

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間： 2007 ~ 2008

課題番号：19890151

研究課題名（和文） 原発性肝癌における転移・浸潤能の獲得に係わる上皮-間葉移行の分子機構の解明

研究課題名（英文） The molecular mechanism of endothelial-mesenchymal transition on the invasion and progression of primary liver cancer

研究代表者

杉町 圭史（SUGIMACHI KEISHI）

九州大学・医学研究院・寄附講座教員

研究者番号：90452763

研究成果の概要：

「肝内胆管癌においてE-cadherin転写抑制因子がEMTを誘導し、その結果として胆管癌の浸潤転移に重要な役割を果たしている」という仮説を証明するために研究を行った。肝内胆管癌切除症例46例においてその臨床病理学的因子を検討しデータベースを作成した。それぞれの切除標本よりDNA、RNAを抽出し遺伝子ライブラリーを作成した。免疫組織学的染色を行うために癌部非癌部のプレパラートを作成した。肝内胆管癌におけるEMTの指標であるE-cadherinの発現を免疫組織学的に解析した。抗E-cadherin抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、46例中21例(45.7%)において非癌部の正常肝組織に比べて癌部で明らかにE-cadherinの発現が減弱していることが判明した。さらにEMTを誘導する機序を解明するために、E-cadherin転写抑制因子であるSnailおよびTwistの発現を同一症例同一部位において免疫組織学的に検討した。Snailは46例中9例(19.6%)において癌部の核内に異常高発現がみられた。一方、Twistは46例中15例(32.6%)に腫瘍細胞の核内異常高発現が見られた。Twist高発現腫瘍では有意にE-cadherin発現が減弱していることが明らかになり($p<0.05$)、Twist発現が肝内胆管癌におけるEMTに関与していることが示唆された。臨床病理学的因子との相関の検討では、Snail高発現群においては術前腫瘍マーカーであるCEA・CA19-9が $53.1\text{ng/ml} \cdot 27289\text{U/ml}$ とSnail非発現群($2.6\text{ng/ml} \cdot 2933\text{U/ml}$)と比較して有意に高いことが明らかになり($p<0.05$)、腫瘍の悪性度と関連している可能性が示唆された。肝内胆管癌の重要な悪性度因子であるリンパ節転移や予後に関してはEMT関連分子の発現の有無との間に有意な関連を認めなかったが、今後症例数の蓄積が必要であると考えられた。肝内胆管癌においてEMTがその腫瘍の悪性度に関与している可能性が示唆されたため、今後はさらに肝内胆管癌細胞レベルにおける機能解析を進めていく必要がある。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,330,000 | 0 | 1,330,000 |
| 2008年度 | 1,350,000 | 405,000 | 1,755,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,680,000 | 405,000 | 3,085,000 |

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：医歯薬学 消化器外科学

キーワード：肝癌、上皮間葉移行、浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

近年、癌細胞の転移のメカニズムの一つとして epithelial-mesenchymal transition (EMT; 上皮間葉移行) という現象が注目されている。EMT とは上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、EMT の獲得が運動性の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすことから、癌細胞の浸潤や線維症との関連も示唆されている。

E-cadherin は上皮細胞間接着に寄与している代表的な接着分子であり、EMT 獲得と E-cadherin 発現が逆相関することから、EMT の代表的な指標の1つと言われている。肝癌を含め種々の癌においても E-cadherin 発現の減弱と腫瘍の悪性度が相関することが報告されており、EMT は腫瘍の浸潤・転移能の獲得に重要な役割を果たすと考えられている。E-cadherin の発現を抑制する機序の一つとして E-cadherin 発現調節転写因子による抑制があり、近年 E-cadherin 発現を抑制的に調節する分子として Snail、SIP1、Twist、E2A (E47/E12) などの転写因子が強力な EMT 誘導因子であることが分かってきた。そのためこれらの転写因子の解析は肝癌の転移・浸潤メカニズムの解明に極めて重要であると考ええる。

我々はこれまでに転写抑制因子 Snail が E-cadherin の発現を抑制することにより悪性腫瘍の悪性度が増すことを報告してきた。培養肝細胞癌細胞における *in vitro* の解析により Snail タンパクを強制発現させた結果、癌細胞の細胞膜において E-cadherin の発現が減弱することを報告した。さらに肝細胞癌や滑膜肉腫の切除標本における研究において Snail 発現と E-cadherin 発現が逆相関することを示してきた。これまでの研究にて EMT が誘導されることにより癌細胞が上皮細胞としての性格を失い、接着性の乏しい細胞になることが癌の転移や浸潤を起こすことが示されてきた。また細胞内で E-cadherin と結合する β -catenin も EMT に関連していることが報告されてきた。 β -catenin は adherens junction の裏打ちタンパクとして細胞接着に関わるだけでなく、 β -catenin 自体の変異により Wnt pathway が活性化し癌化に重要な役割を果たすことが分かってきた。E-cadherin の絶対量が減少した時には、 β -catenin は細胞質での機能が優位となり Wnt pathway や GSK-3 の制御を受けて核内での転写を調節し、c-myc や cyclin D などの転写

