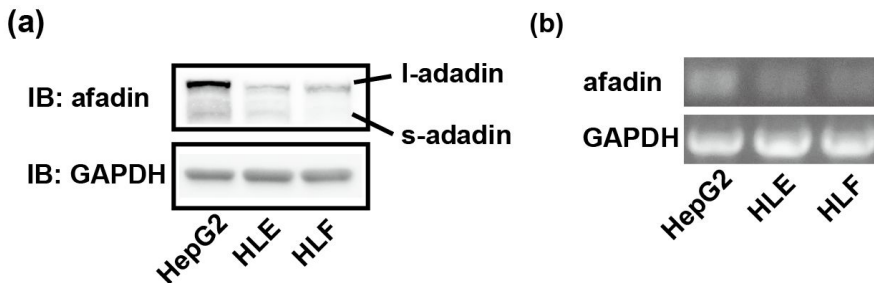


図 2. 肝細胞癌株での afadin の発現の検討. a and b. 肝細胞癌株 3 種で afadin の発現を immunoblot (a) および RT-PCR (b) で検討した.

(3) afadin の発現亢進における浸潤能の検討

HLE、HLF で afadin の発現を亢進させた stable cell line では、control に比較し、浸潤能は減少していた。

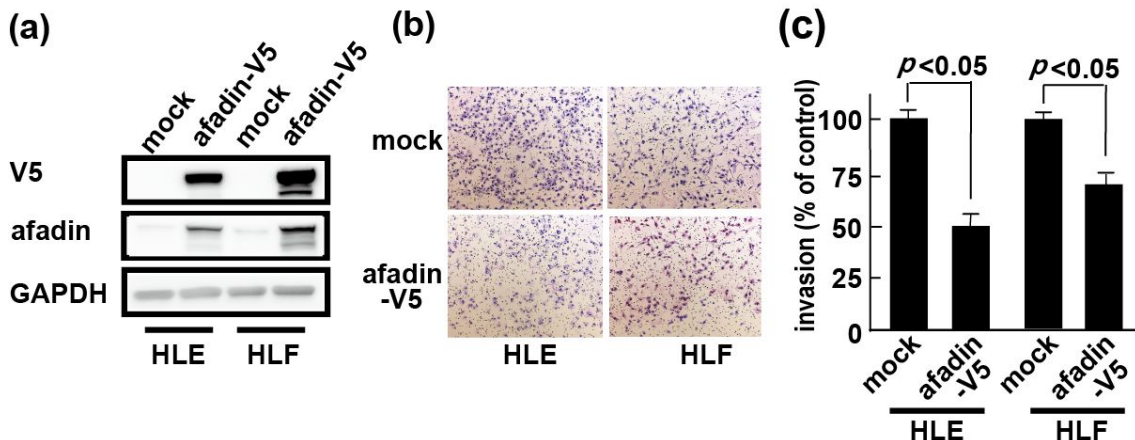


図 3. afadin の発現亢進における浸潤能の検討. a. HLE および HLF の stable cell line での afadin-V5 の発現を immunoblot で検討した. b and c. afadin の発現亢進による HLE および HLF の浸潤能を matrigel invasion assay で検討した。

(4) afadin の発現抑制における浸潤能の検討

HepG2 に、afadin の siRNA をトランスフェクションし、その発現を抑制すると、control siRNA をトランスフェクションした HepG2 と比較し、浸潤能は亢進していた。

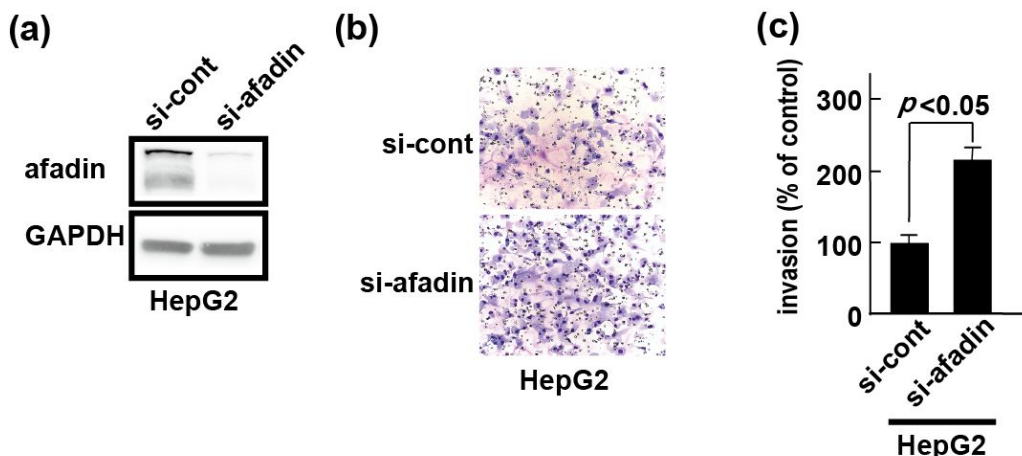


図 4. afadin の発現抑制における浸潤能の検討 . a. HepG2 での siRNA の効果を immunoblot で検討した。b and c. afadin の発現抑制による HepG2 の浸潤能を matrigel invasion assay で検討した。

(5) afadin の発現変化で変化する分子の検討

afadin の発現状態により、浸潤能が変化したので、その機能変化に参与している分子機構を明らかにするために、上記 (3) の様に HLE と HLF で afadin の発現を亢進させた場合と上記 (4) の様に HepG2 において siRNA で afadin の発現を抑制した場合、コントロールと比較し、ERK1/2 と Akt のリン酸化に明らかな変化を認めなかったが、Src のリン酸化に変化を認めた。

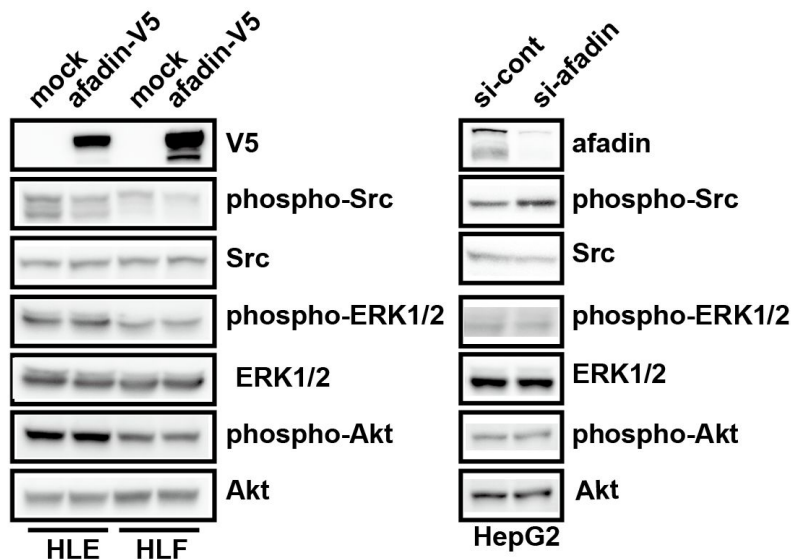


図 5. afadin の発現変化で変化する分子の immunoblot による検討 .

(6) afadin の発現抑制における Src inhibitor の浸潤能に与える影響の検討

afadin の発現変化により、Src のリン酸化が変化した事より、浸潤能の変化に Src のリン酸化が関わっているかを明らかにするために、(4) と同様な条件で、afadin の発現を抑制した HepG2 に Src inhibitor を添加した場合の浸潤能を検討した。その結果、afadin の発現抑制で亢進した浸潤能は、Src inhibitor の添加でコントロールと同程度まで抑制される事を認めた。

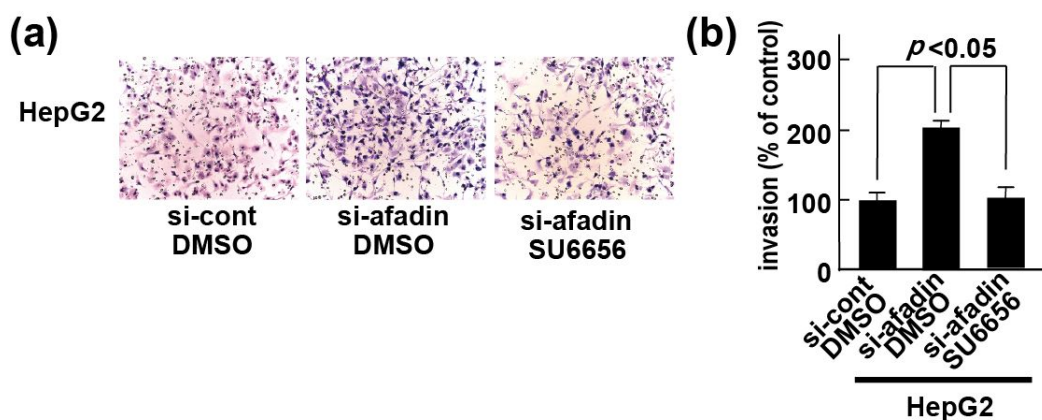


図 6. afadin の発現抑制における Src inhibitor の浸潤能に与える影響の検討。

以上から、肝細胞癌において afadin の発現低下が浸潤能の亢進を導き、この浸潤能の亢進は Src のリン酸化によってもたらされると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Nishiya M, Yasuhira S, Shibazaki M, Oikawa H, Masuda T, Maesawa C. Fluvastatin exerts an antitumor effect in vemurafenib-resistant melanoma cells. *Anticancer Drugs*. 30 (2019), 451-457. 査読あり. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000757.
2. Hasegawa Y, Nitta H, Takahara T, Katagiri H, Kanno S, Otsuka K, Sasaki A. Laparoscopic left hemihepatectomy is suitable as a first step in pure laparoscopic major hepatectomy. *Ann Gastroenterol Surg*. 2 (2018). 376-382. 査読あり. DOI: 0.1002/ags3.12193.
3. Sugiyama, Oikawa H, Masuda T, Sadzuka Y. Effect of Liposomes with different double arms polyethyleneglycol on hepatic metastasis model mice and evaluation using a fluorescent imaging device. *Curr Drug Deliv*. 14 (2017). 668-675. 査読あり. DOI: 10.2174/1567201813666160328113653.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 及川 寛太. 消化器癌を対象とした温熱療法後の血漿サイトカインの検討. 第 35 回日本ハイパーサーミア学会. 2018.
2. 及川 浩樹. 肝細胞癌浸潤能に及ぼす afadin の発現変化の検討. 第 106 回日本病理学会総会. 2017 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者: 及川 寛太

ローマ字氏名: Oikawa Kanta

所属研究機関名: 岩手医科大学

部局名: 医学部

職名: 研究員

研究者番号(8桁): 00405804

研究分担者: 増田 友之

ローマ字氏名: Masuda Tomoyuki

所属研究機関名: 岩手医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10199698

研究分担者: 前沢 千早

ローマ字氏名: Maesawa Chihaya

所属研究機関名: 岩手医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10326647

研究分担者: 新田 浩幸

ローマ字氏名: Nitta Hiroyuki

所属研究機関名: 岩手医科大学

部局名: 医学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 70326677

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。