

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670573

研究課題名(和文)大腸癌肝転移のメカニズムと抗癌剤耐性について

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism for liver metastasis and the resistance to anticancer agents of colorectal cancer

研究代表者

奥村 直樹 (OKUMURA, NAOKI)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80422715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：HGFは代表的な上皮間葉転換(EMT)誘導因子であるTGF- β と同様にEMTを誘導するが、そのシグナル過程には相違があり、HGFはERK/Akt経路を介してEMTを発現する。また、HGFによりcyclin D1/E2F関連経路を介してthymidine synthaseが減弱することにより5FUの効果を増強するものと推察された。

研究成果の概要(英文)：There is a difference in the signaling pathway that HGF and TGF express EMT, even though HGF also induce EMT in the same manner as TGF. That is HGF induces EMT through the ERK / Akt pathway. HGF enhance the effect of 5FU by attenuating the thymidine synthase through the cyclin D1 / E2F-related pathway.

研究分野：医歯薬学

キーワード：c-Met HGF colorectal cancer liver metastasis TGF-

1. 研究開始当初の背景

肝転移は大腸癌の転移として最も多く、致死的な病態である。大腸癌肝転移には外科手術、抗がん剤治療を含め、積極的な治療戦略が行われている。特に 5FU とイリノテカンによるレジメンである FOLFIRI、5FU とオキザリプラチンによる FOLFIRI の登場により奏効率は 73%、生存期間中央値は約 20 か月の延長を得ている。また、分子標的薬としては c-MET 阻害薬である tivantinib のような新規薬剤も開発されている。HGF/c-MET 経路は通常癌細胞に発現しており、HGF の結合が c-MET を活性化させ、細胞増殖を導く。そのため、c-MET のシグナル伝達を阻害することにより、抗がん剤活性を発揮する。抗がん剤の発展には目覚ましいものがあるが、大腸癌肝転移で長期生存もしくは治癒を得るためには、外科的切除は必須である。術前化学療法後の外科的切除は外科的切除単独に比べ、良好な成績が得られており、5 年生存率は 60% に達している。肝切除術は大腸癌肝転移の治療として必須ではあるが、肝切除術後に起こる HGF の血中値の増加による c-MET 経路の活性化が癌細胞に与える影響については未だ知見が得られていない。固形癌が転移するためには一旦その構造を崩す必要があり、その過程において上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) という現象が注目されている。EMT は上皮細胞が転移する過程で一時間葉系細胞となり、転移先で再度上皮細胞になる現象である。transforming growth factor- (TGF-) など様々な物質が EMT を起こすといわれており、HGF も EMT 誘導因子であるとされている。当科では大腸癌肝転移発現過程における HGF 受容体である c-Met に注目し、同シグナルとの関連を検討してきた。その結果、原発巣で c-Met 発現が高い症例では有意に肝への転移が多いが、転移巣では減弱することが確認されている。この現象を説明する上で癌の転移に関連を示唆される EMT の観点からの検討を計画した。

2. 研究の目的

HGF による細胞内シグナルを代表的な EMT 誘導因子 TGF- と比較することで HGF/c-Met の肝転移への関連を明確にすることを目的としている。

また EMT 発現時の抗がん剤への感受性について併せて検討することで実地臨床での治療戦略の構築 (外科切除の時期的選択) を目指している。

3. 研究の方法

マウス大腸癌細胞株 CT26 を用い、HGF と代表的な EMT 誘導因子である TGF- との比較を中

心に、細胞内シグナルを Western blotting、細胞増殖抑制効果を MTT assay にて検討した。

(1) EMT の発現の確認
HGF (20ng/ml)、TGF- (5ng/ml) を添加した培養液で培養した細胞の上皮系マーカー (E-cadherin)、間葉系マーカー (Vimentin) の発現を Western blotting で確認した。また si-RNA にて c-MET を knock down した細胞に対する HGF の影響を検討した。

(2) HGF、TGF- のシグナル経路の検討
E-cadherin の転写因子である Snail、Slug の発現、それぞれの ERK/Akt 経路、Smad 経路への影響を Western blotting で検討した。

(3) EMT 誘導細胞における抗がん剤耐性
HGF、TGF- にて EMT を誘導した細胞への抗がん剤の細胞増殖抑制効果を 5FU を用いて MTT assay にて検討した。

また、シグナル伝達を p-NF B、thymidine synthase について Western blotting にて検討した。

4. 研究成果

(1) TGF- (5ng/ml)、HGF (20ng/ml) はともに時間依存性に E-cadherin の発現を低下 (それぞれ 96 時間で TGF- は 50.7%、HGF は 41.3%)、Vimentin を上昇 (96 時間で TGF- は 3.08 倍、HGF は 2.21 倍) させたが、siRNA で c-Met を knock-down した細胞では TGF- で同様に E-cadherin の減弱を認めただのに対し、HGF では認めなかった。

(2) Snail は TGF- 添加 24~48 時間で発現するが HGF では確認されなかった。Slug は TGF-、HGF ともに 24~48 時間で発現した。ERK は TGF-・HGF ともに活性化し、AKT は HGF のみで活性化した。TGF- では 30 分以降に smad2、smad3 のリン酸化が確認されたが、HGF では認めなかった。TGF- による Snail 発現は ERK inhibitor である U-0126 で増強され、HGF による Slug 発現は U-0126 で抑制された。

(3) TGF- あるいは HGF にて EMT を誘導した状態では、5FU (10 μM) 単独での 98.89% への細胞数減弱に対し、TGF- で 117.96%、HGF では 73.18% であり、HGF 併用にて効果増強が確認された。薬剤耐性メカニズムの一種である p-NF B は TGF-、HGF ともに発現は認められなかった。HGF 投与にて CyclinD および CyclinE、E2F は 24 時間にてそれぞれ 52.05%、63.06%、52.4% に、thymidine synthase は 96 時間で 56.0% に減弱した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 11 件)

福田賢也、長田真二、棚橋利行、松井聡、佐々木義之、田中善宏、奥村直樹、松橋延壽、高橋孝夫、山口和也、吉田和弘
HGFによるEMT誘導時の抗がん剤感受性に関する検討
第70回日本消化器外科学会
2015年7月、アクトシティ浜松
(静岡県・浜松市)

福田賢也、長田真二、棚橋利行、松井聡、佐々木義之、田中善宏、奥村直樹、松橋延壽、高橋孝夫、山口和也、吉田和弘、HGFによるEMT誘導時の抗がん剤感受性
第27回肝胆膵外科学会
2015年6月
ホテルグランパシフィック LE DAIBA
(東京都・港区)

福田賢也、長田真二、棚橋利行、今井寿、佐々木義之、田中善宏、松橋延壽、奥村直樹、高橋孝夫、山口和也、二村学、吉田和弘、大腸癌肝転移におけるHGFによるEMT発現と抗癌剤の効果
第25回日本消化器癌発生学会
2014年11月、ホテル日航福岡
(福岡県・福岡市)

Kenya Fukuta, Shinji Osada, Toshiyuki Tanahashi, Satoshi Matsui, Hisashi Imai, Yoshiyuki Sasaki, Naoki Okumura, Takao Takahashi, Kazuya Yamaguchi, Manabu Futamura, Kazuhiro Yoshida, The effect of chemotherapeutic drug in the progress of EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition)
第73回日本癌学会
2014年9月、パシフィコ横浜
(神奈川県・横浜市)

福田賢也、長田真二、棚橋利行、今井寿、佐々木義之、田中善宏、松橋延壽、奥村直樹、野中健一、高橋孝夫、山口和也、吉田和弘
大腸癌肝転移におけるHGF, TGF-によるEMT発現機構メカニズムの相違
第69回日本消化器外科学会
2014年7月、郡山総合体育館
(福島県・郡山市)

福田賢也、長田真二、棚橋利行、今井寿、佐々木義之、田中善宏、松橋延壽、奥村直樹、野中健一、高橋孝夫、山口和也、吉田和弘
HGFによるEMT発現機構メカニズム
第114回日本外科学会
2014年4月、国立京都国際会館
(京都府・京都市)

福田賢也、長田真二、棚橋利行、今井寿、佐々木義之、田中善宏、奥村直樹、

松橋延壽、高橋孝夫、山口和也、二村学、吉田和弘、EMT発現機構におけるTGF-、HGFのシグナル伝達経路の相違、第47回制癌剤適応研究会、2014年3月7日
名古屋マリオットアソシアホテル
(愛知県・名古屋市)

福田賢也、長田真二、棚橋利行、八幡和憲、今井寿、佐々木義之、田中善宏、奥村直樹、野中健一、高橋孝夫、山口和也、吉田和弘、EMT発現状況における化学療法の影響、第51回日本癌治療学会学術集会、2013年10月24日 国立京都国際会館
(京都府・京都市)

Kenya Fukuta, Shinji Osada, Toshiyuki Tanahashi, Hisashi Imai, Yoshiyuki Sasaki, Naoki Okumura, Takao Takahashi, Manabu Futamura, Kazuhiro Yoshida, Anticancer drug effect on EMT (Epithelial-mesenchymal transition) in the progress of colon cancer liver metastases.
第72回日本癌学会
2013年10月4日
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

福田賢也、長田真二、棚橋利行、田中香織、兼松昌子、山田敦子、八幡和憲、今井寿、佐々木義之、奥村直樹、野中健一、高橋孝夫、山口和也、二村学、吉田和弘
大腸癌肝転移過程におけるEMT状態での抗癌剤効果
第24回消化器癌発生学会
2013年9月6日 石川県立音楽堂
(石川県・金沢市)

福田賢也、長田真二、棚橋利行、今井寿、佐々木義之、奥村直樹、松橋延壽、野中健一、高橋孝夫、山口和也、二村学、吉田和弘、HGFによるEMT発現時の抗癌剤感受性について、第68回消化器外科学会総会、2013年7月19日 サンホテルフェニックス
(宮城県・宮崎市)

〔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

奥村 直樹 (OKUMURA, NAOKI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80422715

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：