

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462051

研究課題名(和文)肝内胆管癌におけるHemidesmosome関連蛋白の働きと治療への応用

研究課題名(英文)The function of hemidesmosome related proteins in cholangiocarcinoma and its application for the treatment

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝内胆管癌組織を用いた免疫染色の結果ではHemidesmosome 蛋白のうち Plectin, Integrin 6, Integrin 4, Integrin 1, Bp180, CD151の発現を、Desmosome 関連蛋白では desmoglein-3, -4, desmocoilin, desmoplakinの発現を癌細胞に認めた。肝内胆管癌細胞株を用いて、これらの遺伝子発現を抑制したところ、Integrin 1およびDesmoplakin に細胞増殖抑制を認めた。Integrin 1に関してはFAK-p42p44MAPK 経路の関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In human intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) tissues, immunoreactivity for hemidesmosome related proteins such as plectin, integrin 6, integrin 4, integrin 1, Bp180, CD151, was found in cancer cells. Immunoreactivity for desmosome related proteins such as desmoglein-3, -4, desmocoilin, desmoplakin was also found in cancer cells. In in vitro experiments, among these proteins, integrin 1 and desmoplakin were found to be related cell proliferation. Reduction of integrin 1 or desmoplakin in ICC cell lines by SiRNA transfection reduced cell proliferation ability of ICC cell lines. Reduction of integrin 1 expression also reduced phosphorylation of FAK and p42p44MAPK, indicating that Integrin 1 may be involved in proliferation of ICC cell lines through activating FAK and p42p44MAPK.

研究分野：肝内胆管癌

キーワード：肝内胆管癌 hemidesmosome desmosome 癌関連線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌 ( Intrahepatic Cholangiocarcinoma : ICC )は発見時に進行症例が多く未だ予後不良な疾患である。組織学的特徴として、癌細胞のほかに豊富な間質が含まれていることがあげられる。最近、間質の構成細胞や細胞外マトリックスといった微小環境が近隣の上皮系細胞の transformation を促進し、増殖能、浸潤能、転移能といった機能を制御していることが明らかになってきており、癌細胞以外に間質の制御も ICC 治療において重要であると考

えている。我々は、今までに ICC について ICC 組織内コラーゲン発現 コラーゲン-ICC 癌細胞相互作用 ICC 組織における繊維芽細胞の特徴について研究してきた。また、以前の Project から細胞骨格蛋白制御による癌細胞、繊維芽細胞の制御に興味を持ってきた。細胞内における主要な細胞骨格蛋白はアクチン、中間系フィラメント、微小管からなり、これらの蛋白と様々な結合蛋白によって細胞の integrity が維持されているのみならず、細胞の増殖、浸潤、転移などの機能も制御されていると考えられている。そこで、細胞骨格蛋白の linker 蛋白として働く Plakin Family 分子に注目し、ICC 組織における発現を調べたところ、Plectin が癌細胞のみならず間質の繊維芽細胞 (Cancer associated Fibroblasts: CAFs)にも発現していることが分かった。

Plectin は BP230 と共に Hemidesmosome の細胞膜裏打ちタンパク質で細胞内の中間系フィラメント (ケラチン線維) と膜貫通タンパク質である Integrin 6 4、BP180、CD151 などに結合し、接着構造を細胞の内側から支えている。膜貫通タンパク質の細胞外部分は、細胞外マトリックスタンパク質の細胞接着分子であるラミニン 332 に結合している。これらのうち、Integrin 6 4 はラミニン結合受容体で下流シグナルとしては、ERK pathway, PI3-Akt pathway, Rac-PAK9 pathway 等が報告されており、細胞の増殖、浸潤、細胞骨格制御や apoptosis 抵抗性の獲得などが報告されている。また、CD151 はテトラスパニンファミリーに属しており、上皮細胞、内皮細胞、心筋や平滑筋などの筋肉に発現し、ラミニン結合受容体 (Integrin 3 1, 6 1, 6 4, 7 1)の機能を制御していると言われている。癌細胞においては浸潤能、転移能、増殖能の制御に深く関わっていると報告されている。BP180 は collagen type XVII のことであるが、癌組織における明らかな働きは分かっていない。

この Hemidesmosome に関しては皮膚科領域で主に研究されており、代表的なものとして水疱性類天疱瘡、癬痕性類天疱瘡、接合部型表皮水疱症などが挙げられ、HD 構成蛋白にたいする自己抗体や遺伝子変異によって組織の脆弱性が誘導されている。逆に考え

ると、これらのメカニズムを応用して癌細胞におけるこれらの蛋白の発現、機能を抑制することによって、細胞の integrity が脆弱になり apoptosis を誘導したり、抗癌剤の殺傷効果を高めることが出来るのではないかと考えた。また、hemidesmosome のみならず、細胞間の結合蛋白である desmosome 関連蛋白についても細胞の integrity を高める働きがあり、hemidesmosome 関連蛋白同様に、細胞の機能性制御にかかわっていると考えられたため、ICC での働きを調べることにした。

## 2. 研究の目的

ICC 組織内癌細胞および ICC-CAFs における Hemidesmosome および Desmosome 関連分子の発現を確認する。SiRNA technology を利用し、ICC 癌細胞及び CAFs における Hemidesmosome および Desmosome 関連分子の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) ヒト ICC 組織を用いた Hemidesmosome、Laminin, Collagen Type IV および Desmosome 関連蛋白の発現確認

Hemidesmosome 関連蛋白 (Plectin, Integrin alpha6, Integrin beta4, Integrin beta1, Bp180, CD151)とこれらの基質としての細胞外マトリックス (Laminin, Collagen Type IV) および、Desmosome 蛋白 (desmoglein 1-4, desmocollin, desmoplakin) の発現を免疫染色にて検討した。

### 2) ヒト ICC 組織における Hemidesmosome および Desmosome 関連蛋白の局在

1) で発現を認めた蛋白と Pan-cytokeratin または SMA の蛍光二重免疫染色を行い、癌細胞または CAFs での発現を確認した。

### 3) ヒト ICC 細胞株 (RBE 細胞、SSP-25 細胞) における Hemidesmosome および Desmosome 関連蛋白の発現

RBE 細胞、SSP-25 細胞を用いて 1) で発現を認めた蛋白の遺伝子発現を RT-PCR および western blotting にて確認した。

### 4) 癌細胞に発現している Hemidesmosome および Desmosome 関連蛋白の遺伝子発現抑制実験による増殖能の変化

1) でみとめた Hemidesmosome 蛋白および Desmosome 蛋白にたいする siRNA を ICC 細胞株に遺伝子導入し、control oligo を遺伝子導入した ICC 細胞株 (control 群) との間に増殖能の違いがあるかを Almar Blue 法にて測定した。

### 5) Focal adhesion kinase (FAK) および p42/p44MAPK の関与

4) で増殖能に関与した蛋白の siRNA 遺伝子

導入群とコントロール群で、FAK および p42/p44MAPK のリン酸化に差があるか調べた。また、FAK inhibitor (1,2,4,5-Benzene-tetraamine · 4HCl) および p42/p44MAPK inhibitor (PD98059) の癌細胞株増殖能への影響を調べた。

#### 6) ヒト ICC 組織における ICC-CAFs characterization と細胞分離

CAFs の characterization を SMA, PDGFR 以外に肝臓門脈領域線維芽細胞 (Portal fibroblasts : PFs) のマーカーである Thy-1, Fibulin-2, 肝臓星細胞 (Hepatic stellate cells : HSCs) のマーカーである Fascin の DAB および蛍光二重免疫染色にて行った。次に、Thy-1 抗体を用いた MACS にて ICC-CAFs の分離を試みた。

#### 4. 研究成果

1) Hemidesmosome 蛋白のうち Bp180 を除いた Plectin, Integrin alpha6, Integrin beta4, Integrin beta1, CD151 の発現を癌細胞に認めた。また、Plectin, Integrin beta1, CD151 の発現を間質の細胞に認めた。細胞外マトリックスの laminin および Collagen Type IV の発現は間質に認め、これらの蓄積が考えられた。Desmosome 蛋白に関しては desmoglein-3, -4, および desmoplakin の発現を癌細胞に認めた。

2) 蛍光二重免疫染色にて Plectin, Integrin alpha6, Integrin beta4, Integrin beta1, CD151 と Pan - cytokeratin の発現は overlap し、Plectin, Integrin beta1 および CD151 の発現は SMA と overlap した。以上より癌細胞が Plectin, Integrin alpha6, Integrin beta4, Integrin beta1, CD151 を発現し、ICC-CAFs が Plectin, Integrin beta1, CD151 を発現していることが分かった。

