

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590371

研究課題名(和文) 肝細胞癌－肝星細胞間のがん間質相互作用における ADAM の役割と分子機構の解明

研究課題名(英文) A study for the role of ADAMs in the relationship between hepatocellular carcinoma and hepatic stellate cells.

研究代表者

小谷 康慈 (Kotani KOJI)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：50433488

研究成果の概要(和文)：肝の線維化には、肝星細胞(hepatic stellate cell:HSC)が重要な役割を担っている。HSCは正常肝ではvitamin Aを貯蔵し、静止期と呼ばれる状態にある。肝臓に肝炎ウイルスやアルコールによる慢性的な障害が加わると、肝細胞、Kupffer細胞、リンパ球、類洞内皮といった周囲の細胞から分泌されるサイトカインの影響を受け、形質転換を起し、増殖能の亢進や細胞外マトリックスを過剰発現する活性化した状態になる。また、活性化したHSC自体も様々なサイトカインを分泌し、オートクライン・パラクラインに肝臓の炎症および線維化を増悪させる。当該研究課題では、ADAM(A disintegrin metalloprotenase) familyのknock-down inducible cloneによる同所移植モデルを用いて、肝癌細胞－活性型肝星細胞間の「がん－間質相互作用」におけるADAM familyの役割について*in vivo*で解析を試みた。テトラサイクリン添加時にADAM family(ADAM17)をknockdownすることが可能な、ヒト肝癌細胞(Tet-kADAM-HepG2)、ヒト活性型星細胞(Tet-kADAM-LI-90)の作製を試みた。当所、knockdown効率が不良でvectorの種類をInvitrogenからClonetechに変更して効率の良いクローンを選択した。Tet-kADAM-LI-90およびTet-kADAM-HepG2と親株であるLI-90/HepG2の相互co cultureでは、がん間質相互作用による、細胞運動能、増殖能の低下が確認された。ADAM17は肝癌－肝星細胞間の相互作用に重要な役割を果たし、分子標的治療薬のターゲットに成り得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have attempted to develop the model of relationship between hepatocellular carcinoma and hepatic stellate cells. For the purpose, we constructed two inducible clones (Tet-kADAM-HepG2 and Tet-kADAM-LI-90). However, both we failed to the cloning of both transfectans. We generated other clones using another system, co-culture markedly decrease tumor cell growth and invasion activity. Thus, the relationships between HSC and hepatocellular carcinoma might contribute to hepatocellular carcinoma development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：人体病理

科研費の分科・細目：

キーワード：肝、星細胞、間質、ADAM、相互作用

1. 研究開始当初の背景

本邦における肝炎ウイルスの汚染率は高く、肝炎・肝硬変などの肝線維症を経て肝癌を発症する例が多く、大きな社会的問題となっている。肝の線維化には、肝星細胞 (hepatic stellate cell:HSC) が重要な役割を担っている。HSC は正常肝では vitamin A を貯蔵し、静止期と呼ばれる状態にある。肝臓に肝炎ウイルスやアルコールによる慢性的な障害が加わると、肝細胞、Kupffer 細胞、リンパ球、類洞内皮といった周囲の細胞から分泌されるサイトカインの影響を受け、形質転換を起し、増殖能の亢進や細胞外マトリックスを過剰発現する活性化した状態になる。また、活性化した HSC 自体も様々なサイトカインを分泌し、オートクライン・パラクラインに肝臓の炎症および線維化を増悪させる。

このような肝線維症を背景に発症する肝癌において、背景肝に存在する活性型 HSC から放出される液性因子は、がん細胞の増殖・浸潤・転移能といったがんの生物学的特性に反映され、患者の生命予後に大きな影響をおよぼす。肝癌において、背景肝と肝癌細胞間に生じる「がん-間質相互作用」を制御することは、肝癌の治療戦略を考える上においても重要なことである。

