

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592015

研究課題名(和文) 肝癌脈管侵襲・進展に関与する分子の探索および制御法の開発

研究課題名(英文) Search of molecules involved in vessel invasion of liver cancer and development of control methods.

研究代表者

平野 公通 (HIRANO, TADAMICHI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90340968

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)：原発性肝癌の脈管侵襲とケモカインの関連を検証した。肝細胞癌切除サンプルにおいてケモカインレセプターCXCR2の発現を検討した免疫染色の結果、腫瘍栓部で著明に発現の増加が認められた。ヒト肝細胞癌細胞株でケモカイン発現をELISAで測定したところ、CXCL1,5,8の発現を確認した。局所でのケモカインによるパラクラインシグナルネットワークで重要な役割を担うmyeloid derived suppressor cells (MDSC)を免疫染色行ったところ、脈管侵襲症例において強い集積を認めた。以上より原発性肝癌における脈管侵襲にケモカインネットワークが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the relation of chemokine for the vascular invasion of primary liver tumor. First, expression of CXCR2 is estimated by immunohistochemical staining in hepatocellular carcinoma (HCC) with vascular invasion using human specimens. Expression of several chemokine was measured using ELISA in vitro. Accumulation of myeloid derived suppressor cells (MDSC) was examined immunohistochemically in human samples of HCC. As a result, CXCR2 expression was observed in tumor thrombi than original tumor. CXCL1, 5, 8 were markedly expressed in HCC cell line in vitro. Accumulation of MDSC was confirmed in tumor with vascular invasion compared with tumor without vascular invasion. Our results suggested that chemokine network have a crucial role in the vascular invasion of HCC.

研究分野：肝癌分子治療

キーワード：肝癌

1. 研究開始当初の背景

原発性肝癌（肝細胞癌 HCC,胆管細胞がん ICC）において脈管侵襲（門脈 vp、静脈 v v）は重要な予後因子である。HCCにおいては門脈3次分枝、静脈抹消枝に侵襲を認める vp1, vv1においてすでに予後は有意に不良である。ICCはHCCよりさらに予後不良な疾患であるが、vpは強力な独立予後因子である。通常被膜に覆われたおとなしいHCCがどのようにして aggressive な進展へと転じるのかいまだ十分な解明はなされていない。我々は以前ICCにおいて癌の増殖・転移・血管新生に関与するN末端にELR-motifをもつELR-positive CXC chemokine (CXCL)およびそのレセプターCXCR2の発現を癌部・非癌部ともに確認し、CXCR knockdownによりin vitroでのICC遊走、増殖が抑制されたことを確認した。脈管侵襲のプロセスとして癌細胞の遊走、局所増殖は重要因子であるが、我々は肝癌の微小環境破壊による炎症性サイトカインのサブファミリーであるケモカインが関与しているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では原発性肝癌脈管侵襲に関与する分子メカニズムとして、近年着目されている炎症性サイトカインのサブファミリーであるケモカインおよびそのレセプターとの関連をヒト切除サンプル、肝癌培養細胞株を用いて解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HCC 切除サンプルにおける CXCR 2 の発現を免疫染色にて検討した形態学的検討

10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン切片を用い、酵素抗体法で染色。内因性ペルオキシダーゼ活性除去して非特異反応ブロッキング。一次抗体 Mouse monoclonal Anti-CXCR2 (Biosource: AHR1532X)、二次抗体 EnVision+ HRP Anti-Mouse

(DAKO: K4001)を用い、発色 (DAB) 核染色 (ヘマトキシリン) 行い、陽性細胞を非癌部、癌部、腫瘍栓部任意の 10 視野でカウントした。

(2) ヒト肝癌細胞株におけるケモカイン発現の確認

ヒト肝癌細胞株 Huh7 における in vitro における CXC ケモカイン発現を確認するために Huh7 1×10^5 個細胞散布後培養液を経時的に (0、6 h、12 h、24 h) 採取し、ELR positive の代表的な CXC ケモカインである CXCL8, CXCL5, CXCL1 を各々 GEN-PROBE (950.050.048), Abcam (ab100506), R & D (DGR00) ELISA kit を用いて測定した。

(3) HCC 脈管侵襲症例、非侵襲症例の癌部と非癌部について、IL-8 および CXCR2 遺伝子発現の検討

HCC 8 症例 (脈管侵襲 4 症例、非侵襲 4 症例) の癌部及び非癌部の凍結サンプル 30mg を破碎し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いてそれぞれ total RNA を抽出した。そのうち 3 μ g ずつを使用し、SuperScript III 逆転写酵素 (Life Technologies 社) を用いて cDNA 合成した。7300 Real Time PCR System を用い、18S rRNA 遺伝子 (TaqMan® Gene Expression Assay ID : Hs99999901_s1, Life Technologies 社) を内部標準とし、CXCR2 遺伝子 (ID : Hs01891184_s1) 及び IL-8 遺伝子 (ID : Hs00174103_m1) の発現解析を行った。

