

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591599

研究課題名（和文） 肝硬変合併肝癌治療における肝星細胞機能阻害療法の開発

研究課題名（英文） Development of molecular medicine for hepatocellular carcinoma targeting on hepatic stellate cells

研究代表者

若林 剛 (WAKABAYASHI GO)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：50175064

研究成果の概要（和文）：がん間質相互作用は、腫瘍細胞の生物学的特性の形成に関与するばかりでなく、発生臓器の機能にも悪影響を与え、がん治療戦略の重要なテーマの1つである。肝炎・肝硬変等の肝線維症を背景として発症する肝癌は、肝線維症において重要な役割を担う、肝星細胞 (hepatic stellate cell: HSC) との相互作用は肝癌の生物学的特性に多大な影響を与えている可能性がある。本研究課題では、肝癌細胞株および肝 HSC 初代培養細胞株を用いて、肝癌—HSC 間の相互作用について解析を行った。肝癌細胞株および HSC いずれにおいても、肝内に豊富に存在する angiotensin II (AngII) の影響を受け、細胞増殖能および細胞浸潤能を上昇させることが明らかとなった。さらに、この背景には AngII- a disintegrin and metalloprotease domain (ADAM) -epidermal growth factor receptor (EGFR) のクロストークによる sHB-EGF (soluble heparin binding EGF) の分泌が関与していることが明らかとなった。さらに、現在降圧薬として頻用されている angiotensin receptor blocker (ARB) は、肝癌—HSC 間の相互作用を抑制し、肝癌細胞の増殖能および浸潤能を抑制する効果をしめした。AngII-ADAM-EGFR のクロストークによる肝癌細胞—HSC 間の相互作用は ARB による抑制が可能であり、新たな肝癌・肝線維症治療の標的分子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

For the development of new strategy targeting on the interaction between hepatocellular carcinoma (HCC) and hepatic stellate cells, we investigated the cross-talk; namely angiotensin II (AngII)-a disintegrin and metalloprotease domain (ADAM) - epidermal growth factor receptor (EGFR). In both cell types (HCC and HSC), the increase of proliferation/invasion activities by the administration of Ang II was observed. The transactivation (AngII-ADAM-EGFR) was inhibited by angiotensin receptor blocker (ARB) and/or ADAM inhibitor (TAPI2). These results suggested ARB and/or ADAM inhibitor will be new drugs for the treatment in both HCC and liver fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝癌, 肝星細胞, AngII, EGFR, ADAM

## 1. 研究開始当初の背景

がん間質相互作用は、腫瘍細胞の生物学的特性（増殖、浸潤・転移）の形成に関与するばかりでなく、発生臓器の機能にも悪影響を与え、がん治療戦略の立脚にとって、克服しなければならない重要なテーマの1つである。

肝内には肝星細胞（hepatic stellate cell: HSC）と呼ばれる間質細胞が存在し、肝炎・肝硬変などの慢性肝線維症で活性化し、がん細胞の増殖を誘導するサイトカインを分泌するだけでなく、線維化誘導による循環障害や再生障害などの臓器障害の原因となっている。肝硬変合併肝癌患者の治療においても、HSC と肝細胞の相互作用を解析し、その関係を断ち切ることは、新たな補助療法を探索する糸口となる。

肝では、renin-angiotensin system (RAS) の活性化が生じていることが報告されている。肝細胞は angiotensinogen の唯一の産生細胞であり、肝炎・肝硬変患者の肝組織内の angiotensin II (AngII) 濃度は十数倍にもなっている (1)。また、肝癌細胞は AngII type I receptor (AGTR1) を発現し、AngII 刺激により、細胞増殖能を亢進させる。HSC も AGTR1 を発現しており、AngII 刺激で活性化し、コラーゲンやマトリックスメタロプロテアーゼの過剰発現を起こす (myofibroblast change)。Lautrette らは、AngII 静注腎線維症モデルマウスで、①EGFR の dominant negative form を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、AngII の効果を抑制し、腎の線維化を抑制できること、さらに②ADAM17 (TACE, TNF  $\alpha$  converting enzyme) の阻害剤を投与すると同様の効果が得られることを明らかにした。さらに、AngII は腎ばかりでなく、肺、血管平滑筋細胞等で myofibroblast change を引き起こし、線維化を誘導する myofibroblastosis (筋線維芽細胞症) の原因薬剤として報告されている。肝硬変・肝癌組織では sHB-EGF (soluble heparin binding EGF) の濃度が上昇していることや、sHB-EGF を添加した肝癌細胞株では、細胞増殖能や浸潤・転移能が上昇することが報告されている。