3) QRT-PCR および Western blot を行ったところ、培養 RBE 細胞および SSP-25 細胞に Plectin, Integrin alpha6, Integrin beta4, Integrin beta1, CD151 の発現を認めた。

4) 培養 RBE 細胞および SSP-25 細胞で Plectin, Integrin alpha6, Integrin beta4, Integrin beta1, CD151 に対する SiRNA を RBE 細胞および SSP-25 細胞に transfection したところ、Integrin beta1, Desmoplakin の SiRNA を transfection したものに有意な細胞増殖の抑制を認めた (Interin 1: RBE cells / SSP-25 cells, 80% / 30% of Control, Desmoplakin: RBE cells / SSP-25 cells, 64% / 60% of Control)。

5) Integrin beta1 に対する SiRNA を transfection した RBE 細胞および SSP-25 細胞ではともに FAK のリン酸化および p42/p44MAPK のリン酸化が抑制されていた。

また、FAK inhibitor (5  $\mu$  M) および PD98059 (10  $\mu$  M) の投与によって細胞増殖は有意に抑制された。

6) ICC 間質には DAB 染色で SMA+細胞、PDGFR +細胞、Thy-1+細胞、Fibulin-2+細胞を認め、蛍光二重免疫染色では、SMA 陽性細胞は PDGFR +, Thy-1+, Fibulin-2+ であった。以上より ICC-CAFs は PFs とよく似た細胞であった。ICC-CAFs の分離に関しては現在行っている。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

1) Uyama N, Kawada N, Hirota S, Hatano E, Fujimoto J. Characterization of cancer associated fibroblasts in primary site and metastatic lymph nodes of intrahepatic cholangiocarcinoma by immunohistochemistry. The International Liver Congress 2017 (EASL2017) 2017.4 Amsterdam

2) 宇山直樹, 伊藤礼, 栗本亜美, 岡本共弘, 矢田章人, 末岡英明, 裴正寛, 近藤祐一, 中村育夫, 鈴木和夫, 麻野泰包, 岡田敏弘, 平野公通, 廣田誠一, 河田則文, 藤元治朗. 肝内胆管癌原発巣および転移リンパ節における CAF の免疫染色学的検討. 第 52 回日本肝癌研究会 2016.7 東京

3) 宇山直樹, 伊藤礼, 栗本亜美, 岡本共弘, 大橋浩一郎, 矢田章人, 末岡英明, 裴正寛, 小坂久, 近藤祐一, 中村育夫, 鈴木和夫, 麻野泰包, 岡田敏弘, 平野公通, 廣田誠一, 藤元治朗. 肝内胆管癌 CAF に門脈域線維芽細胞および fibrocytes が関与している. 第 28 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2016.6 大阪

4) Uyama N, Ito R, Kurimoto A, Okamoto T, Yada A, Sueoka H, Hai S, Kosaka H, Kondo Y, Nakamura I, Suzumura K, Asano Y, Okada T, Hirano T, Yamanaka J, Kawada N, Fujimoto J. Cancer associated fibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma is derived from portal fibroblasts, but not hepatic stellate cells; immunohistochemical study in human tissues. The 66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2015) 2015.11 San Francisco

5) 宇山直樹, 岡本共弘, 裴正寛, 中村育夫,

近藤祐一，鈴村和大，麻野泰包，岡田敏弘，平野公通，藤元治朗。肝内胆管癌組織内における PDGF family の役割に関する免疫組織学的考察。第 51 回日本胆道学会学術集会 2015.9 宇都宮

6) 宇山直樹，栗本亜美，岡本共弘，大橋浩一郎，矢田章人，末岡英明，裴正寛，近藤祐一，中村育夫，鈴村和大，麻野泰包，岡田敏弘，平野公通，飯室勇二，藤元治朗。肝内胆管癌組織内線維芽細胞の免疫組織学的検討。第 51 回日本肝臓学会総会 2015.5 熊本

7) 宇山直樹，裴正寛，中村育夫，近藤祐一，鈴村和大，麻野泰包，岡田敏弘，平野公通，山中潤一，飯室勇二，藤元治朗。肝内胆管癌組織内における線維化メカニズムの免疫組織学的考察。第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015.4 名古屋

〔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

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

鈴村和大 (Suzumura, Kazuhiro)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50434949

藤元治朗 (Fujimoto, Jiro)

兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90199373

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

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )