

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08573

研究課題名(和文) 肝星細胞制御による肝移植後グラフト内肝癌再発抑制機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of suppressive effect for intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma by hepatic stellate cell regulation after liver transplantation

研究代表者

居村 暁 (IMURA, Satoru)

徳島大学・病院・特任教授

研究者番号：90380021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題研究により得られた以下の知見を論文あるいは学会で報告した。肝癌において、(1)肝星細胞(HSC)は癌細胞の悪性度の上昇、転移の促進といった作用を有する、(2)HSCは肝癌細胞により癌関連線維芽細胞(CAF)へ誘導され、IL-6を分泌し、IL-6-Stat3経路を活性化することでEMT誘導、癌増殖、stemness獲得に作用する、(3)CAFがM0マクロファージ(M<sub>0</sub>)をM2 M<sub>2</sub> (腫瘍関連M<sub>2</sub> : TAM)への極性誘導を促進し、TAM由来VEGFが癌細胞のEMTを誘導することにより、腫瘍微小環境における癌細胞-CAF-TAM interactionを形成する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌の進展・転移の課程で、腫瘍微小環境における肝星細胞の役割、肝星細胞制御による進展・転移を抑制することができれば肝癌治療の成績向上が期待できる。肝癌の腫瘍微小環境における癌細胞-癌関連線維芽細胞-腫瘍関連マクロファージの相互作用を明らかにしたことは、転移を伴う肝癌治療を困難にしてきた問題を克服する可能性がある肝星細胞研究の意義は高い。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of hepatocellular carcinoma (HCC) progression focused on hepatic stellate cells (HSC) in cancer microenvironment. In HCC, (1) HSC have roles such as increasing the malignancy of cancer cells and promoting metastasis. (2) HSC is induced into cancer-related fibroblasts (CAF) by HCC cells, by secreting IL-6 and activating the IL-6-Stat3 pathway, it acts on EMT induction, cancer growth, and stemness acquisition. (3) CAF converts M<sub>0</sub> macrophages (M<sub>0</sub>) to M<sub>2</sub> M<sub>2</sub> (tumor-related M<sub>2</sub> : TAM), and TAM-derived VEGF induces EMT in cancer cells, thereby forming a cancer cell-CAF-TAM interaction in the tumor microenvironment.

研究分野：医歯薬学・外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 腫瘍微小環境 肝星細胞 肝移植 再発

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(肝癌)はひとたび門脈内に進展すれば容易に肝内転移を起こすことが治療抵抗性の一要因である。また、肝移植後の肝癌再発は全て血中の癌細胞あるいは移植時既に他臓器に存在する微小転移による再発のため制御困難である。肝星細胞は、肝線維化、肝再生のほか腫瘍環境の免疫系にも作用すると考えられているが、活性化肝星細胞と肝癌の転移・進展機構との関連はいまだ明らかでない。肝癌腫瘍微小環境における肝星細胞の役割に着目し、活性化肝星細胞が肝癌細胞の転移先臓器への着床、増殖を促進するという仮説のもと、肝星細胞制御により肝癌の肝移植後グラフト内再発が抑制できないかと考えた。

### 2. 研究の目的

肝癌の進展課程における肝星細胞の役割解明

肝星細胞制御により肝癌の経門脈的肝内転移や肝移植後のグラフト再発が抑制可能かどうかを明らかにすることを主な目的とした。癌進展は原発巣での癌細胞自身の変化に加え、転移先臓器の微小環境が転移形成に重要な役割を果たしている。これまで腫瘍悪性度とは別に何か転移状況が異なるという経験的に認識していた事象について、肝癌ニッチとしての肝星細胞に着目して科学的に解明することは学術的にも重要な意味合いを持つ。

### 3. 研究の方法

・肝癌細胞と肝星細胞の共培養による悪性度変化および IL-6 発現の意義

肝癌細胞株(Huh7、HepG2)と肝星細胞株(LX2、Li90)を transwell chamber を用いて培養し、肝癌細胞の悪性度評価を行い、幹細胞マーカー(E-cadherin、CD44、EpCAM)、IL-6 mRNA 発現を RT-PCR で測定した。さらに、共培養の培地に抗 IL-6 抗体を添加し、上記検討項目に加え pSTAT3 の発現を免疫染色にて評価した。

・肝癌細胞により誘導された癌関連線維芽細胞(CAF)のマクロファージ(MΦ)への影響

肝癌細胞(Huh7)を培養した condition medium (CM)で肝星細胞(LX2)を培養し、CAFを誘導した。単球細胞(THP-1)を M0 MΦ に分化させ、CAF-CM で培養した。この MΦ での M2 極性マーカー(CD163、CD206)mRNA 発現を RT-PCR で測定し、培養液中の VEGF 濃度を ELISA で評価した。