当研究室では、*in vitro* において HSC の形質転換や肝癌細胞の増殖・浸潤能に、膜型のメタロプロテアーゼである ADAM (A disintegrin metalloproteinase) 17 が重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。活性型 HSC で過剰発現している ADAM17 は、細胞膜上の TNF α をプロセシングし、オートクラインあるいはジャクスタクライン的に HSC の活性化を誘導する。肝癌細胞株で過剰発現している ADAM17 の抑制は、G protein-coupled receptors 刺激による EGFR とのクロストークを遮断し、肝癌細胞株の増殖・浸潤能を抑制する。また、Mazzocca らが活性型 HSC から分泌される ADAM 9-S が、転移性肝癌の浸潤を促進することを示した。

ADAM family は、肝癌細胞とその背景肝に存在する活性型 HSC の「がん-間質相互作用」に重要な役割を担っている可能性がある。しかし、これまでの報告はいずれも *in vitro* の実験結果による推測であり、*in vivo* での詳細な研究報告はない。当該研究課題では、ADAM family の knock-down inducible clone による同所移植モデルを用いて、肝癌細胞-活性型肝星細胞間の「がん-間質相互作用」における ADAM family の役割について *in vivo* で解析した。

2. 研究の目的

肝細胞癌と背景肝の活性型肝星細胞 (hepatic stellate cell: HSC) 間に生じている「がん-間質相互作用」において、ADAM (disintegrin and metalloproteinase) が主要な役割を担っていることを明らかにするために、肝癌同所移植モデルを用いて解析する。

当該研究課題では、SCID マウスにヒト肝細胞癌株およびヒト肝星細胞株を移植する、同所異種移植モデルを作成して、conditional に ADAM family を knock-down することで、*in vivo* におけるがん-間質相互作用に対する影響を観察する。この研究は以下の Step で行われる。

STEP1: Inducible cloneの作成: テトラサイクリン添加時に ADAM family を knock down することが可能な、ヒト肝癌細胞 (Tet-kADAM-HepG2)、ヒト活性型星細胞 (Tet-kADAM-LI-90) を作製する。

STEP2: Inducible clone の co-culture による相互作用の解析: Tet-kADAM-HepG2、Tet-kADAM-LI-90 を、各々の Mock transfectant と共培養し、テトラサイクリン存在下で、細胞の増殖・浸潤・遊走能に与える影響、およびそのシグナル伝達系を解析する。

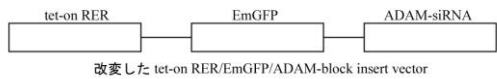
STEP3: Inducible clone による同所異種移植モデルの確立: Tet-kADAM-HepG2、Tet-kADAM-LI-90 を用いて同所異種移植モデルを作成する。Vector に siRNA と同時に組み込んである EmGFP を指標に、がん-間質相互作用を生じている部分を特定し、組織学的解析・分子機構の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) HSC の分離・培養

Block-it Pol II miR RNAi Expression Vector (invitrogen) を改変し、tet-on RER/EmGFP/ADAM-block insert を作製し、pAd/CMV/V5-DEST (invitrogen) に組込む。

本 Vector は図に示すように、ADAM family を knock-down する siRNA と EmGFP 蛋白を同時に発現するようにデザインされている。これまでに HepG2 を用いて、ADAM17 についても knock-down する Tet-kADAM17-HepG2 を作製する。



Tet-kADAM17-HepG2におけるADAM17タンパクの抑制(左)とEmGFPの発光(右)

ADAM17に加えて、3つのADAM familyについて(ADAM9, 10, 12) vectorを作製し、2種類の細胞(HepG2, LI-90)のinducible knock-down cloneを作製する。各々のinducible knock-down cloneについて、ADAMのmRNA/proteinでの発現レベルの定量は勿論のこと、「がん-間質相互作用」を担うと推測されるTNF α 、ADAMによってプロセシングされ細胞の増殖に影響を与えると推測される、HB-EGF、TNF α 、amphiregulin, epiregulinの発現レベルを定量PCRおよびwestern blotで解析する。また、これらの分子については培養上清中の濃度もELISAで測定する。

また、肝癌細胞の増殖はATP assay (Promega)で評価し、浸潤転移能の評価にはMatrigel invasion assay (BD Biosciences)あるいはwound healing assayで評価する。

