

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592001

研究課題名(和文) Plakin Family 蛋白発現制御による肝内胆管癌治療戦略

研究課題名(英文) The plakin family proteins can be therapeutic targets for intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

宇山 直樹 (Uyama, Naoki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：70402873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Plakin Family 蛋白は遺伝性水疱症で研究されている細胞骨格蛋白群である。これらのうち、plectin, desmoplakinに注目し実験を行った。ヒト肝内胆管癌組織を用いて免疫染色を行ったところ上記蛋白の存在を認めた。また、plectin と complex を形成する integrin alpha 6 beta4 および desmoplakin の結合蛋白である desmocollin desmoglein の発現も確認した。肝内胆管癌細胞株を用いてこれらのタンパクの遺伝子発現抑制実験を行ったが、明らかな癌細胞機能への関与は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Plakin Family consists of cytoskeletal proteins such as plectin, desmoplakin and so on. In this project, we investigated expression of plectin and desmoplakin in human intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and their functions. Immunohistochemistry revealed that these proteins were expressed by cancer cells as well as fibroblasts. In addition, integrin alpha6 and beta4, binding proteins of plectin, and desmocollin desmoglein, binding proteins of desmoplakin, were also expressed by cancer cells. Gene depletion experiments with siRNA for these proteins revealed that they did not regulate ICC cell lines function, such as proliferation ability, migration ability and ability for activating fibroblasts.

研究分野：肝内胆管癌

キーワード：肝内胆管癌 Plakin 癌細胞 線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我々は今までに、中間系フィラメントである synemin、actin binding protein である fascin といった細胞骨格タンパクが細胞機能制御に深くかかわっていることを報告してきた。Plakin Family タンパクは上皮や筋肉などのメカニカルストレスを感じる部位に発現し、細胞骨格フィラメントと細胞膜の junctional complex をリンクし組織や細胞の integrity を維持していると考えられている。

Plakin Family は plectin, desmoplakin, BPAG1, MACF, envoplakin, periplakin, epiplakin など7つの分子から構成されている。Plectin は血管内皮細胞における focal adhesion にて actin と中間径フィラメントをリンクするタンパクで、血管新生能や遊走能にかかわっている報告がなされている。また、これらの分子を標的にする自己免疫性疾患や遺伝性疾患の多くは自己免疫性水疱症の症状を呈し、皮膚の脆弱性に深くかかわっていると報告されている。そこで我々は、肝内胆管癌の癌細胞ならびに線維芽細胞に Plakin Family 蛋白が発現し、細胞の integrity を高めるほか、機能制御に深くかかわっているのではないかと考えた。もしそうであるならば、この実験結果が肝内胆管癌の分子標的治療に寄与する可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

肝内胆管癌組織における Plakin Family 分子の存在と肝内胆管癌進展への関与を明らかにし、治療ターゲット分子になることを証明することである。

## 3. 研究の方法

肝内胆管癌組織における Plakin Family タンパクの発現および局在を免疫染色にて確認する。次に、肝内胆管癌細胞株 RBE およ

び SSP-25 細胞における Plakin Family 蛋白の遺伝子およびタンパクレベルでの発現を RT-QPCR および Western blot にて確認する。発現が確認できた蛋白は SiRNA を用いて遺伝子発現を抑制し、増殖能を Alamar Blue Assay にて、遊走能を Matrigel-coated culture insert にて、線維芽細胞活性能に関しては TGF- $\beta$ 、PDGF 産生能の RT-QPCR による評価にて調べることにした。

## 4. 研究成果

Plakin Family のうち Plectin, Desmoplakin, BPAG-1 MACF の発現を肝内胆管癌組織に認めた。また、Plectin Desmoplakin は癌細胞以外に癌組織内繊維芽細胞 (CAF) および非癌部門脈周囲繊維芽細胞にも発現を認めため、この二種類のタンパクに絞って研究を進めた。Plectin は、半接着班の細胞膜裏打ちタンパクで、細胞骨格タンパクである中間系フィラメントであるケラチンと細胞膜貫通タンパクである integrin alpha 6 beta4 となど結合していると報告されている。ヒト肝内胆管癌組織における免疫染色ではケラチンの他 integrin alpha 6、integrin beta4 の発現を癌細胞および CAF に認めた。また、癌細胞セルラインにおいてもこれらの発現をウエスタンブロット、免疫染色にて確認した。蛍光二重免疫ではこれらのタンパクの発現は overlap していた。

Desmoplakin は細胞間接着にかかわる接着班の細胞膜裏打ちタンパクで、細胞骨格タンパクである中間系フィラメントであるケラチンおよび細胞膜貫通タンパクと結合している。組織における免疫染色においてケラチン、細胞膜貫通タンパクである desmocollin desmoglein の発現を癌細胞に認め、癌細胞セルライン遺伝子発現においても発現していることを確認した。

Plectin, Desmoplakin の遺伝子発現抑制実験を癌細胞セルラインを用いて行ったが、明

らかな増殖抑制、遊走能抑制、線維芽細胞活性能の低下は認めなかった。

Plectin は細胞膜において integrin alpha 6、integrin beta4 や CD151 と結合し、hemidesmosome を形成している。肝内胆管癌細胞株および組織癌細胞においても integrin alpha 6、integrin beta4, CD151 の発現を確認している。今後、これらの分子の役割について研究する予定である。

## 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)

Uda Y, Hirano T, Limuro Y, Uyama N, Fujimoto J. Angiogenesis crucial for liver regeneration after partial hepatectomy. Surgery 査読有, 2013, 153(1), pp70-77

Limuro Y, Kondo Y, Suzumura K, Uyama N, Fujimoto J. Regional hepatic regeneration after liver resection correlates well with preceding changes in the regional portal circulation in humans. Dig Dis Sci 査読有, 2013, 58, pp3001-3009

Uyama N, Limuro Y, Kawada N, Reynaert H, Suzumura K, Hirano T, Kuroda N, Fujimoto J. Fascin, a novel marker of human hepatic stellate cells, may regulate their proliferation, migration, and collagen gene expression through the FAK-PI3K-Akt pathway. Lab Invest 査読有, 2012, 92, pp57-71

Limuro Y, Nakai N, Asano Y, Uyama N, Fujimoto J. primary epithelioid

hemangioendothelioma of the retroperitoneum: report of a case. Surgery today 査読有, 2012, 42(10), pp1026-1031

宇山直樹、飯室勇二、河田則文、鈴木和夫、藤元治朗 肝胆膵の線維化；研究と診療の最近の進歩 肝臓の線維化：研究の進歩肝細胞癌、肝内胆管癌の間質を構成する細胞群の特徴、肝胆膵、査読有、2012年、65巻、pp239-251

[学会発表](計 2件)

Uyama N, Limuro Y, Fujimoto J. Expression of fascin in human non-cancerous liver and hepatocellular carcinoma and its function of hepatic stellate cells. 16th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid. 2011.9.24. Teatro alla Pergola, Florence, ITALY

Uyama N, Limuro Y, Asano Y, Suzumura K, Fujimoto J. A novel small molecule inhibitor of FAK inhibits the ability of proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cell lines in vitro. International Surgical Week ISW 2011, 2011.8.30 Pacifico Yokohama, Yokohama, JAPAN

[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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

宇山 直樹 (UYAMA, Naoki)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70402873

### (2)研究分担者

藤元 治朗 (FUJIMOTO, Jiro)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90199373

飯室 勇二 (IIMURO, Yuji)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30252018

平野 公通 (HIRANO, Tadamichi)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90340968

佐竹 真 (SATAKE Makoto)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70399153

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：