本研究では、「肝癌患者における AngII-ADAM-EGFR のクロストークは、がん間質反応において肝線維化および肝癌細胞の浸潤・増殖能の形成に重要な役割を果たす」との仮説を証明する目的で、*in vitro* *in vivo* の実験系を行った。

## 2. 研究の目的

当該研究課題では、肝癌-肝星細胞の「がん間質相互作用」における AngII-ADAM-EGFR のクロストークの意義を *in vitro*, *in vivo* において解析し、肝癌治療における ADAM 阻害剤の有効性を検証する。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒト肝癌培養細胞株6株 (Alexander, HepG2, HLF, HuH7, Li-7, PLC/PRF/5) およびヒト肝星細胞初代培養細胞株1株 (LI-90)、ラット肝星細胞初代培養細胞株1株を対象として解析を行った。Western blotによる Ang II receptor type 1 (AGTR1)、ADAM (9, 10, 12, 17) family, EGFR の Western blot による解析を行った。Angiotensin receptor blocker (ARB: RNH-6270, Daiichi Sankyo) および ADAM inhibitor である TAPI-2 (Calbiochem)、抗リン酸化抗体を用いて western blot で評価した。EGFR/MAPK のリン酸化状態を評価した。細胞増殖にかんしては、ATP Assay (Promega) で解析し、細胞浸潤は Matrigel invasion assay (BD Biosciences) で行った。培養上清中の HB-EGF, TGF- $\alpha$  の濃度測定は R&D 社製の ELISA kit を使用し、中和抗体 (HB-EGF, TGF- $\alpha$ , ADAM9, 10, 12, 17) 添加時の細胞増殖試験、浸潤能の測定を行った。siRNA による ADAM9, 10, 12, 17 の knock down 実験に関しては、Invitrogene 社製のウイルスベクターを作製し解析を行った。

## 4. 研究成果

肝癌細胞株、肝星細胞ではそれぞれオートクライン、パラクライン的に AngII-ADAM-EGFR のクロストークが細胞の増殖、浸潤能の亢進に寄与して

いることが明らかにされた (図 1). ②AngII の選択的阻害剤は肝細胞癌における AngII-ADAM-EGFR のクロストークを遮断し, 細胞の増殖, 浸潤能を低下させた (図 2, 3). ③AngII-ADAM17-EGFR の効果阻害に ARB, TAPI-II が有効であり, 腫瘍細胞の増殖能の抑制が有効であることが示された (図 2, 3).

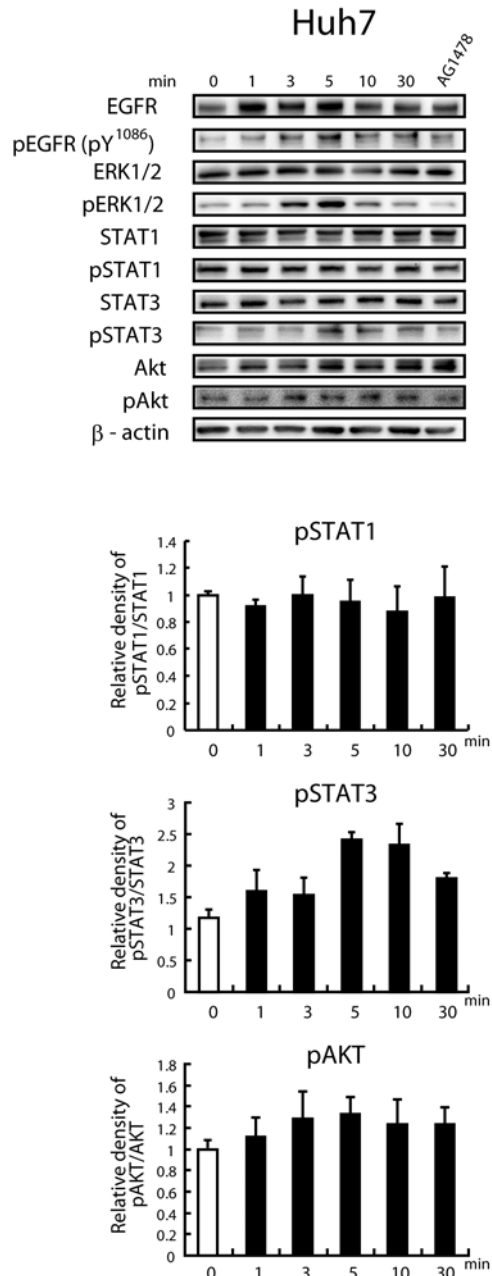


図 1 肝細胞癌に見られた AngII-EGFR の Transactivation.

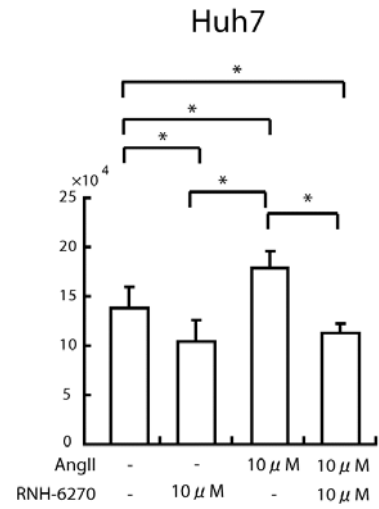


図 2 肝細胞癌に見られた ARB/ADAM inhibitor の増殖抑制効果

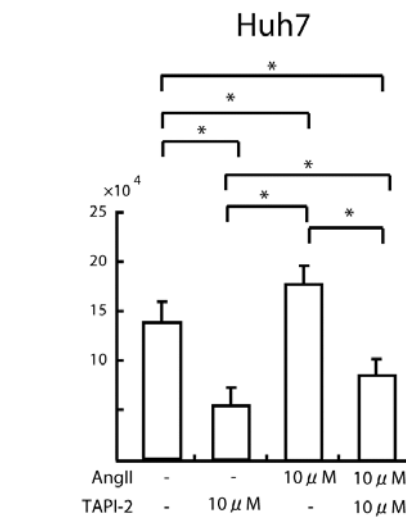
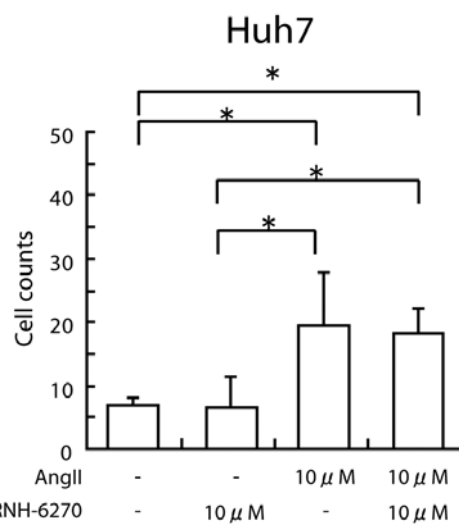


図 3 2 肝細胞癌に見られた ARB/ADAM inhibitor の浸潤能抑制効果



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 42 件)

1. Sugai T, Habano W, Jiao YF, Toyota M, Suzuki H, Tsukahara M, Koizuka H, Akasaka R, Koeda K, Wakabayashi G, Suzuki K. Molecular analysis of single isolated glands in gastric cancers and their surrounding gastric intestinal metaplastic mucosa. *Oncol Rep* 2010;**23**:25-33.
3. Sugai T, Habano W, Endoh M, Konishi Y, Akasaka R, Toyota M, Yamano H, Koeda K, Wakabayashi G, Suzuki K. Molecular analysis of gastric differentiated-type intramucosal and submucosal cancers. *Int J Cancer* 2010.
4. Shioi Y, Hasegawa T, Otsuka K, Fujisawa K, Itabashi T, Kimura T, Wakabayashi G, Mue Y, Uesugi N, Sugai T. Primary retroperitoneal spindle cell liposarcoma: pathological and immunohistochemical findings. *Pathol Int* 2010;**60**:472-6.
5. Sato H, Nakamura SI, Habano W, Wakabayashi G, Adachi Y. Human intestinal spirochetosis in northern Japan. *J Med Microbiol* 2010.
6. Sasaki R, Murata S, Oda T, Ohkohchi N, Takeda Y, Wakabayashi G. Evaluation of UICC-TNM and JSBS staging systems for surgical patients with extrahepatic cholangiocarcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 2010.
7. Sasaki A, Suto T, Nitta H, Shimooki O, Obuchi T, Wakabayashi G. Laparoscopic excision of retroperitoneal tumors: report of three cases. *Surg Today* 2010;**40**:176-80.
8. Sasaki A, Nitta H, Takahara T, Fujita M, Nakajima J, Obuchi T, Baba S, Umemura A, Otsuka K, Wakabayashi G. [Laparoscopic liver resection]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2010;**37**:396-8.
9. Sasaki A, Nitta H, Otsuka K, Kimura Y, Obuchi T, Wakabayashi G. Concomitant laparoscopic splenectomy and cholecystectomy. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2010;**20**:66-8.
10. Sasaki A, Koeda K, Obuchi T, Nakajima J, Nishizuka S, Terashima M, Wakabayashi G. Tailored laparoscopic resection for suspected gastric gastrointestinal stromal tumors. *Surgery* 2010;**147**:516-20.
11. Obuchi T, Sasaki A, Nitta H, Koeda K, Ikeda K, Wakabayashi G. Minimally invasive surgical enucleation for esophageal leiomyoma: report of seven cases. *Dis Esophagus* 2010;**23**:E1-4.
12. Nitta H, Sasaki A, Fujita T, Itabashi H, Hoshikawa K, Takahara T, Takahashi M, Nishizuka S, Wakabayashi G. Laparoscopy-assisted major liver resections employing a hanging technique: the original procedure. *Ann Surg* 2010;**251**:450-3.
13. Nakajima J, Sasaki A, Otsuka K, Obuchi T, Nishizuka S, Wakabayashi G. Risk factors for early postoperative small bowel obstruction after colectomy for colorectal cancer. *World J Surg* 2010;**34**:1086-90.
14. Wakabayashi G, Nitta H, Takahara T, Shimazu M, Kitajima M, Sasaki A. Standardization of basic skills for

- laparoscopic liver surgery towards laparoscopic donor hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009;**16**:439-44.
15. **Wakabayashi G.** Laparoscopic liver resection: how far can we go? *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009;**16**:403-4.
  16. Tsuchiya M, Otsuka Y, Tamura A, Nitta H, Sasaki A, **Wakabayashi G.** Kaneko H. Status of endoscopic liver surgery in Japan: a questionnaire survey conducted by the Japanese Endoscopic Liver Surgery Study Group. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009;**16**:405-9.
  17. Tomisawa Y, Ogasawara S, Kashiwaba M, Inaba T, Takeda Y, Sugimura Y, Hatakeyama G, Asahi H, **Wakabayashi G.** Mohs chemosurgery for local control of giant recurrent papillary thyroid cancer. *Thyroid* 2009;**19**:657-9.
  18. Takahashi M, Terashima M, Takagane A, Oyama K, Fujiwara H, **Wakabayashi G.** Ghrelin and leptin levels in cachectic patients with cancer of the digestive organs. *Int J Clin Oncol* 2009;**14**:315-20.
  19. Sugitachi A, Kimura Y, Itabashi T, Noda H, Ishida K, Nishizuka S, Otsuka K, Kashiwaba M, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Sasaki A, Ikeda K, Takamori Y, **Wakabayashi G.** [A novel formulation of cisplatin (CDDP)]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2009;**36**:2294-6.
  20. Sasaki A, Obuchi T, Nakajima J, Kimura Y, Koeda K, **Wakabayashi G.** Laparoscopic Heller myotomy with Dor fundoplication for achalasia: long-term outcomes and effect on chest pain. *Dis Esophagus* 2009.
  21. Sasaki A, Nitta H, Otsuka K, Takahara T, Nishizuka S, **Wakabayashi G.** Ten-year experience of totally laparoscopic liver resection in a single institution. *Br J Surg* 2009;**96**:274-9.
  22. Sasaki A, Nitta H, Otsuka K, Obuchi T, Kurihara H, **Wakabayashi G.** Endoscopic subtotal thyroidectomy: the procedure of choice for Graves' disease? *World J Surg* 2009;**33**:67-71.
  23. Obuchi T, Sasaki A, Shimooki O, Minakawa Y, Abe T, Nitta H, Otsuka K, Koeda K, Ikeda K, **Wakabayashi G.** [Local recurrence after surgical resection of pancreatic cancer effectively treated with combined chemoradiotherapy]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2009;**36**:991-4.
  24. Obuchi T, Sasaki A, Nakajima J, Nitta H, Otsuka K, **Wakabayashi G.** Laparoscopic surgery for splenic artery aneurysm. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2009;**19**:338-40.
  25. Nakajima J, Sasaki A, Obuchi T, Baba S, Nitta H, **Wakabayashi G.** Laparoscopic subtotal cholecystectomy for severe cholecystitis. *Surg Today* 2009;**39**:870-5.
  26. Kato K, **Maesawa C.** Itabashi T, Fujisawa K, Otsuka K, Kanno S, Tada H, Tatemichi Y, Kotani K, Oikawa H, Sugai T, **Wakabayashi G.** **Masuda T.** DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in

- colorectal cancer. *Int J Oncol* 2009;**35**:467-76.
27. Kashiwaba M, Inaba T, Takeda Y, Komatsu H, Kawagishi R, **Wakabayashi G**. [The ideal follow-up after breast cancer operation]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2009;**36**:1423-7.
28. Inaba T, Kashiwaba M, Takeda Y, Komatsu H, Tomisawa Y, Takiyama I, **Wakabayashi G**. [Palliative chemotherapy for metastatic breast cancer with capecitabine]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2009;**36**:769-72.
29. Habano W, Gamo T, Sugai T, Otsuka K, **Wakabayashi G**, Ozawa S. CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. *Int J Oncol* 2009;**34**:1085-91.
30. Baba S, Sasaki A, Nakajima J, Obuchi T, Koeda K, **Wakabayashi G**. Assessment of gastric motor function by cine magnetic resonance imaging. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;**24**:1401-6.
32. Watanabe T, Hoshino K, Tanabe M, Morikawa Y, Kawachi S, **Wakabayashi G**, Shimazu M, Kitajima M. Correlation of motility and neuronal integrity with a focus on the grade of intestinal allograft rejection. *Am J Transplant* 2008;**8**:529-36.
33. Suto T, Ito N, Obuchi T, Uesugi N, Sugai T, Nakamura SI, **Wakabayashi G**. [A case of complete response in supraclavicular lymph node involvement from cancer of the sigmoid colon to FOLFOX4 therapy after laparoscopy-assisted colectomy]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2008;**35**:669-72.
34. Sugitachi A, Otsuka K, Itabashi T, Chiba T, Kimura Y, Sasaki A, Ikeda K, Uesugi N, Takamori Y, Kurozumi S, Mori T, **Wakabayashi G** [Chitin/cisplatin--an adhesive anticancer drug]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2008;**35**:2021-3.
35. Spurrier B, Honkanen P, Holway A, Kumamoto K, Terashima M, Takenoshita S, **Wakabayashi G**, Austin J, Nishizuka S. Protein and lysate array technologies in cancer research. *Biotechnol Adv* 2008;**26**:361-9.
36. Sasaki A, Nitta H, Nakajima J, Obuchi T, Baba S, **Wakabayashi G**. Laparoscopic spleen-preserving distal pancreatectomy with conservation of the splenic artery and vein: report of three cases. *Surg Today* 2008;**38**:955-8.
37. Sasaki A, Nakajima J, Nitta H, Obuchi T, Baba S, **Wakabayashi G**. Laparoscopic cholecystectomy in patients with a history of gastrectomy. *Surg Today* 2008;**38**:790-4.
38. Sasaki A, Nakajima J, Ikeda K, Otsuka K, Koeda K, **Wakabayashi G**. Endoscopic thyroidectomy by the breast approach: a single institution's 9-year experience. *World J Surg* 2008;**32**:381-5.
39. Nishizuka S, Spurrier B, Honkanen P, Austin J, **Wakabayashi G**. [Application of quantitative proteomic analysis for cancer therapy using "reverse-phase" protein lysate microarrays]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2008;**35**:200-5.
40. Nishizuka S, Ishida K, Noda H, Takahashi M, **Wakabayashi G**. [High density 'reverse-phase' protein

- lysate microarray]. *Seikagaku* 2008;**80**:1047-54.
41. Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibazaki M, Yashima-Abo A, Kotani K, Oikawa H, Sakurai E, Izutsu N, Kato K, Komatsu H, Ikeda K, Wakabayashi G, Masuda T. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2008;**99**:280-6.
42. Itabashi H, Maesawa C, Oikawa H, Kotani K, Sakurai E, Kato K, Komatsu H, Nitta H, Kawamura H, Wakabayashi G, Masuda T. Angiotensin II and epidermal growth factor receptor cross-talk mediated by a disintegrin and metalloprotease accelerates tumor cell proliferation of hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatol Res* 2008;**38**:601-13.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若林 剛 (WAKABAYASHI GO)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50175064

### (2) 研究分担者

増田 友之 (MASUDA TOMOYUKI)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10199698

前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10326647

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：