さらに、細胞増殖のシグナル解析に関しては、MAPK系を、浸潤転移能のシグナル伝達系はRho/Racの解析を行う。

(2) Inducible cloneによる同所異種移植モデルを用いた解析

肝癌細胞株のSCIDマウス同所異種移植モデル作製に関する予備実験で決定した条件下で、ジメチルニトロソアミンによる肝炎刺激を生じさせる。解析項目はcolony数、腫瘍量、免疫組織学的評価(ADAM蛋白、HB-EGF、TNF α 、amphiregulin, epiregulinの発現とdesminを指標とした活性型HSCの数)、分子機構に関する解析。以上に関して、テトラサイクリン刺激下と非刺激下で比較する。

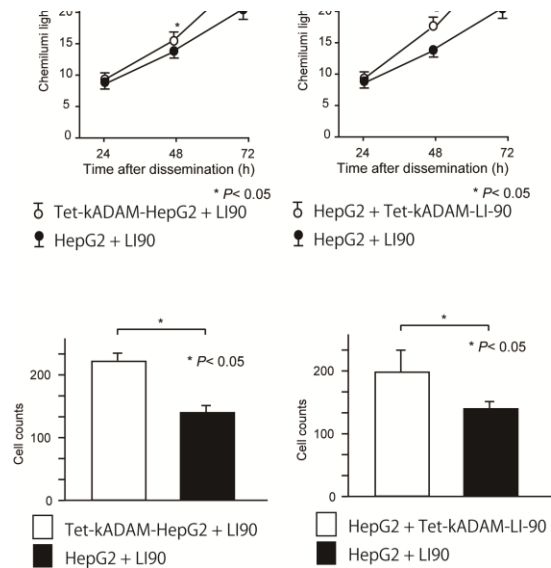
4. 研究成果

(1) inducible クローンの作製

研究当初 Invitrogen の vector を用いて、ヒト肝癌細胞(Tet-kADAM-HepG2)およびヒト活性型星細胞(Tet-kADAM-LI-90)の作製を試みた。しかし、knockdown 効率が不良であり、Clontechに変更した。ここまでの間研究の1年半を費やし、同所異種移植モデルの検討が研究期間内に終了しなかった。

(2) 肝癌培養細胞株 inducible clone での HSC との co-culture による細胞増殖能・運動能に与える影響

両者を各々別に induce した細胞を相手方の親細胞株と別個に12時間 co-culture し、細胞の運動能・増殖能を評価した。ADAM17の induce は、肝癌細胞株 Tet-kADAM-HepG2 単独でもその細胞の増殖能・運動能を増加させた。さらに HSC との co-culture ではさらにその運動能・増殖能を増加させた。同様に HSC の ADAM17 induce でも。このことは、活性型 HSC の ADAM17 induce でも HepG2 の運動能・増殖能を増加させた。以上のことは肝癌細胞株の増殖能・運動能は自身の ADAM17 の分泌ばかりでなく、周囲の活性型の HSC から分泌される ADAM17 にも影響を受けることが明らかとなった。



(3) SCID マウス同所異種移植モデル作製

現在までに SCID マウスで Tet-kADAM-HepG2 の正着は確認できたが、induce が不十分で、肝臓組織内での薬物代謝がその影響と考えられた。本モデルの確立のためにはさらなる工夫が必要であった。

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17件)

1. E. Sakurai, C. Maesawa. Down-regulation of microRNA-211 is involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) in melanoma cells. Int J Oncol, in press (2011)

2. K. Tsunoda, H. Oikawa, H. Tada, Y. Tatemichi, S. Muraoka, S. Miura, M. Shibazaki, F. Maeda, K. Takahashi, T. Akasaka, T. Masuda, C. Maesawa, Nucleus Accumbens-Associated 1 Contributes to Cortactin Deacetylation and Augments the Migration of Melanoma Cells. *J Invest Dermatol*, in press (2011).
3. H. Kuroda, K. Kakisaka, Y. Tatemichi, K. Sawara, Y. Miyamoto, K. Oikawa, A. Miyasaka, Y. Takikawa, T. Masuda, K. Suzuki, Non-invasive evaluation of liver fibrosis using acoustic radiation force impulse imaging in chronic hepatitis patients with hepatitis C virus infection. *Hepatology* 57 (2010) 1203-1207.
4. Y. Tatemichi, H. Oikawa, C. Maesawa, J. Ambo, M. Sato, H. Koike, T. Sata, T. Fujioka, T. Masuda, Detection of human papillomavirus in a urothelial carcinoma mimicking urethral caruncle. *Int J Urol* 17 (2010) 189-191.
5. T. Takahashi, K. Takahashi, M. Yamashina, C. Maesawa, T. Kajiura, H. Taneichi, N. Takebe, Y. Kaneko, T. Masuda, J. Satoh, Association of the TNF- α -C-857T polymorphism with resistance to the cholesterol-lowering effect of HMG-CoA reductase inhibitors in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33 (2010) 463-466.
6. H. Oikawa, K. Hayashi, C. Maesawa, T. Masuda, K. Sobue, Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 316 (2010) 940-950.
7. A. Miyamoto, K. Akasaka, H. Oikawa, T. Akasaka, T. Masuda, C. Maesawa, Immunohistochemical Study of HER2 and TUBB3 Proteins in Extramammary Paget Disease. *Am J Dermatopathol* (2010).
8. K. Yamauchi, H.M. Piao, T. Nakadate, T. Shikanai, Y. Nakamura, H. Ito, T. Mouri, H. Kobayashi, C. Maesawa, T. Sawai, H. Ohtsu, H. Inoue, Enhanced goblet cell hyperplasia in HDC knockout mice with allergic airway inflammation. *Allergol Int* 58 (2009) 125-134.
9. A.D. Russa, C. Maesawa, Y. Satoh, Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in G1/S phase-synchronized cells. *J Electron Microsc (Tokyo)* 58 (2009) 321-329.
10. T. Satoh, E. Sakurai, H. Tada, T. Masuda, Ontogeny of reticular framework of white pulp and marginal zone in human spleen: immunohistochemical studies of fetal spleens from the 17th to 40th week of gestation. *Cell Tissue Res* 336 (2009) 287-297.
11. Y. Nagata, C. Maesawa, H. Tada, Y. Takikawa, A. Yashima-Abo, T. Masuda, Differential microRNA expression between bone marrow side population cells and hepatocytes in adult mice. *Int J Mol Med* 24 (2009) 35-43.
12. Y. Minami, M. Satoh, C. Maesawa, Y. Takahashi, T. Tabuchi, T. Itoh, M. Nakamura, Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 39 (2009) 359-367.
13. K. Kato, C. Maesawa, T. Itabashi, K. Fujisawa, K. Otsuka, S. Kanno, H. Tada, Y. Tatemichi, K. Kotani, H. Oikawa, T. Sugai, G. Wakabayashi, T. Masuda, DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in colorectal cancer. *Int J Oncol* 35 (2009) 467-476.
14. K. Akasaka, C. Maesawa, M. Shibazaki, F. Maeda, K. Takahashi, T. Akasaka, T. Masuda, Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. *J Invest Dermatol* 129 (2009) 1516-1526.
15. S. Mitomo, C. Maesawa, S. Ogasawara, T. Iwaya, M. Shibazaki, A. Yashima-Abo, K. Kotani, H. Oikawa, E. Sakurai, N. Izutsu, K. Kato, H. Komatsu, K. Ikeda, G. Wakabayashi, T. Masuda, Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 99 (2008) 280-286.
16. N. Izutsu, C. Maesawa, M. Shibazaki, H. Oikawa, T. Shoji, T. Sugiyama, T. Masuda, Epigenetic modification is involved in aberrant expression of class III beta-tubulin, TUBB3, in ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 32 (2008) 1227-1235.
17. H. Itabashi, C. Maesawa, H. Oikawa, K. Kotani, E. Sakurai, K. Kato, H. Komatsu, H. Nitta, H. Kawamura, G. Wakabayashi, T. Masuda, 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 38 (2008) 601-613.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 康慈 (KOTANI KOJI)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：50433488

(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

及川 浩樹 (OIKAWA HIROKI)

岩手医科大学・医・講師

研究者番号：50285582

(3) 連携研究者

()

研究者番号：