(4) myeloid derived suppressor cells (MDSC) 蛍光二重免疫染色

MDSCの癌部における集積を確認するために脈管侵襲症例、非侵襲症例のCD33/ Integrin, alpha M (CD11b) 蛍光二重免疫染色を行った。Zinc固定パラフィン切片を用い、非特異反応ブロッキング、一次抗体 Mouse monoclonal Anti-CD33 (Leica Biosystems : NCL-L-CD33)、Rabbit polyclonal

Anti-Integrin, alpha M (CD11b) (Atlas Antibodies : HPA002274)使用。二次抗体 Alexa Fluor 488-conjugated Anti-Mouse IgG (Invitrogen、A21202)、Alexa Fluor 546-conjugated Anti-Rabbit IgG (Invitrogen、A11035)を用いたのちに核染色 (DAPI) 行い共焦点レーザスキャン顕微鏡 (Carl Zeiss、LSM510)で観察した。

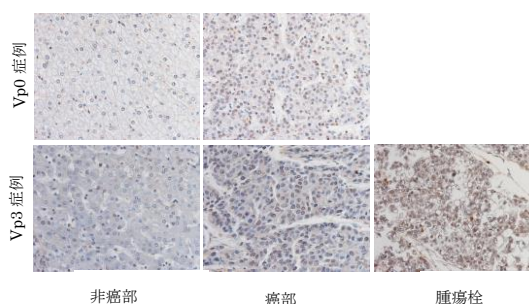
(5) CXCL8 の制御および添加による ICC の増殖、遊走、浸潤の影響の検討

ICCにおいては前研究における *in vitro* の検討で CXCR2 制御による増殖、遊走および進展の制御を確認した。CXCR2 をターゲットとするリガンドは全7種類存在し、その中で他の悪性腫瘍において関与の報告のある CXCL1,5,8の ICC細胞株 RBEおよび SSP25 培養液中濃度を測定したところ CXCL8 は CXCL1,5 と比べ極めて高濃度で存在した。そこで、CXCL8 の制御と添加による ICC の増殖、遊走、浸潤への影響を検討した。制御の手法は siRNA を用い、ELISA でその抑制を確認した。添加は 100ng/ml の Recombinant CXCL8 を投与した。

4. 研究成果

(1) HCC 切除サンプルにおける CXCR2 の発現を検討した形態学的検討

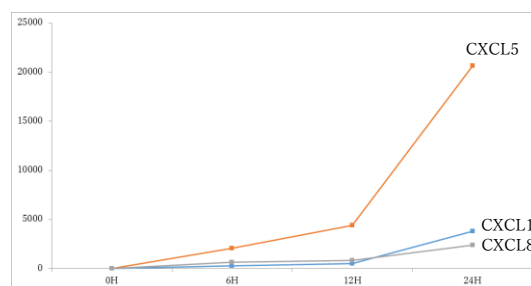
HCC 切除サンプルにおいて CXCR2 の発現を免疫染色を用いて癌部・腫瘍栓部・非癌部で検討した。その結果 CXCR2 陽性細胞は脈管非侵襲症例癌部 79.8%,非癌部 66.6%であり、脈管侵襲症例癌部 80.1%,非癌部 60.6%と差異認めなかったが、脈管侵襲症例腫瘍栓部においては 89.9%の陽性細胞認めた (図1)



(図1 CXCR2 免疫染色)

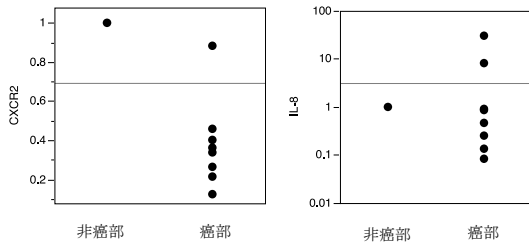
(2) ヒト肝癌細胞株 Huh7 における CXC ケモカイン蛋白発現の確認

ヒト肝癌細胞株 Huh7 における CXC ケモカイン発現を確認するために培養液を細胞継代後経時的に (0、6 h、12 h、24 h) 採取し ELISA を用いて測定したところ、ELR positive の代表的な CXC ケモカインである CXCL8 ,CXCL5, CXCL1 の経時的な発現上昇を認め、CXCL8 は 24 時間後 823 pg/ml, CXCL5 にいたっては 20619 pg/ml の発現を確認した (図2)。



(図2 Huh7 におけるケモカイン発現)

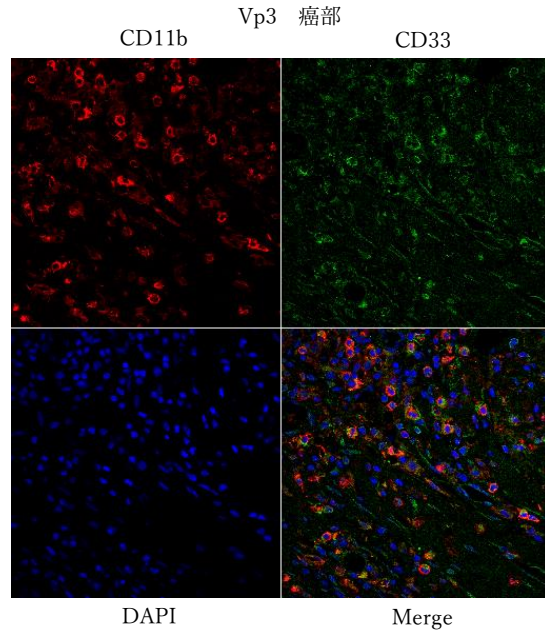
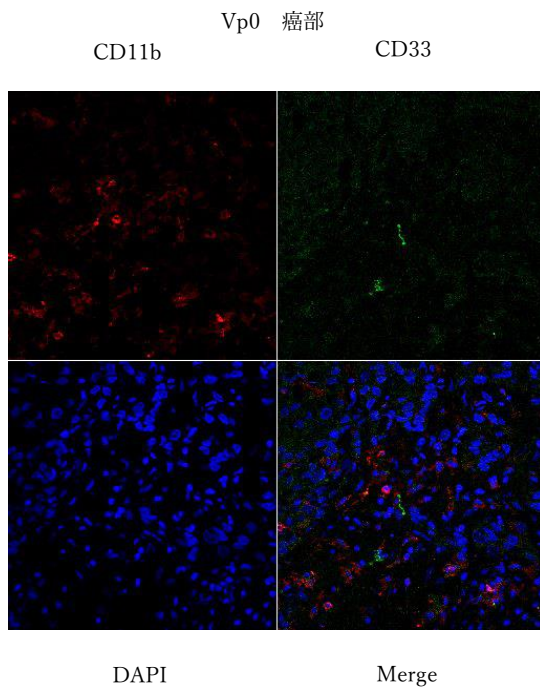
(3) CXCR2 遺伝子では、全症例において非癌部に比べ癌部で発現量の減少が見られた (p-value < 0.0001)。一方で IL-8 遺伝子においては、癌部と非癌部で発現量に多様性があり、非癌部よりも癌部で発現の多い症例、発現の少ない症例が見られた (癌部と非癌部で発現に有意差なし) (図3)。



(図3 *IL-8*、*CXCR2* 遺伝子発現の検討)

(4) 脈管侵襲症例における myeloid derived suppressor cells (MDSC) 集積同定 *CD33/Integrin, alpha M (CD11b)* 蛍光二重免疫染色

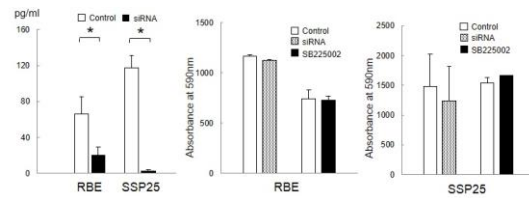
MDSC の癌部における集積を確認するために脈管侵襲症例、非侵襲症例の *CD33/Integrin, alpha M (CD11b)* 蛍光二重免疫染色を行ったところ、非侵襲症例癌部では *CD33*, *CD11b* が merge する細胞がほとんど認められないのに比して脈管侵襲症例癌部においては *CD33* positive, *CD11b* positive な細胞を多数確認した (図4)。



(図4 MDSC 蛍光二重免疫染色)

(5) *CXCL8* の制御および添加による ICC の増殖、遊走、浸潤への影響の検討

siRNA による *CXCL8* 抑制を ELISA で確認し、有意な抑制効果を確認した。しかしながら crystal violet 染色による増殖評価、wound assay による遊走評価、Matrigelinvasion chamber による浸潤評価のいずれにおいても *CXCL8* の制御および添加による ICC 細胞株 RBE および SSP25 への影響は有意差を認めず、確認しえなかった (図5)。すなわち ICC における進展の制御にはケモカイン制御よりレセプターである *CXCR2* 制御が重要である可能性が示唆された。



(図5 *CXCL8* の制御および添加による ICC 増殖への影響)

以上の結果より原発性肝癌における脈管侵襲にケモカインネットワークが関与している可能性が示唆された。

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 1 件)

Sueoka H, Hirano T, Uda Y, Imuro Y,

Yamanaka J, Fujimoto J. Blockage of

CXCR2 suppresses tumor growth of

intrahepatic cholangiocellular carcinoma.

Surgery 155:644-649. 2014 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

Hirano T, Sueoka H, Uda Y, Kuroda N, Okada

T, Asano Y, Kondo Y, Nakamura I, Tanaka S,

Hai S, Imuro Y, Fujimoto J. Blockage of

CXCR2 suppresses tumor growth of

intrahepatic cholangiocellular carcinoma.

The 64th Annual Meeting of the American

Association for the Study of Liver

Diseases (AASLD2013) 2013.11 Washington

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 公通 (HIRANO, TADAMICHI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 90340968

(2) 研究分担者

飯室 勇二 (IIMURO, YUUJI)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号 : 30252018

斐 正寛 (HAI, SEIKAN)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 30423833

大橋 浩一郎 (OHASHI, KOICHIRO)

兵庫医科大学・医学部・病院助手

研究者番号 : 50573987

藤元 治朗 (FUJIMOTO, JIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 90199373

末岡 英明 (SUEOKA, HIDEAKI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20419831

中村 育夫 (NAKAMURA, IKUO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 10625312

(3) 連携研究者