

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06981

研究課題名（和文）大腸がん肝転移巣に対するHeregulin関連分子を介した新規分子標的療法の検討

研究課題名（英文）A study to explore the new molecular target therapy about Heregulin associated molecules concerning to liver metastasis of colon cancer

研究代表者

吉岡 年明 (Yoshioka, Toshiaki)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80302264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大腸癌肝転移において肝細胞が産生するHeregulin(HRG)に注目し、その発現と役割について、さらにHRG関連分子に対する新規分子標的療法の検討を目的とする。HRG産生は、ヒト大腸癌肝転移標本において88.7%で肝細胞に発現を認めた。ジメチルニトロソアミン投与による肝傷害では、投与後1日目からmRNAの上昇と免疫組織染色で発現上昇を認めた。また、各種サイトカインによる肝細胞傷害時には、HRGのmRNAが1.5倍ほど上昇し、HRG投与により肝細胞は増殖した。HRGのレセプターのHER3に対する新規抗体は、癌細胞増殖やヌードマウス皮下の腫瘍増大を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌の肝転移に関わる様々な分子が報告されているが、大腸癌と転移先の肝臓の主な構成細胞である肝細胞との相互作用という面から転移のメカニズムを解明した報告は少ない。本研究において、Heregulinはマウスの大腸癌肝転移標本のみならず、ヒトの大腸癌肝転移標本でも高頻度に癌周囲の肝細胞に発現が確認されたことから、ヒトでも同様のメカニズムが起きていることが示された。HeregulinのレセプターであるHER3に対して新規に作製した抗体が、大腸癌細胞の増殖を抑制しヌードマウス皮下に移植した大腸癌腫瘍の増大を抑制したことから、治療に貢献できる可能性があり学術的、社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要（英文）：We investigated an expression and a role of hepatocyte-secreted Heregulin and a new molecular target therapy about Heregulin associated molecules concerning to liver metastasis of colon cancer. Immunohistochemical examination on human specimen of liver metastasis revealed that 88.7% cases expressed HRG. Dimethylnitrosoamine caused increased expression of mRNA and protein of HRG in rat hepatocytes. HRG mRNA was increased the expression by cytokines treatment and mouse hepatocytes were proliferated by HRG. A new HER3 antibody repressed the proliferation of cancer cells and growth of xenograft.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝転移 Heregulin 肝細胞 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、高肝転移ヒト大腸癌細胞 LS-LM6 が、自身が発現するインテグリン $\alpha V\beta 5$ と受容体型チロシンキナーゼの ErbB3 と ErbB2 によるヘテロダイマーとの共同作業により、肝細胞が産生する Vitronectin(VN)上での遊走能を増強させて肝転移能を上昇させていること、そしてこの共同作業には、肝細胞が産生する、細胞増殖因子の Heregulin (HRG)により、ErbB3 がリン酸化されることが必要であり、肝細胞が産生する HRG が肝転移形成に重要な役割を果たしていることを報告した(Yoshioka et al. Cancer Sci 2010). 実際に LS-LM6 細胞において、HRG によって活性化され、共同作業を行なう ErbB3 とインテグリン αV を siRNA を用いて発現を低下させたところ、VN 上での遊走能が抑制され、さらに肝転移形成能が有意に抑制された(Yoshioka et al. Cancer Sci 2010). 我々はマウスの肝転移モデルから得られたこの結果が、ヒトでも同様に行われていると予想し、大腸癌肝転移において、肝細胞が HRG を産生するメカニズムを解明するため、本研究を始めるに至った。

2. 研究の目的

大腸癌において重要な予後因子である肝転移のメカニズムの解明は、その治療法を探る上で非常に重要である。大腸癌の肝転移に関わる様々な分子が報告されているが、大腸癌と転移先の肝臓の主な構成細胞である肝細胞との相互作用という面から、転移のメカニズムを解明した報告は少ない。本研究では、肝転移の際、肝細胞が産生する増殖因子である HRG に着目して、大腸癌肝転移において、肝細胞が HRG を産生するメカニズムについて解明し、その役割について検討する。さらに、大腸癌肝転移巣に対する、HRG 関連分子を介した新規の分子標的療法の検討を目的とする。

3. 研究の方法

A. 肝細胞が HRG を産生するメカニズムについて解明.

(1) ヒト大腸癌肝転移手術検体を用いた免疫組織化学的検討.

