

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591981

研究課題名(和文) 肝細胞癌における背景肝の線維化ならびに抗癌治療誘発 EMT 抑制に関する研究

研究課題名(英文) Research on inhibition of anti-cancer treatment-induced EMT and fibrosis in the background liver and hepatocellular carcinoma

研究代表者

田島 秀浩 (TAJIMA, HIDEHIRO)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：00436825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：癌の転移・浸潤や組織の線維化において上皮間葉転換(EMT: Epithelial mesenchymal transition)が注目されているが、抗癌治療そのものにより癌細胞にEMTが誘導されることが近年話題となっている。ヒストン脱アセチル酵素(HDAC)阻害薬やタキサン系抗癌剤の少量投与が細胞のEMTを抑制するとともに組織の線維化も抑制することが知られている。今回の研究においてタキサン系薬剤paclitaxelが原発性肝癌(肝内胆管癌)細胞株のEMTを抑制し、paclitaxelおよびHDAC阻害薬(バルプロ酸ナトリウム)が肝星細胞の活性化を抑制することを実験的に示し、報告した。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tissue fibrosis and cancer metastasis and invasion has been noted, but the EMT is induced in cancer cells by anti-cancer therapy itself has become a hot topic in recent years. It is well known that tissue fibrosis and EMT are inhibited by low dose administered taxan and histone deacetylase (HDAC) inhibitor. It has been shown that paclitaxel suppresses the induction of EMT in primary liver cancer (intrahepatic cholangiocarcinoma) cell line in the current study, HDAC inhibitors (sodium valproate) and paclitaxel inhibited activation of hepatic stellate cells.

研究分野：肝臓外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード：上皮間葉転換 癌幹細胞 肝星細胞 癌間質 肝癌

1. 研究開始当初の背景

肝の線維化には肝星細胞が重要な役割を担っている。星細胞は非活動期には上皮系マーカーを発現しているが、活動期に入ると上皮間葉転換(EMT: Epithelial mesenchymal transition)を生じて筋線維芽細胞に分化するといわれている。一方、肝細胞癌の浸潤や転移においても EMT が大きな役割を担うことが他臓器の癌とともに報告されているが、ラジオ波凝固療法(RFA)の熱刺激や 5FU などの抗癌剤、放射線照射、動脈塞栓術(TAE)などの抗癌治療そのものにより癌細胞に EMT が誘導されることが近年話題となっている。我々も肝細胞癌における RFA 後再発症例では初発例に比して組織分化度が低下している傾向があり、EMT marker を高率に発現していることを報告してきた。

近年、バルプロ酸ナトリウム(VPA)などのヒストン脱アセチル酵素(HDAC)阻害薬やタキサン系抗癌剤の少量投与が細胞の EMT を抑制することが注目されているが、これらの薬剤は細胞の EMT を抑制するとともに組織の線維化も抑制することが知られている。この理論は狭心症において冠動脈に用いられる薬剤溶出性ステントにおいてすでに臨床応用されており、筋線維芽細胞の抑制効果が実臨床において確認されている。ラットにおける実験では HDAC 阻害薬により肝星細胞の活性を抑制する可能性があることが論じられており、これらの薬剤により肝の線維化が抑制あるいは遅延出来れば肝炎患者の予後を改善するとともに発癌を抑制できる可能性があると考えられる。HDAC 阻害薬やタキサン系抗癌剤の少量投与は肝星細胞の EMT を抑制することで肝の線維化を抑制する効果に加えて RFA、化学療法、放射線療法や動脈塞栓術による低酸素状態などの抗癌治療により誘発される腫瘍の EMT を抑制することで転移や再発を抑制する効果を併せ持つ可能性があるため、慢性肝炎を基礎疾患として有す

る肝細胞癌患者に対する抗癌治療の効果を最大限に引き出し、予後を改善する可能性がある。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、HDAC 阻害薬として抗てんかん薬として臨床応用されているバルプロ酸ナトリウム(VPA)、タキサン系抗癌剤として paclitaxel を用いて、原発性肝癌(肝内胆管癌)細胞株および肝星細胞株における EMT 誘導抑制が可能であるかを検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝星細胞における HDAC 阻害剤を用いた活性化抑制効果およびその機序についての検討

ヒト肝星細胞株(Li-90)を用いて、TGF-による活性化誘導を行い、培養上清中に HDAC 阻害薬(VPA)を加えることで活性化の抑制が得られるか否かを検討した。VPAの細胞毒性を MTS assay にて検討し、細胞毒性を示さない濃度で VPA を作用させて星細胞株における collagen 1 合成抑制効果を Western blot 法にて検討した。また、VPA の作用機序検索目的として Smad 蛋白の発現およびリン酸化を Western blot 法にて検討した。

(2) 肝星細胞における Paclitaxel を用いた活性化抑制効果およびその機序についての検討

ヒト肝星細胞株(Li-90)を用いて、TGF-による活性化誘導を行い、培養上清中に Paclitaxel (PTX) を加えることで活性化の抑制が得られるか否かを検討した。PTX の細胞毒性を MTS assay および flowcytometry にて検討し、細胞毒性を示さない濃度で PTX を作用させて星細胞株における collagen 1 合成抑制効果を Western blot 法および real time RT-PCR

にて検討した。

また、PTX の作用機序の検索を目的として Smad 蛋白の発現およびリン酸化を Western blot 法および real time RT-PCR にて検討した。

(3) 肝内胆管癌細胞における Paclitaxel を用いた EMT 抑制効果についての検討

ヒト肝内胆管癌細胞株 (CCKS-1) を用いて、TGF- β による EMT 誘導を行い、培養上清中に Paclitaxel (PTX) を加えることで EMT 誘導の抑制が得られるか否かを検討した。PTX の細胞毒性を MTT assay および flowcytometry にて検討し、細胞毒性を示さない濃度で PTX を作用させて肝内胆管癌細胞株における上皮間葉系マーカー (E/N-cadherin, vimentin, -catenin, α -SMA) を Western blot 法で検索することで EMT 誘導抑制効果を検討した。

4 . 研究成果

(1) ヒト肝星細胞株 (Li-90) に TGF β を作用させると形態が紡錘形となり、collagen 1 産生能の亢進を認めるが、これに VPA を有意な毒性を示さない 1 mM で作用させると、形態変化が抑制され、collagen 1 産生も有意に抑制された。VPA を作用させた Li-90 においては Smad 2,3 のリン酸化が有意に抑制されており、VPA は Smad 2,3 蛋白のリン酸化を抑制することで Li-90 の活性化を抑制していると考えられた。

(2) Li-90 に TGF β を作用させると SMA および collagen 1 産生能の亢進を認めるが、これに PTX を有意な毒性を示さない 5 nM で作用させると、SMA および collagen 1 産生、培養上清中への collagen 1 分泌が有意に抑制された。また、PTX を作用させた Li-90 においては Smad 2,3 のリン酸化が mRNA および蛋白レベルで有意に抑制されており、PTX

は Smad 2,3 のリン酸化を抑制することで Li-90 の活性化を抑制していると考えられた。

(3) ヒト肝内胆管癌細胞株 (CCKS-1) に TGF β を作用させると上皮系マーカーである E-cadherin 発現の減弱と間葉系マーカーである N-cadherin, vimentin, SMA の発現増強を生じ、EMT が誘導された。これに、PTX を有意な細胞毒性を生じない濃度 (1-5 nM) で加えると上皮系マーカー発現の回復と間葉系マーカー発現減弱を認め、EMT が抑制された。

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 3 件)

1) Hirose A, Tajima H, Ohta T, Tsukada T, Okamoto K, Nakanuma S, Sakai S, Kinoshita J, Makino I, Furukawa H, Hayashi H, Nakamura K, Oyama K, Inokuchi M, Nakagawara H, Miyashita T, Takamura H, Ninomiya I, Kitagawa H, Fushida S, Fujimura T, Harada S. Low-dose paclitaxel inhibits the induction of epidermal-mesenchymal transition in the human cholangiocarcinoma CCKS-1 cell line. *Oncol Let* 6, 915-920, 2013. DOI:

10.3892/ol.2013.1494. (査読あり)

2) Okamoto K, Tajima H, Nakanuma S, Sakai S, Makino I, Kinoshita J, Hayashi H, Nakamura K, Oyama K, Nakagawara H, Fujita H, Takamura H, Ninomiya I, Kitagawa H, Fushida S, Fujimura T, Harada S, Wakayama T, Iseki S, Ohta T. Angiotensin II enhances epithelial- to-mesenchymal transition through the interaction between activated hepatic stellate cells and the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis in

intrahepatic cholangiocarcinoma.

Int J Oncol 41:573-582, 2012.

DOI: 10.3892/ijo.2012.1499. (査読あり)

3) Watanabe T, Tajima H, Hironori H, Nakagawara H, Ohnishi I, Takamura H, Ninomiya I, Kitagawa H, Fushida S, Tani T, Fujimura T, Ohta T, Wakayama T, Iseki S, Harada S. Sodium valproate blocks the transforming growth factor (TGF)- 1 autocrine loop and attenuates the TGF- 1-induced collagen synthesis in a human hepatic stellate cell line. Int J Mole Med 28: 919-925, 2011.

DOI: 10.3892/ijmm.2011.768. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1) 田島秀浩、真橋宏幸、廣瀬淳史、渡邊利史、岡本浩一、中沼伸一、正司政寿、牧野 勇、林 泰寛、尾山勝信、中川原寿俊、宮下知治、高村博之、北川裕久、太田哲生. 胆道癌に対する low dose Paclitaxel 療法の基礎的検討. 第 51 回 日本癌治療学会学術集会 平成 25 (2013)年 10月24日(木)国立京都国際会館(京都府)

2) 田島秀浩、太田哲生、中沼伸一、岡本浩一、酒井清祥、牧野 勇、林 泰寛、尾山勝信、中川原寿俊、宮下知治、高村博之、二宮 致、北川裕久、伏田幸夫、藤村 隆. 胆道癌に対する low dose Paclitaxel 療法の上皮間葉転換(EMT)抑制に関する実験的検討および臨床的效果. 第 49 回 日本胆道学会学術集会 平成 25 (2013)年 9月20日(金)ヒルトン東京ベイ(千葉県)

3) 真橋宏幸、田島秀浩、廣瀬淳史、渡邊利史、岡本浩一、中沼伸一、酒井清祥、林 泰寛、中川原寿俊、高村博之、二宮 致、北川裕久、伏田幸夫、藤村 隆、太田哲生. Experimental research on effect of low-dose paclitaxel for fibrosis in human hepatic stellate cells. 第 22 回 日本がん転移学会学術集会 平成 25

(2013)年 7月12日(金)ホテルブエナビスタ(長野県)

4) 廣瀬淳史、田島秀浩、牧野 勇、中村慶史、林 泰寛、尾山勝信、井口雅史、中川原寿俊、藤田秀人、高村博之、二宮 致、北川裕久、藤村 隆、太田哲生. Low-dose paclitaxel inhibits the induction of EMT in a human cholangiocarcinoma cell line, CCKS-1 第 21 回日本がん転移学会学術集会/総会平成 24 (2012)年7月12日(木) オリエンタルホテル広島(広島県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田島 秀浩 (TAJIMA HIDEHIRO)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：00436825

(2)研究分担者

太田 哲生 (OHTA TETSUO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40194170