・腫瘍微小環境における CAF、癌関連 MΦ (TAM) の役割と Osteopontin (OPN) との関係

肝星細胞(Lx2)、MΦ を肝癌細胞株(Huh-7)の CM で 48 時間培養し CAF、TAM を誘導した。さらに Huh-7、TAM、CAF の CM で Lx2 を 48 時間培養し、3 種類の CAF (CAF1(Huh-7-CM)、CAF2(TAM-CM)、CAF3(CAF-CM))を作成した。3 種類の CAF の mRNA ( $\alpha$ SMA、FAP) 発現を RT-PCR で評価し、その CM を cytokine assay、ELISA で評価した。

### 4. 研究成果

(1) 肝癌細胞と肝星細胞の共培養による悪性度変化

肝癌細胞と肝星細胞とを共培養することで肝癌細胞の viability の上昇、遊走能の上昇を認めた。また、共培養により E-cadherin 発現の有意な低下が認められており、上皮間葉転換(EMT)が増強することが示唆された。さらに、幹細胞マーカーである CD44 発現を検討したところ、肝星細胞との共培養で CD44 の発現上昇を認めた(図1)。したがって、肝星細胞は肝癌細胞に対して悪性度の上昇、転移の促進といった作用を有すると考えられた。

(2) 肝星細胞における IL-6 発現の意義

Stat3 の上流に存在する IL-6 は肝癌の予後因子として知られている。肝癌細胞と肝星細胞の共培養により肝星細胞における IL-6 発現の上昇を認めた。次に共培養群において抗 IL-6 抗体を用いることにより、肝癌細胞の細胞増殖能および遊走能の有意な低下を認めた(図2)。また、肝癌細胞における pSTAT3 発現は抗 IL-6 抗体により有意な減弱を示した。さらに、抗 IL-6 抗体により肝癌細胞における E-cadherin 発現が上昇し、CD44・EpCAM といった幹細胞マーカーの有意な発現低下を認めた(図3)。

したがって、肝星細胞が IL-6 を分泌し、肝癌進展における IL-6-Stat3 経路を活性化することで EMT 誘導、癌増殖、さらには stemness 獲得に作用すること、またこの作用は抗 IL-6 抗体により肝星細胞の IL-6 分泌を阻害することで打ち消されることが明らかになった(図4)。

図1: 肝星細胞との共培養による癌細胞の悪性度変化

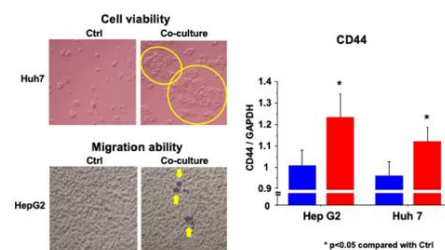


図2: 肝星細胞における IL-6 発現

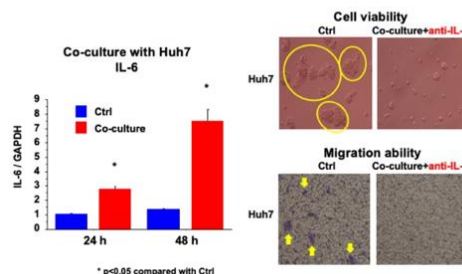
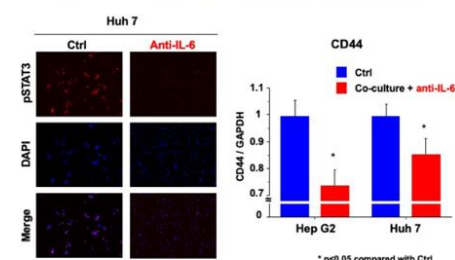


図3: IL-6制御による癌細胞の悪性度変化



(3) 肝癌細胞により誘導された CAF の MΦ への影響

肝癌細胞により誘導された CAF の CM で M0 MΦ を培養すると、TAM のマーカーである CD163 の発現上昇を認めた (図 5)。また、培養上清中の VEGF 分泌増加も認めたことから、TAM 由来 VEGF が癌細胞の EMT を誘導することにより腫瘍の悪性度上昇に関連することが示唆された。

肝星細胞は肝癌細胞により CAF へ誘導され、IL-6 を分泌し、肝癌進展における IL-6-Stat3 経路を活性化することで EMT 誘導、癌増殖、stemness 獲得に作用すること、CAF が M0 MΦ を M2 MΦ (TAM) への極性誘導を促進し、TAM 由来 VEGF が癌細胞の EMT を誘導することにより、肝癌の腫瘍微小環境における癌細胞-CAF-TAM interaction を形成することが明らかとなった。

(4) 腫瘍微小環境における CAF、TAM の役割

肝星細胞を TAM-CM または CAF-CM で培養すると CAF マーカーである  $\alpha$ SMA、FAP の mRNA 発現上昇を認めた。さらに、cancer-CM により誘導された CAF [CAF (Ca)], TAM-CM により誘導された CAF [CAF (TAM)], CAF-CM により誘導された CAF [CAF (CAF)], それぞれの CM で肝癌細胞を培養すると、全てにおいて増殖、遊走、浸潤の増強を認めたことから、腫瘍微小環境において、癌細胞、TAM、CAF それぞれから CAF が誘導され、悪性度増強につながることを示唆された。

(5) 腫瘍微小環境における Osteopontin (OPN) の意義

また、癌細胞、TAM、CAF から誘導された CAF の違いを明らかにするため、それぞれの CM の cytokine array を行ったところ、CAF (TAM)-CM で骨基質タンパク質である OPN の分泌が有意に上昇した。OPN が癌悪性度増強に関与するか検討するため、CAF (TAM)-CM で肝癌細胞を培養する際に OPN 阻害薬を加えたところ、増殖、遊走、浸潤は低下した (図 6)。TAM も OPN を分泌しており、TAM-CM から CAF を誘導する際に OPN 阻害薬を加えると、CAF (TAM)-CM からの OPN 分泌は有意に低下した。以上より、TAM が分泌した OPN が CAF (TAM) からの OPN 分泌を促進し、その OPN が腫瘍悪性度を増強していることを発見した。このことから、肝癌において、OPN を介した cancer-TAM-CAF interaction が新規治療 target となることが示唆された (図 7)。

図4：肝星細胞IL-6発現と癌悪性度との関連

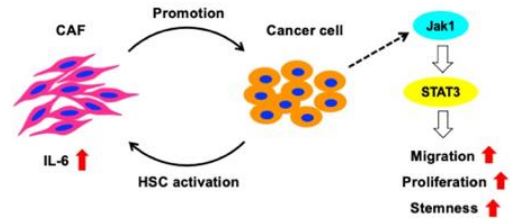


図5：CAFによるM2マクロファージ誘導

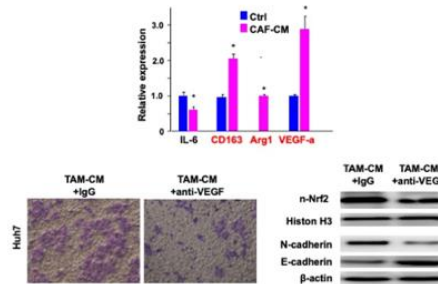


図6：OPNが腫瘍微小環境に与える影響

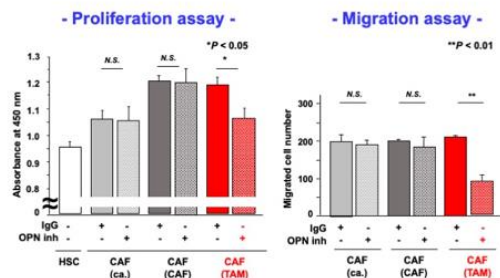
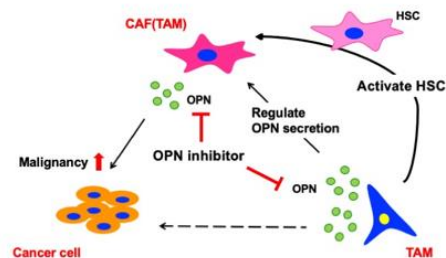