我々は、マウスの実験肝転移のみならず、ヒト大腸癌肝転移においても、転移巣周囲の肝細胞が HRG を産生すると予想し、当院で肝転移切除された手術検体 53 症例を用いて、抗 HRG 抗体を使用して免疫組織化学的に HRG の発現を検討した。ヒト手術標本を用いた検討は、当大学医学部倫理委員会で承認されている。

(2) ジメチルニトロソアミン(DMN)による肝傷害時における肝細胞からの HRG 産生の検討.

肝細胞が HRG を産生するメカニズムに関しては、a) 肝転移形成により傷害された肝細胞から産生される、b) 残存する肝細胞から産生される、などが予想され、その点を検討するため、実験的肝傷害モデルを用いて検討を進めた。DMN をラットに 30 mg/kg 投与して肝傷害を引き起こし、投与後 1 日目、2 日目、4 日目、6 日目に犠牲死させて肝臓を摘出し、肝細胞における HRG 産生を検討した。採取した肝細胞から RNA を抽出して定量性 RT-PCR にて、また抗 HRG 抗体による免疫組織染色にて、経時的な発現の変化を検討した。

(3) 各種サイトカインによる肝傷害時における肝細胞からの HRG 産生の検討.

肝転移形成時には、転移がん細胞から、また、周囲のクッパー細胞由来の活性化したマクロファージ(Tumor associated macrophage, TAM)や線維芽細胞(Cancer associated fibroblast, CAF)から様々なサイトカインが放出され、これらが肝細胞に傷害を起こしている可能性がある。我々はマウス培養肝細胞 FL83B を用いて、マウスサイトカインである、TGF- β 、IL-6、MCP-1 を投与し、採取したマウス肝細胞から RNA を抽出して定量性 RT-PCR にて HRG の cDNA 量を計測してその産生を検討した。

B. HRG の役割についての検討

(4) HRG のマウス肝細胞の増殖能に対する影響についての検討.

HRG が肝細胞の増殖能に影響している可能性を検討するために、HRG を 10ng/ml、100ng/ml 投与して WST-1 法により 24 時間後、48 時間後の影響をみた。

C. 大腸癌肝転移巣に対する、HRG 関連分子を介した新規の分子標的療法の検討.

(5) 高肝転移細胞の ErbB3(HER3)に対する分子標的療法の検討.

近畿大学薬学部との共同研究で、HRG のレセプターである HER3 に対する新規抗体を作成しその効果を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌肝転移の際の、肝転移巣周囲の肝細胞における HRG 産生の検討.

ヒトでの HRG 産生を確認するため、当院で肝転移切除された手術検体(53 症例)を、抗 HRG 抗体で免疫組織的に検討したところ、47 例(88.7%)に肝細胞での HRG の産生を確認した(Table 1)。その発現は、がん転移巣周囲の直接傷害された肝細胞ではなく、その周囲の肝細胞に HRG の発現を認めた(Figure 1)。

HRG	Cases (53 in total)	Percentage
Positive	47	88.7 %
Negative	6	11.3 %

Table 1. ヒト肝転移切除検体における転移巣周囲の肝細胞での HRG 産生の割合

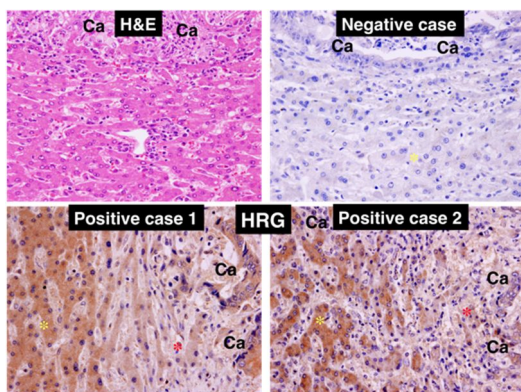


Figure 1. ヒト大腸癌肝転移巣周囲の肝細胞の HRG 産生(免疫組織化学染色)。HRG は大腸癌肝転移巣(Ca)に接する直接傷害された肝細胞(赤色星印)ではなく、その周囲の肝細胞(黄色星印)に発現が認められた(下段 Positive case 1 と 2)。

