

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：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861088

研究課題名(和文) 肝内胆管癌におけるTGF- β 活性化機構に着目した癌進展機構の解明研究課題名(英文) Integrin- β 6 is required for TGF- β -mediated EMT and promotes the disease progression of intrahepatic cholangiocellular carcinoma

研究代表者

林 洋光(HAYASHI, Hiromitsu)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：80625773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌はリンパ節転移や遠隔転移を引き起こしやすく、抗がん剤への治療抵抗性も高い予後不良な消化器癌である。さらなる癌進展の機序解明ひいては新規治療戦略のこうちくが必要である。TGF- β -Smadシグナルを介した肝内胆管癌の浸潤・転移機序解明を目的とする本研究に関して1) TGF- β は癌細胞に対してEMT誘導を引き起こした。2) TGF- β はIntegrin-6の過剰発現を誘導し、細胞増殖・浸潤の促進を引き起こした。3) Integrin-6の過剰発現は肝内胆管癌症例の予後不良因子であった。という研究成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：ICC is characterized as a poor prognostic disease represented by the highly invasiveness. EMT plays a pivotal role in cancer invasion and metastasis, and then TGF- β signaling is a potent inducible factor of EMT. Integrin-6, which is an epithelial restricted trans-membrane protein, promotes binding to extracellular matrix proteins. In this study, we investigated the role of integrin-6 during TGF- β -mediated EMT using ICC cell lines, and examined the clinic-pathological significance of Integrin-6 expression in ICC patients. Addition of TGF- β to ICC cells successfully induced EMT, spindle-shaped morphology, and high invasiveness, with the integrin-6 induction. The inhibition of integrin-6 expression using RNAi abolished TGF- β -mediated EMT induction. In clinical setting, high integrin-6 expression was significantly associated with Stage IV, lymph node metastasis, and then resulted in worse prognosis compared with low expression group.

研究分野：消化器外科学(特に肝胆膵外科)

キーワード：肝内胆管癌 上皮間葉転換 Integrin-6 癌細胞浸潤 癌細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌はリンパ節転移や遠隔転移を引き起こしやすく、抗がん剤への治療抵抗性も高い予後不良な消化器癌である。さらなる癌進展の機序解明ひいては新規治療戦略の構築が必要である。TGF- β シグナルは正常上皮細胞や血管内皮細胞に対して増殖抑制作用を有する一方、癌細胞に対しては EMT を誘導し、癌の浸潤・転移に関与することが知られている。

Integrin 6 は細胞膜上に発現し、細胞外マトリックスと細胞内シグナルとを介在する受容体としての働きを有する。様々な悪性腫瘍において Integrin 6 が過剰発現していることが知られており、その過剰発現は予後不良因子であるとの報告がなされている。肝内胆管癌においても同様に過剰発現していることが報告されている一方、その発現と予後との関係に関して報告されたものはない。

2. 研究の目的

胆管癌は印刷業務従事者で極めて高頻度に認められ日本国内で問題となっている。中でも肝内胆管癌はリンパ節転移や遠隔転移を起こしやすく、抗癌剤への治療抵抗性も高い予後不良な消化器癌であり、さらなる癌進展の機構解明ひいては新規治療戦略の構築が必要である。Transforming growth factor (TGF)- β -Smad シグナルを介した胆管癌の浸潤・転移機序解明を目的とする本研究では、申請者らのこれまでの実験結果に基づいて局所の TGF- β 活性化機構を介した TGF- β -Smad シグナルを抑制することで肝内胆管癌の進展が抑制される、という仮説を立てた。本研究提案の最終目的は、TGF- β 活性化機構に着目して肝内胆管癌進展における TGF- β -Smad シグナルのメカニズムを分子生物学的に紐解くことにより、TGF- β -Smad シグナルを介した肝内胆管癌の浸潤・転移機序解明し、Integrin 6 と TGF- β -Smad シグナ

ルの interaction の解明であり、新しい肝内胆管癌治療法の基礎を築くことである。

3. 研究の方法

本研究に関して 1) TGF- β は癌細胞に対して強力な EMT 誘導因子である。2) TGF- β は生体内で不活性型として合成され細胞外マトリックスに貯蔵される。3) 局所の TGF- β

