

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590983

研究課題名(和文) 微小環境変化による肝癌細胞の上皮間葉移行とオートファジーの関連について

研究課題名(英文) Epithelial-mesenchymal transition and autophagy of hepatoma cells by the microenvironment change

研究代表者

中尾 一彦 (NAKAO, Kazuhiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：00264218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌細胞を高インスリン条件下で培養すると、Eカドヘリンの発現が低下し、PI3K-Akt-mTOR経路の活性化、HIF-1 活性化を介し、血管内皮増殖因子(VEGF)産生が亢進することが確認された。インスリンによるVEGF誘導は、低分岐鎖アミノ酸培養条件下で促進され、分岐鎖アミノ酸の補充により抑制されることが明らかとなった。その機序として、低分岐鎖アミノ酸培養条件下ではVEGF mRNAの安定性が増し半減期が延長し、分岐鎖アミノ酸の補充はVEGF mRNAの安定性を減弱させ、半減期を短縮させることが解った。インスリンと分岐鎖アミノ酸はVEGF産生に対して相反する作用を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We analyzed the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human hepatomacells under high-insulin culture conditions, and examined the effect of branched-chain amino acid (BCAA) on VEGF expression. VEGF secretion was significantly increased by 200 nM of insulin under BCAA deficient conditions, but it was repressed by the addition of BCAA. BCAA activated the mTOR pathway and increase HIF-1 expression under high-insulin culture conditions, however quantitative PCR analysis showed that insulin-induced expression of VEGF mRNAs decreased 2 h after the addition of BCAA. The half-lives of VEGF mRNAs were shortened in the presence of BCAA compared to the absence of BCAA. Therefore it is thought that BCAA regulate VEGF expression mainly at the post-transcriptional level. All three BCAA components(valine, Leucine, and Isoleucine) were required for acceleration of insulin-induced VEGF mRNA degradation.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝癌細胞 インスリン 分岐鎖アミノ酸 VEGF 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

生物学的悪性度の高い(増殖が速く腫瘍形成性に乏しく周囲組織に浸潤性に発育し転移しやすい)肝癌の予後は不良である。一方、肝癌の治療経過中に肝癌の生物学的悪性度が変化することもしばしば観察される。ラジオ波焼灼療法、肝動脈塞栓術などによって、長期間、癌が制御可能であったにもかかわらず、ある時、急に癌が増大し、肝内に播種し、門脈や肝静脈へ浸潤し、遠隔転移を起こす現象がそうである。この現象に肝癌細胞の上皮間葉移行(EMT)が関連していると考えられている。EMTによって、高い増殖・浸潤・転移能を獲得した肝癌細胞は、生物学的悪性度が極めて高く、短期間で宿主を死に至らしめる。

多くの肝癌は肝硬変を母地として発生する。肝癌治療は非癌部組織にも少なからずダメージを与えることから、頻回の肝癌治療によって肝硬変は徐々に進行し肝機能は低下する。その結果、肝癌を取り巻く微小環境も変化してくる。肝硬変合併肝癌に対して数回の肝動脈塞栓術を行った後の肝癌周囲の微小環境は、動脈塞栓により虚血状態(低酸素状態)にあり、肝機能低下により蛋白低栄養状態(分岐鎖アミノ酸欠乏)にあり、壊死組織の処理、修復反応により肝線維化・肝再生は亢進状態にある。肝癌細胞が上記のような劣悪な微小環境にさらされ、生き延びるために順応することが肝癌細胞の形質転換、EMTにつながるものと推測される。

2. 研究の目的

肝癌細胞は上皮間葉移行(EMT)により高い増殖・浸潤・転移能を有する間葉系細胞の性質を獲得する。EMT誘導には虚血状態(低

酸素状態)、低栄養状態(分岐鎖アミノ酸欠乏とオートファジー)、線維化など肝癌を取り巻く様々な微小環境の変化が関与していることが予測される。本研究では、まず、微小環境の変化が、どのように肝癌細胞にEMTを惹起するかを明らかにする。次にEMT過程における低酸素誘導因子(HIF-1)誘導、血管内皮増殖因子(VEGF)産生、オートファジー誘導、細胞内EMT関連分子の変化、microRNA発現変化を明らかにし、これらの変化を阻害することで、EMTを抑制できるかを検討したい。

3. 研究の方法

(1)肝癌培養細胞を用いてインスリン、HGF添加、分岐鎖アミノ酸欠乏、低酸素状態等によるEMT誘導の有無、程度を検討し、同時にHIF-1誘導、VEGF産生の有無を調べる。次にこれらの因子を組み合わせた培養環境下でEMT誘導の変化を検討する。

(2)上記のEMTが誘導される環境下で、EMTに関わるPI3K-Akt等の細胞内シグナル活性化、mTORの活性化状態について検討を行いEMTへ至る細胞内プロセスとmTORの関係について検討する。

(3)EMT前後のmiRNAsの変化についてmiRNAsアレイによる解析を行い新規のmiRNA変化を調べる。分岐鎖アミノ酸投与、EMT関連シグナル分子の阻害、EMT関連miRNAs発現調整などにより肝癌細胞のEMTが阻害されうるかを検討する。

4. 研究成果

(1) 微小環境による肝癌細胞の上皮間葉移行(EMT)機序の解明とその阻害による肝癌治療の基礎研究を実施した。増殖因子、インスリン、低酸素状態、低栄養状態(分岐鎖アミノ酸欠乏)など肝癌細胞を取り巻く様々な微小環境の変化がどのようにして肝癌細胞に EMT を惹起するかについて検討を行った。さらに、EMT 過程における低酸素誘導因子(HIF-1)誘導、細胞内 EMT 関連分子の変化、microRNA の発現変化を明らかにし、これらの変化を modulate することで EMT を抑制できないか検討を行った。

(2) 先ず、高インスリン環境並びに分岐鎖アミノ酸欠乏状態が肝癌細胞の血管内皮増殖因子(VEGF)産生に及ぼす影響について以下の結果を得た。高インスリン培養条件下では、E カドヘリンの発現低下が観察され、PI3K-Akt-mTOR 経路の活性化、HIF-1 活性化を介し、肝癌細胞からの VEGF 産生が亢進することが確認された。さらに、インスリンによる VEGF 誘導は、低分岐鎖アミノ酸培養条件下で促進され、分岐鎖アミノ酸の補充により抑制されることが明らかとなった。その機序として、低分岐鎖アミノ酸培養条件下では VEGF mRNA の安定性が増し半減期が延長し、逆に、分岐鎖アミノ酸の補充は VEGF mRNA の安定性を減弱させ、半減期を短縮させることが解った。この VEGF mRNA の安定性の変化は VEGF mRNA の安定性を調整する分子である Hu-antigen receptor (HuR) を介していることが示唆された。すなわち、分岐鎖アミノ酸は VEGF mRNA を安定化する HuR の発現を低下させ、VEGF mRNA の

分解が促進されると考えられる。

上記のように、インスリンと分岐鎖アミノ酸は VEGF 産生に対して、相反する作用を持つことが明らかとなった。

(3) 次に、肝細胞増殖因子(HGF)による肝癌細胞の上皮間葉移行における microRNA-122 の発現をリアルタイム PCR で検討した結果、HGF により E カドヘリンの発現低下、細胞運動の亢進の見られる数時間前より、microRNA-122 の発現低下が認められることが明らかとなった。そこで、microRNA-122 発現アデノウイルスベクターを作製し、肝癌細胞に感染させ microRNA-122 を強制発現させることで、HGF による E カドヘリンの発現低下、細胞運動の亢進など EMT 誘導が抑制できるか、現在、検討の最終段階にある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nakao K, Miyaaki H, Ichikawa T. Antitumor function of microRNA-122 against hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2014 Apr;49(4):589-93. doi: 10.1007/s00535-014-0932-4. 査読有

Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, Milazzo M, Fornari F, Gramantieri L, Bolondi L, Nakao K. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2014 Aug;34 (7):e302-7. doi: 10.1111/liv.12429 査読有

Miuma S, Ichikawa T, Arima K, Takeshita S, Muraoka T, Matsuzaki T, Ootani M, Shibata H, Akiyama M, Ozawa E, Miyaaki H, Taura N, Takeshima F, Nakao K. Branched-chain amino acid deficiency stabilizes insulin-induced vascular endothelial growth factor mRNA in hepatocellular carcinoma cells. J Cell Biochem.2012 Oct;113(10):3113-21.
doi: 10.1002/jcb.24188 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

宮明寿光、市川辰樹、中尾一彦 .NAFLD(非アルコール性脂肪性肝疾患)患者における肝組織中、血清中のmicroRNA122の意義 .日本肝臓学会西部会 ワークショップ 2013.12.6-12.7 長良川国際会議場(岐阜)

三馬 聡、田浦直太、市川辰樹、竹島史直、中尾一彦 . 分枝鎖アミノ酸による高インスリン環境下の肝癌細胞 VEGF 発現抑制効果の検討 . 日本臨床分子医学会学術集会 ポスター 2013.4.12-4.13 東京国際フォーラム(東京)

〔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

中尾 一彦 (NAKAO, kazuhiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科
(医学系)・教授
研究者番号：00264218

(2)研究分担者

宮明 寿光 (MIYAAKI, hisamitsu)
長崎大学・病院(医学系)・助教
研究者番号：20437891