(2) ジメチルニトロソアミン(DMN)による肝傷害時における肝細胞からの HRG 産生の検討。

上述の結果から、肝細胞が傷害を受けることにより、周囲の肝細胞に HRG 産生が導かれる可能性が示唆されたため、実験的肝傷害モデルを用いて検討を進めた。ラットにジメチルニトロソアミン(DMN)を 30 mg/kg 投与して肝傷害を引き起こし、経時的に犠牲死させて肝細胞での HRG 産生を検討した(Figure 2A)。DMN 投与後 2 日目で、肝細胞逸脱酵素であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)やアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)は血中で 200 U/L を越えて、生化学的にも肝傷害が確認できた(Figure 2B)。

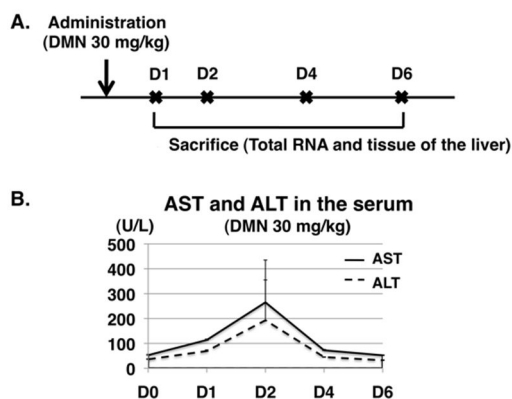


Figure 2. DMN 投与による肝傷害の誘導と経時変化 A. DMN(30 mg/kg)投与後、1 日目(D1)、2 日目(D2)、4 日目(D4)、6 日目(D6)に犠牲死させて、肝細胞における HRG 産生を、肝細胞から RNA を抽出して定量性 RT-PCR にて、また免疫組織染色にて検討した。B. DMN 投与後のラット血中 AST, ALT を生化学的に検討した。

肝細胞から RNA を取り出して、定量性 RT-PCR により HRG の cDNA 量を計測したところ、投与後 1 日目で HRG の量はコントロールの 25 倍に達して、以後 6 日目まで 5 倍以上を維持し有意な発現上昇が認められた(Figure 3)。以上により、DMN 投与により、肝細胞では速やかに mRNA の発現上昇を来すことが示された。

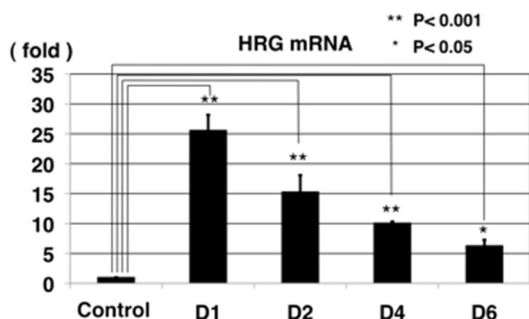


Figure 3. DMN 投与後の肝細胞における HRG 発現の経時変化 DMN 投与後、ラットの肝臓における HRG mRNA は、D1 に約 25 倍と最も上昇し、D6 まで有意に発現の上昇が続いた。

次にその際の HRG の発現上昇の局在を検討するため、免疫組織化学的に HRG の産生を検討したところ、DMN により傷害を受けた肝小葉中心域(中心静脈周囲)の肝細胞ではなく、その周囲の門脈域の肝細胞に HRG 産生を確認した(Figure 4)。以上から、ヒト肝転移手術症例と同様に、

DMN による肝傷害においても、直接傷害を受けた肝細胞ではなく、その周囲の肝細胞から HRG が発現することが確認された。

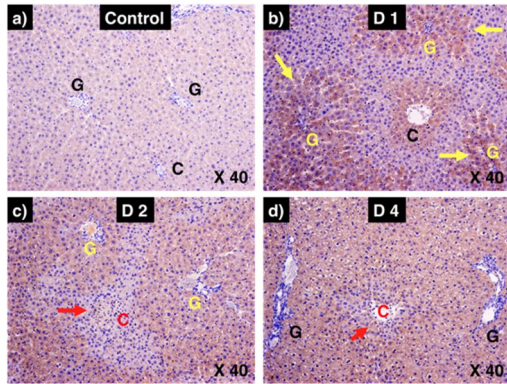


Figure 4. DMN 投与後の肝臓における HRG 発現の局在の経時的変化 DMN 投与後 D1 において、HRG の発現は傷害された小葉中心域(C)ではなく、グリソン領域(G)において確認され、時間が経過するに従い次第に肝臓全体に広がっていった。

(3) 各種サイトカインによる肝傷害時における肝細胞からの HRG 産生の検討。

肝転移巣から放出される様々なサイトカインが肝細胞に傷害を起こしている可能性を検討するため、マウス培養肝細胞 FL83B にマウスの TGF- β 、IL-6、MCP-1 を投与し、定量性 RT-PCR にてマウス HRG の産生を検討したところ、各種サイトカイン 1ng/ml や 10ng/ml を投与した状況で、24 時間後にサイトカイン(-)のコントロールに比較して 1.5 倍程 HRG の産生増加が認められた(Figure 5)。

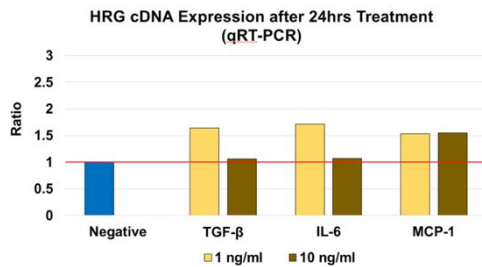


Figure 5. 各種サイトカイン投与時の肝細胞における HRG 産生 サイトカイン 1ng/ml, 10ng/ml 投与した 24 時間後の HRG 産生は、いずれもサイトカイン(-)に比較して 1.5 倍程増加した。

(4) HRG のマウス肝細胞の増殖能に対する影響についての検討。

HRG が肝細胞の増殖能に影響している可能性を検討するために、各種サイトカインに HRG を投与して WST-1 法により 24 時間後、48 時間後の影響をみたところ、HRG 投与により増殖能が優位に増加した(Figure 6)。

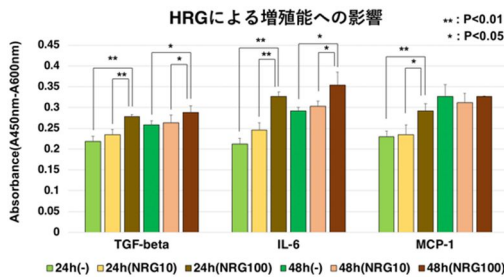


Figure 6. HRG のマウス肝細胞の増殖能に対する影響についての検討 各種サイトカインに HRG を 10ng/ml, 100ng/ml 投与して 24 時間後、48 時間後の影響を WST-1 法によりみたところ、HRG 投与により増殖能が有意に増加した。

(5) 高肝転移細胞の ErbB3(HER3)に対する分子標的療法の検討。

共同研究で作製した HRG のレセプターである ErbB3(HER3)に対する新規抗体は、in vitro では様々な癌細胞の HER3 を認識し、リガンドである HRG を加えた際に HRG と HER3 の結合や HER3 のリン酸化を阻害し、癌細胞の増殖を抑制することが判明した。また、in vivo では、ヒト組織中の大腸癌細胞を認識し、ヌードマウス皮下に移植したヒト大腸癌細胞や高肝転移ヒト大腸癌細胞の増殖を抑制することが判明した(Figure 7)。このことから、新規の HER3 抗体は治療効果が期待できる。この結果をまとめて共同研究者と共に論文発表した(Okita et al. Oncotarget 11, 31-45, 2020)。

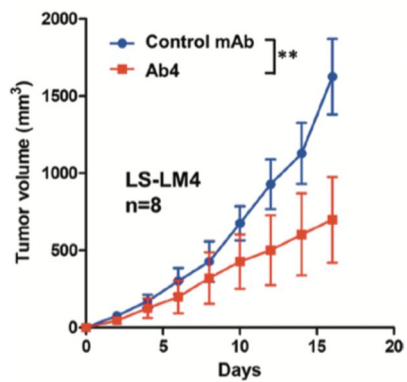


Figure 7. ノードマウス皮下での新規 HER3 抗体 Ab4 による腫瘍増殖抑制効果

ヌードマウス皮下にヒト大腸癌高肝転移細胞 LS-LM4 を 4×10^6 個移植し, HER3 抗体 Ab4 およびコントロールの IgG 抗体を $100 \mu\text{g}$ ずつ Day0 と Day7 に腹腔内投与して継続的にその腫瘍容積を計測したところ, HER3 抗体 Ab4 が腫瘍増殖を有意に抑制することが判明した.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sato H, Narita S, Ishida M, Takahashi Y, Mingguo H, Kashima S, Yamamoto R, Koizumi A, Nara T, Numakura K, Saito M, Yoshioka T, Habuchi T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Specific Gut Microbial Environment in Lard Diet-Induced Prostate Cancer Development and Progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23042214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okita K, Hara Y, Okura H, Hayashi H, Sasaki Y, Masuko S, Kitadai E, Masuko K, Yoshimoto S, Hayashi N, Sugiura R, Endo Y, Okazaki S, Arai S, Yoshioka T, Matsumoto T, Makino Y, Komiyama H, Sakamoto K, Masuko T.	4. 巻 112
2. 論文標題 Antitumor effects of novel mAbs against cationic amino acid transporter 1 (CAT1) on human CRC with amplified CAT1 gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 563-574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takano H, Fukada M, Hatakeyama S, Konno Y, Yamazaki M, Igarashi H, Nanjo H, Nagao T, Yoshioka T	4. 巻 33
2. 論文標題 A case of secretory carcinoma of the minor salivary gland in the buccal mucosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Oral Maxillo Surg Med Pathol	6. 最初と最後の頁 136-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2020.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okita K, Okazaki S, Uejima S, Yamada E, Kaminaka H, Kondo M, Ueda S, Tokiwa R, Iwata R, Yamasaki A, Hayashi N, Ogura D, Hirotsu K, Yoshioka T, Inoue M, Masuko K, Masuko T	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel functional anti-HER3 monoclonal antibodies with potent anti-cancer effects on various human epithelial cancers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27414.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koizumi A, Narita S, Nakanishi H, Ishikawa M, Eguchi S, Kimura H, Takasuga S, Huang M, Inoue T, Sasaki J, Yoshioka T, Habuchi T, Sasaki T	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased fatty acyl saturation of phosphatidylinositol phosphates in prostate cancer progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49744-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Sato H., Narita S., Takahashi Y., Ishida M., Kashima S., Yamamoto R., Koizumi A., Nara T., Huang M., Numakura K., Saito M., Yoshioka T., Habuchi T.
2. 発表標題 Saturated fatty acid promotes prostate cancer development with tumor infiltrating regulatory T cell alteration in a Pten-deficient mouse model.
3. 学会等名 The 117th Annual Meeting of the American Urological Association (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sato H., Narita S., Takahashi Y., Ishida M., Kashima S., Yamamoto R., Koizumi A., Nara T., Huang M., Numakura K., Saito M., Yoshioka T., Habuchi T.
2. 発表標題 Specific Gut Microbial Environment in Lard Diet-Induced Prostate Cancer Development and Progression.
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sato H, Narita S, Yamamoto R, Koizumi A, Nara T, Kanda S, Numakura K, Saito M, Inoue T, Satoh S, Yoshioka T, Habuchi T
2. 発表標題 The impact of specific fat-diets and obesity on prostate cancer initiation and progression using two different immunocompetent mouse models
3. 学会等名 The 35th Annual EAU congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤博美, 成田伸太郎, 山本竜平, 小泉淳, 奈良健平, 神田壮平, 沼倉一幸, 齋藤満, 井上 高光, 佐藤滋, 吉岡年明, 羽瀨友則
2. 発表標題 PTENノックアウト前立腺癌マウスモデルにおいてラード食は全身炎症と腸内細菌叢の変化を介して前立腺癌進展を促進する
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤博美, 成田伸太郎, 山本竜平, 小泉淳, 奈良健平, 沼倉一幸, 齋藤満, 佐藤滋, 吉岡 年明, 羽瀨友則
2. 発表標題 2種の免疫応答性マウスモデルにおける特定の脂肪食が前立腺 癌発症・進展に及ぼす影響
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉岡 年明, 南條 博, 大森 泰文
2. 発表標題 肝細胞におけるHeregulin産生の機序についての検討
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	南條 博 (Nanjo Hiroshi) (70250892)	秋田大学・医学部附属病院・准教授 (11401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------