シグナルは不活性型を活性型へ変換する活性化機構によりコントロールされる。といった TGF- β の特徴を元に、TGF- β -Smad シグナルを介した肝内胆管癌の浸潤・転移機序解明を目的とする本研究では、当科で保有している肝内胆管癌細胞株 7 株を用い、Integrin 6 の発現の程度を確認し、高発現細胞株、低発現細胞株を用いて研究を進めた。

TGF- β 添加による EMT 誘導、Integrin 6 の発現変化を確認した。次に TGF- β 添加による (Integrin 6 強制発現系) 細胞増殖能や浸潤能の変化、siRNA を用いた Integrin 6 発現抑制系での同変化の確認を行った。

最後に、切除検体を用い免疫染色を行い Integrin 6 の発現の有無を確認し、Integrin 6 と肝内胆管癌症例の予後との関係を確認した。

4. 研究成果

Ysccc 細胞株を TGF- β で刺激すると integrin 6 の発現上昇を認めるとともに上皮系マーカーである E-cadherin の発現低下、間葉系マーカーである Vimentin 発現亢進を認め、形態観察でも敷石状の細胞形態が線維芽細胞様の形態に変化し EMT が誘導された。次に siRNA で integrin 6 を knock down して TGF- β 刺激を行ったところ、TGF- β による E-cadherin の発現低下が阻害され、invasion assay でも si-integrin 6 により control と比べて浸潤能が低下した。肝内胆管癌症例 55 例を用いて integrin 6 の免疫染色を行い、発現の程度と予後との関連を検討したと

ころ、integrin 6 高発現群は低発現群と比べて無病生存期間が有意に短かった。臨床病理学的因子との解析では、integrin 6 の高発現は Stage IV, 脈管侵襲陽性、リンパ節転移陽性と関連していた。Integrin 6 は TGF- β による上皮間葉転換を促進し肝内胆管癌の進展に関与することが示唆された。

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 2 件)

Hayashi H, Higashi T, Yokoyama N, Kaida T, Sakamoto K, Fukushima Y, Ishimoto T, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Oki E, Beppu T, Baba H. An Imbalance in TAZ and YAP Expression in Hepatocellular Carcinoma Confers Cancer Stem Cell-like Behaviors Contributing to Disease Progression. *Cancer Res*, 75(22):4985-97, 2015.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0291.

Higashi T, Hayashi H, Ishimoto T, Takeyama H, Kaida T, Arima K, Taki K, Sakamoto K, Kuroki H, Okabe H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Beppu T, Baba H. miR-9-3p plays a tumour-suppressor role by targeting TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 14;113(2):252-8, 2015
doi: 10.1038/bjc.2015.170.

[学会発表](計 15 件)

林洋光、別府透、新田英利、中川茂樹、東孝暁、甲斐田剛圭、岡部弘尚、橋本大輔、近本亮、馬場秀夫、「腫瘍マーカー陽性数から見た肝細胞癌に対するラジオ波凝固療法の治療成績」、第 51 回日本肝癌研究会、2015 年 7 月 24 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

近本亮、橋本大輔、東孝暁、高城克暢、岡部弘尚、新田英利、**林洋光**、石河隆敏、別府透、馬場秀夫、「腫瘍形成型肝内胆

管癌におけるリンパ節郭清の意義」、第 70 回日本消化器外科学会総会、2015 年 7 月 17 日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

林洋光、別府透、東孝暁、武山秀晶、新田英利、橋本大輔、近本亮、白石慎哉、山下康行、馬場秀夫、「アジアロ SPECT-CT fusion を用いた分肝機能評価法による術前リスク評価の有用性」、第 70 回日本消化器外科学会総会、2015 年 7 月 16 日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

林洋光、東孝暁、坂本慶太、武山秀晶、甲斐田剛圭、新田英利、橋本大輔、近本亮、別府透、馬場秀夫、「肝細胞癌における TAZ/YAP による化学療法抵抗性獲得機構の解明」、第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2015 年 6 月 12 日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA(東京都・港区)

近本亮、橋本大輔、甲斐田剛圭、有馬浩太、東孝暁、高城克暢、井上梨沙、武山秀晶、岡部弘尚、新田英利、**林洋光**、石河隆敏、別府透、馬場秀夫、「術後再発形式からみた肝内胆管癌切除術式の検討」、第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2015 年 6 月 11 日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA(東京都・港区)

林洋光、黒木秀幸、馬場秀夫、「cDNA マイクロアレイを用いた肝再生抑制因子トロンボスポンディン 1 の同定と阻害ペプチドを用いた肝再生促進療法」、第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 22 日、鶴屋東館(熊本県・熊本市)