を上昇させる結果、細胞増殖を促進すると考えられる。我々は高頻度に転移を来す肝内胆管癌において β -catenin の核内移行が起こっていることや、cyclin D1 発現が増強していることを報告してきた。このことは癌細胞における EMT が、細胞の転移・浸潤能の獲得において様々なシグナルを通じて重要な役割を占めることを示唆していると考えられる。

このように EMT の獲得およびそれに関連した E-cadherin の発現調節は肝癌の悪性度と密接に関連していることが示唆されているが、未だその網羅的解析はなされていないのが現状である。したがって E-cadherin 転写抑制因子の発現を網羅的に肝癌臨床検体において解析することは、肝癌の転移・浸潤能獲得のメカニズム解明に迫り、肝癌特異的な分子標的治療の開発につながると考えられる。

2. 研究の目的

肝細胞癌に対して切除、局所療法、塞栓療法、肝移植などの集学的な治療が発展してきたがほとんどの患者がウイルス性肝炎や肝硬変を合併していることもあり、未だに治療後に高頻度に再発を来し、全症例の5年生存率は35.4%である。一方、肝内胆管癌に対しては肝切除が唯一の長期生存を望める治療法であるが、非常に転移しやすい性質を持つためにその治療成績は肝細胞癌よりもさらに悪く、切除後の5年生存率が32.7%、切除不能であれば17.4%という状況である。このような現況を踏まえると肝癌の治療成績の向上のためにはその腫瘍の性質を解析し、肝癌に特異的な分子標的治療を開発することが急務である。今回の研究の目的は、肝癌において E-cadherin 発現を調節する転写因子の発現・機能を解析することによりその転移・浸潤のメカニズムを解明し、さらに肝癌特異的な分子標的治療への応用の可能性について検討することである。

3. 研究の方法

(1) 肝癌手術症例の切除標本より癌部組織、非癌部組織を摘出した。研究室において免疫染色用の組織標本、分子生物学的解析用の DNA、RNA、cDNA を各々調整・保存し、遺伝子ライブラリーを作成した。

(2) 全対象症例において臨床的な背景因子、

肝機能因子、手術関連因子、病理組織学的因子、進行度、再発形式、予後について情報を収集し、詳細なデータベースを作成した。

(3) 対象症例の癌部および非癌部において、抗 E-cadherin 抗体を用いた免疫組織染色法を行い E-cadherin 蛋白発現の局在および定量を行った。

(4) 対象症例の癌部および非癌部において、抗 Snail 抗体および抗 Twist 抗体を用いた免疫組織染色法を行い Snail、Twist 蛋白発現の定量を行った。

(5) E-cadherin、Snail、Twist の組織におけるタンパク発現量および局在と臨床病理学的因子との相関を検討し、EMT の臨床的意義を解析した。

(6) 肝癌臨床検体における E-cadherin 転写抑制因子 Snail、Twist の mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR 法を用いて解析するための基礎的実験を行った。

4. 研究成果

(1) 肝内胆管癌切除症例46例においてその臨床病理学的因子を検討しデータベースを作成した。さらにそれぞれの切除標本よりDNA、RNAを抽出し遺伝子ライブラリーを作成した。免疫組織学的染色を行うために癌部非癌部のプレパラートを作成した。

(2) 抗E-cadherin抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、46例中21例(45.7%)において非癌部の正常肝組織に比べて癌部で明らかにE-cadherinの発現が減弱していることが判明した(図1)。E-cadherin転写抑制因子であるSnailおよびTwistの発現を同一症例同一部位において免疫組織学的に検討した。Snailは46例中9例(19.6%)において癌部の核内に異常高発現が見られた(図1)。一方、Twistは46例中15例(32.6%)に腫瘍細胞の核内異常高発現が見られた(図1)。

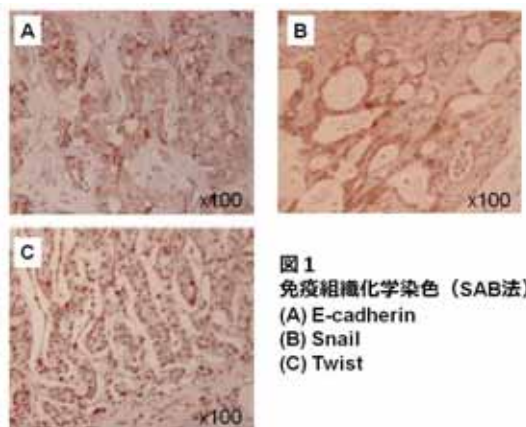


図1
免疫組織化学染色 (SAB法)
(A) E-cadherin
(B) Snail
(C) Twist

(3) E-cadherin発現とEMT関連転写抑制分子発現の相関を検討した。Twist高発現腫瘍では有意にE-cadherin発現が減弱していることが明らかになり(p<0.05)、Twist発現が肝内胆管癌におけるEMTに関与していることが示唆された(図2)。