図7：OPNとcancer-TAM-CAF interaction



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tokuda K, Morine Y, Miyazaki K, Yamada S, Saito Y, Nishi M, Tokunaga T, Ikemoto T, Imura S, Shimada M.	4. 巻 12
2. 論文標題 The interaction between cancer associated fibroblasts and tumor associated macrophages via the osteopontin pathway in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 333-343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27881.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morine Y, Utsunomiya T, Saito Y, Yamada S, Imura S, Ikemoto T, Kitagawa A, Kobayashi Y, Takao S, Kosai K, Mimori K, Tanaka Y, Shimada M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Reduction of T-Box 15 gene expression in tumor tissue is a prognostic biomarker for patients with hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 4803-4812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27852.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wada Y, Tokuda K, Morine Y, Okikawa S, Yamashita S, Ikemoto T, Imura S, Saito Y, Yamada S, Shimada M.	4. 巻 11
2. 論文標題 The inhibitory effect of TU-100 on hepatic stellate cell activation in the tumor microenvironment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 4593-4604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27835.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwahashi S, Shimada M, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Saito Y, Yamada S, Utsunomiya T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Effect of epigenetic modulation on cancer sphere.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Invest.	6. 最初と最後の頁 70-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2152/jmi.67.70.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 IWAHASI SHUICHI, RUI FENG, MORINE YUJI, YAMADA SHINICHIRO, SAITO YU, IKEMOTO TETSUYA, IMURA SATORU, SHIMADA MITSUO	4. 巻 40
2. 論文標題 Hepatic Stellate Cells Contribute to the Tumor Malignancy of Hepatocellular Carcinoma Through the IL-6 Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 743-749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Feng Rui, Morine Yuji, Ikemoto Tetsuya, Imura Satoru, Iwahashi Shuichi, Saito Yu, Shimada Mitsuo	4. 巻 16
2. 論文標題 Nrf2 activation drive macrophages polarization and cancer cell epithelial-mesenchymal transition during interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-018-0262-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 沖川昌平, 森根裕二, 徳田和憲, 齋藤裕, 山田眞一郎, 山下祥子, 宮崎克己, 池本哲也, 居村暁, 島田光生
2. 発表標題 腫瘍微小環境におけるOsteopontinの意義
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Iwahashi S, Shimada M, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Saito Y, Yamada S, Feng R.
2. 発表標題 The effect of hepatic stellate cells on hepatocellular carcinoma progression.
3. 学会等名 ASCO-GI (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田佑馬, 岩橋衆一, 森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 齋藤裕, 馮睿, 島田光生
2. 発表標題 腫瘍関連マクロファージに着目した肝癌細胞悪性度上昇の検討
3. 学会等名 第19回日本肝がん分子標的治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田眞一郎, 島田光生, 森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 岩橋衆一, 齋藤裕, 和田佑馬, 良元俊昭
2. 発表標題 肝胆膵領域癌におけるNrf2に着目した腫瘍関連マクロファージ活性化
3. 学会等名 第52回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田佑馬, 森根裕二, 齋藤裕, 居村暁, 池本哲也, 岩橋衆一, 山田眞一郎, 良元俊昭, 太田昇吾, 島田光生
2. 発表標題 癌微小環境における大建中湯の肝星細胞活性化制御・癌細胞オートファジーを介した癌細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩橋衆一, 島田光生, 森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 齋藤裕, 山田眞一郎
2. 発表標題 The effect of hepatic stellate cells on hepatocellular carcinoma progression
3. 学会等名 第31回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒川悠佑, 宮崎克己, 吉川雅登, 山田眞一郎, 齋藤裕, 池本哲也, 居村暁, 森根裕二, 島田光生
2. 発表標題 肝癌細胞におけるNrf2に着目した腫瘍関連マクロファージ活性化の検討
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwahashi S, Shimada M, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Saito Y, Yamada S, Feng Rui.
2. 発表標題 The effect of hepatic stellate cells on hepatocellular carcinoma progression.
3. 学会等名 ASCO-GI
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩橋衆一, 島田光生, 森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 齋藤裕, 寺奥大貴
2. 発表標題 肝星細胞はIL-6を介して肝癌細胞の悪性度増強・転移促進に寄与する
3. 学会等名 第54回日本肝癌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩橋衆一, 島田光生, 居村暁, 森根裕二, 池本哲也, 齋藤裕, 寺奥大貴
2. 発表標題 肝星細胞はIL-6を介して肝癌細胞の悪性度増強・転移促進に寄与する
3. 学会等名 第17回日本肝がん分子標的治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩橋衆一, 島田光生, 森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 齋藤裕, 寺奥大貴
2. 発表標題 肝星細胞はIL-6を介して肝癌細胞の悪性度増強・転移促進に寄与する
3. 学会等名 第51回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	常山 幸一 (TSUNEYAMA Koichi)  (10293341)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授  (16101)	
研究分担者	池本 哲也 (IKEMOTO Tetsuya)  (20398019)	徳島大学・病院・特任教授  (16101)	
研究分担者	岩橋 衆一 (IWAHASHI Shuichi)  (30531751)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門 研究員  (16101)	削除：2019年3月8日
研究分担者	齋藤 裕 (SAITO Yu)  (50548675)	徳島大学・病院・特任助教  (16101)	
研究分担者	森根 裕二 (MORINE Yuji)  (60398021)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授  (16101)	



7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------