林洋光、坂本快郎、宮本裕士、東孝暁、坂本慶太、坂田和也、大内繭子、徳永竜馬、中川茂樹、黒木秀幸、岡部弘尚、新田英利、橋本大輔、近本亮、石河隆敏、別府透、馬場秀夫、「Conversion 肝切除後の早期再発に関するバイオマーカーとしての Ki-67 発現に関する検討」、第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 18 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

林洋光、東孝暁、坂本慶太、横山奈緒美、武山秀晶、甲斐田剛圭、有馬浩太、井上梨沙、新田英利、橋本大輔、近本亮、別府透、馬場秀夫、「肝細胞癌進展における Hippo-pathway による癌幹細胞マーカー CD90 発現制御機構の解明」、第 25 回日本消化器癌発生学会総会、2014 年 11 月 14 日、ホテル日航福岡(福岡県福岡市)

林洋光、別府透、宮本裕士、坂本快郎、東孝暁、坂本慶太、坂田和也、新田英利、

橋本大輔、近本亮、石河隆敏、馬場秀夫、
「切除不能大腸癌肝転移に対する
conversion 肝切除における CD44 発現の
臨床病理学的検討」、第 52 回 日本癌治
療学会学術集会、2014 年 8 月 29 日、パ
シフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

林洋光、黒木秀幸、東孝暁、横山奈緒美、
坂本慶太、阿部真也、新田英利、橋本大
輔、近本 亮、別府透、馬場秀夫、「肝
細胞癌進展における Hippo-pathway の転
写活性化補助因子 TAZ の役割」、第 26 回
日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014
年 6 月 12 日、和歌山県民文化会館（和
歌山県・和歌山市）

林洋光、別府透、新田英利、阿部真也、
橋本大輔、近本亮、石河隆敏、馬場秀夫、
「肝ドーム下 S7/8 病変に対する左側臥
位での肋間ポート併用下完全腹腔鏡下
肝切除の有用性」、第 50 回日本肝癌研究
会、2014 年 6 月 5 日、国立京都国際会館
（京都府・京都市）

林洋光、黒木秀幸、東孝暁、中川茂樹、
坂本慶太、新田英利、近本 亮、石河隆
敏、別府 透、馬場秀夫、「肝ドーム下
S7/8 病変に対する左側臥位での肋間ポ
ート併用下完全腹腔鏡下肝切除の有用
性」、第 50 回日本肝臓学会総会、2014
年 5 月 29 日、ホテルニューオータニ（東
京都・千代田区）

Hiromitsu Hayashi, Hideyuki Kuroki,
Shigeki Nakagawa, Takaaki Higashi,
Keita Sakamoto, Naomi Yokoyama,
Takatoshi Ishiko, Toru Beppu, Hideo
Baba. “TAZ (WWTR1), a key
transcription co-activator of
hippo-pathway, promotes
hepatocellular carcinoma progression
via PI3K/Akt/mTOR pathway.” AACR
Annual Meeting 2014, 2014 年 4 月 8 日,
San Diego Convention Center (San Diego,
USA)

Takaaki Higashi, **Hiromitsu Hayashi**,
Hideyuki Kuroki, Shigeki Nakagawa,
Keita Sakamoto, Hidetoshi Nitta,
Akira Chikamoto, Toru Beppu, and Hideo
Baba. “Integrin- 6 is correlated
with transforming growth factor
(TGF)- mediated
epithelial-mesenchymal transition
(EMT) and promotes the disease
progression of intrahepatic
cholangiocellular carcinoma.” AACR
Annual Meeting 2014, 2014 年 4 月 8 日,
San Diego Convention Center (San Diego,
USA)

東孝暁、**林洋光**、黒木秀幸、中川茂樹、
坂本 慶太、横山奈穂美、新田英利、近
本亮、別府 透、馬場秀夫、「Integrin
beta6 は TGF による上皮間葉転換を
促進し肝内胆管癌の進展に關与する」、
第 114 回日本外科学会定期学術集会、
2014 年 4 月 3 日、国立京都国際会館（京
都府・京都市）

〔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

林 洋光 (HAYASHI, Hiromitsu)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：80625773

(2) 研究協力者

東 孝暁 (HIGASHI, Takaaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・大学院生

黒木 秀幸 (KUROKI, Hideyuki)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

別府 透 (BEPPU, toru)
熊本大学・医学部附属病院・特任助教