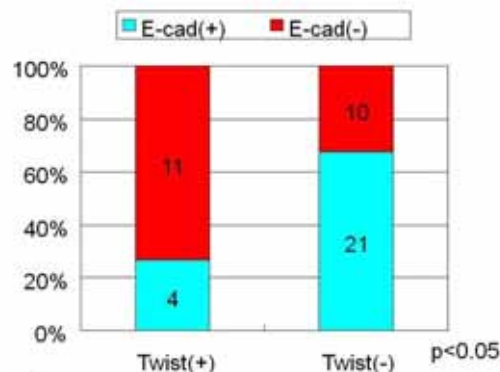


図2
Twist異常高発現とE-cadherin発現パターンの相関

(4) 臨床病理学的因子との相関の検討では、Snail高発現群においては術前腫瘍マーカーであるCEA・CA19-9が53.1ng/ml・27289U/mlとSnail非発現群(2.6ng/ml・2933U/ml)と比較して有意に高いことが明らかになり(p<0.05)、腫瘍の悪性度と関連している可能性が示唆された(表1)。肝内胆管癌の重要な悪性度因子であるリンパ節転移や予後に関してはEMT関連分子の発現の有無との間に有意な関連を認めなかったが、今後症例数の蓄積が必要であると考えられた。

表1
Snail異常高発現と術前腫瘍マーカーの相関

| 因子 | Snail(+) (n=9) | Snail(-) (n=37) | P value |
|--------|-------------------|--------------------|---------|
| CEA | 53.1±90.2 | 2.6±0.4 | p=0.014 |
| CA19-9 | 27289±15309 | 2933±1916 | p=0.003 |

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5件)

(1) Sugimachi K, Ikeda Y, Tomikawa M, et al. Appraisal of hepatic resection in the treatment of hepatocellular carcinoma with severe thrombocytopenia. World J Surg. 2008 Jun;32(6):1077-81. 査読有

(2) Iguchi T, Aishima S, Taketomi A, Nishihara Y, Fujita N, Sanefuji K, Sugimachi K, et al. Fascin overexpression

is involved in carcinogenesis and prognosis of human intrahepatic cholangiocarcinoma: immunohistochemical and molecular analysis. Hum Pathol. 2008 Oct 3. [Epub ahead of print]

(3) Yamashita Y, Taketomi A, Morita K, Fukuhara T, Ueda S, Sanefuji K, Iguchi T, Kayashima H, Sugimachi K, Maehara Y. The impact of surgical treatment and poor prognostic factors for patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: retrospective analysis of 60 patients. Anticancer Res. 2008 Jul-Aug;28(4C):2353-9. 査読有

(4) Iguchi T, Yamashita N, Aishima S, Kuroda Y, Terashi T, Sugimachi K, et al. A Comprehensive Analysis of Immunohistochemical Studies in Intrahepatic Cholangiocarcinoma Using the Survival Tree Model. Oncology. 2009 Mar 5;76(4):293-300. 査読有

(5) 山下洋市, 武富紹信, 杉町圭史, 丸山晴司, 吉住朋晴, 副島雄二, 前原喜彦. 肝内肝外胆管癌(胆道癌)に対する GFP 化学療法. 肝胆膵 第 55 巻第 5 号 (2007.11). 査読無

[学会発表](計 4 件)

(1) 杉町圭史, 武富紹信, 森田和豊, 福原崇介, 植田茂, 井口友宏, 實藤健作, 萱島寛人, 原田昇, 丸山晴司, 山下洋市, 吉住朋晴, 副島雄二, 前原喜彦. 非ウイルス性肝細胞癌発生における NASH の関与. 第 94 回日本消化器病学会総会(シンポジウム) 2008(H20)年 5 月 8 - 10 日 福岡

(2) 杉町圭史, 武富紹信, 森田和豊, 福原崇介, 植田茂, 井口友宏, 實藤健作, 萱島寛人, 原田昇, 丸山晴司, 山下洋市, 吉住朋晴, 副島雄二, 前原喜彦. 肝胆膵外科手術における Mortality ゼロを目指した取り組み ~術後肝不全と腹腔内出血の予防と対策~. 第 20 回日本肝胆膵外科学会・学術集会(教育パネルディスカッション) 2008(H20)年 5 月 28 - 30 日 山形.

(3) 杉町圭史, 武富紹信, 武石一樹, 戸島剛男, 福原崇介, 森田和豊, 植田茂, 實藤健作, 井口友宏, 永田茂行, 池上徹, 祇園智信, 副島雄二, 前原喜彦. 大型肝細胞癌に対する術前リピオドリゼーションの有効性. 第 17 回日本癌病態治療研究会(ワークショップ) 2008 年 6 月 26 日 ~ 27 日 京都

(4) 杉町圭史, 武富紹信, 祇園智信, 戸島剛男, 武石一樹, 森田和豊, 福原崇介, 植田茂, 實藤健作, 井口友宏, 永田茂行, 池上徹, 副島雄二, 前原喜彦. 肝細胞癌における脈管浸潤の意義に関する検討. 第 46 回日本癌治療学会総会 2008 年 10 月 30 日 ~ 11 月 1 日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉町 圭史 (SUGIMACHI KEISHI)
九州大学・医学研究院・寄附講座教員
研究者番号: 90452763

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし