

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10165

研究課題名(和文)肝星細胞を標的とした肝細胞癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文)A new strategy for treatment of HCC by regulating hepatic stellate cell

研究代表者

田代 裕尊(Tashiro, Hirotaka)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：90359894

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文):肝星細胞の活性化の制御法として、インテグリン抗体その他で検討したが、十分な抑制が得られず、アンチトロンビン(AT)に着目し検討した。血中AT低値マウスを用いて、ジエチルニトロサミン(DEN)と四塩化炭素による慢性肝障害からの肝腫瘍を誘発しATIIIの抗炎症作用と抗腫瘍効果を検討した。肝腫瘍径と腫瘍個数および肝重量は有意にAT低値マウスにおいて高値であった。AT低値マウス群でTUNEL陽性細胞、Cleaved caspase-3陽性細胞、8-OHdG陽性細胞、Ki-67indexはそれぞれ有意に増加した。血中AT活性値が低値のマウスでは、化学発癌誘発による肝腫瘍発症を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文):Antithrombin (AT) is not only a major regulator of hemostasis, but also has anti-inflammatory properties. We aimed to investigate whether AT is associated with development of HCC. Liver tumors were developed in ATIII-insufficient (AT+/-) mice and wild-type (AT+/+) mice treated with DEN and CCl4. Tumor size and the number of DEN and CCl4-induced liver tumors were significantly enhanced in AT-insufficient mice compared with wild-type mice. The serum transaminases, cell death and expression of cleaved caspase-3 in livers were exaggerated in AT-insufficient mice compared with wild-type mice. The level of 8-OHdG, a marker of oxidative DNA damage, in liver was significantly increased in AT-insufficient mice compared with wild-type mice. AT insufficiency led to the increased susceptibility to liver-tumorigenesis through amplifying inflammation.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 肝星細胞 癌間質 アンチトロンビン

1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤・転移は癌微小環境に依存している。肝星細胞は肝類洞壁細胞で、肝繊維化において線維芽細胞様の形態・機能的変化を示し、vascular endothelial growth factor (VEGF)・Transforming growth factor- β (TGF- β)・コラーゲンなどの生理活性物質を分泌し中心的役割を果たしている。一方、肝癌組織においては、肝星細胞は cancer-associated fibroblast(CAF)として癌微小環境の中で肝細胞癌の増殖・浸潤能を亢進させ癌進展に寄与している事も明らかになりつつある。本研究課題では、肝星細胞欠損動物などを用い肝細胞癌における肝星細胞の CAF としての機能を解明し、さらに活性化肝星細胞を制御する事による癌間質を標的とした肝細胞癌の新規治療戦略を構築することが研究目的とした。脂肪肝ラットを作製し、肝星細胞を分離し、肝細胞癌との共培養により肝細胞癌の増殖・浸潤能に与える影響について正常肝由来の肝星細胞と比較検討した。まず CXCL2 のリセプター抗体 (CXCR2 抗体) を用いて、腫瘍の増殖・運動を検討すると、CXCR2 抗体により癌細胞の増殖能および運動能は抑制されなかった。次に、抗インテグリン抗体を用い、ラットヌードマウスでの共移植実験においても、がん細胞の増殖は抑制されなかった。そこで、新たにアンチトロンピン (AT) が肝星細胞・好中球の活性化を抑制したことに着目し、実験を進めた。ATIII は、抗炎症作用を有する。内皮細胞は LPS 刺激において、TNF- α 、IL-8、IL-6 などのサイトカインを分泌する。ATIII は、この LPS 刺激における炎症反応を、抗炎症作用を有する PG I_2 の分泌を促進し、炎症を抑制することも知られている。一方、CRP と癌の進行度、好中球・リンパ球比と癌の進展との関連など、炎症がどのような機序の基にがんの進展に関わっているかは不明な点も多いが、慢性炎症は癌の進展と密接に関連

することも明らかになっている。そこで、ATIII が抗炎症作用を介して抗腫瘍的に生物学的作用を有することが実験命題として提起される。

2. 研究の目的

今回、ATIII ノックアウトマウスを用いて、化学肝発癌と肝転移への ATIII の効果について研究する。

3. 研究の方法

AT 活性低値 (AT^{+/-}; AT 活性約 60%) マウスを用いて、肝癌転移モデルを作製し、炎症と癌の進展について検討した。

肝がん誘発モデルでは、8 週齢の B6 mice に 10mg/Kg DEN、その後 2 週置きに CCl₄ (0.5mg/kg) の投与を最長 27 回投与する。

4. 研究成果

1) DEN と四塩化炭素投与短期モデル (2 回投与)

AT 欠損マウスにおいて、AST は有意に高値 (図 1) であり、また病理学的検討では、有意に肝障害と炎症が進行していた。すなわち、TUNEL 染色において ATIII 欠損マウスで有意にアポトーシス細胞が増加し、また免疫染色ではカスパーゼ 3 陽性細胞が有意に増加していた (図 2)。さらに、ELISA による血中 IL-6 は、AT 欠損マウスにおいて有意に高値であった (図 3)。

図 1 .

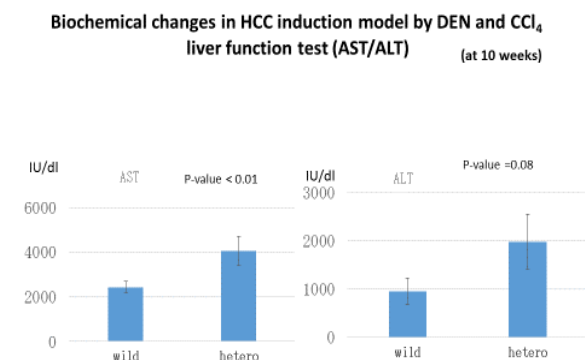


図 2 .

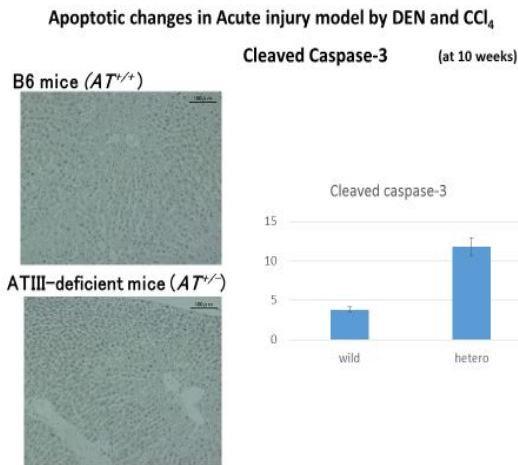
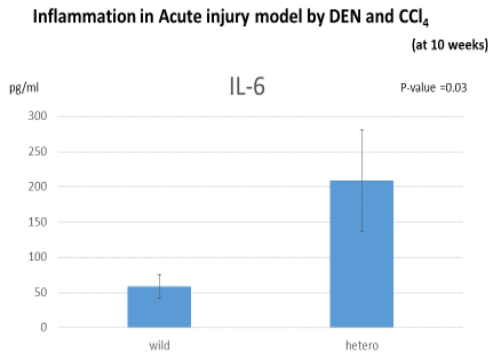


図 3 .



2) 四塩化炭素投与 27回(54週)モデルを作製し、50週モデルと同様に検討した。AT欠損マウス(AT活性約50%)では、8匹中8匹において肝腫瘍を認めた。一方、野生型マウス(AT活性約100%)では7匹中5匹に肝腫瘍の発生を認めた(図4)。腫瘍径と腫瘍個数は有意にAT欠損マウスで高値であった(図5)。また酸化ストレスによるDNA損傷を8-oxo-dGで検討すると、AT欠損マウスで有意に高値であった(図6)。

図 4 .

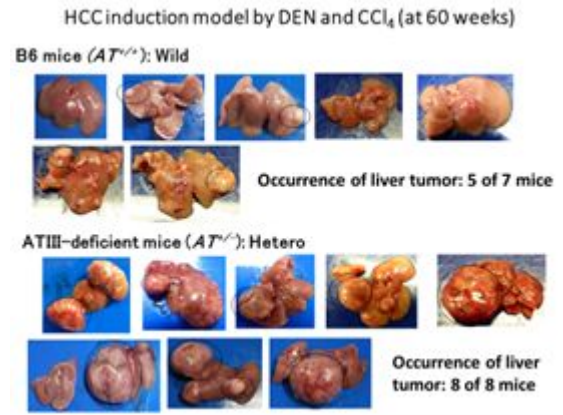


図 5 .

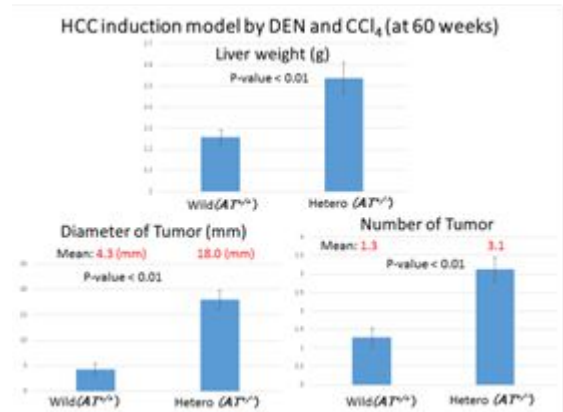
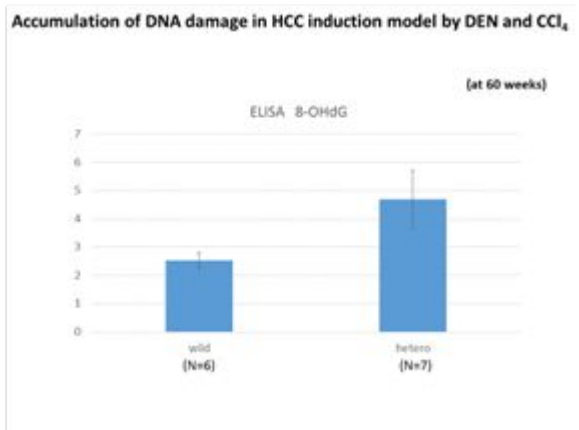


図 6 .

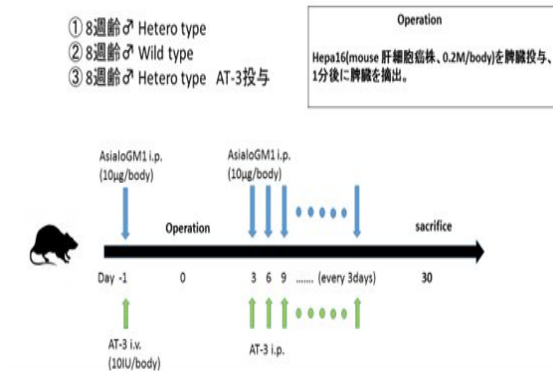


3) 肝転移実験の研究。

実験マウスに脾臓より腫瘍細胞を注入し、肝転移モデルを作製した。マウスにはアシアロGM1抗体を投与し、免疫抑制状態にした。

A T I I I 投与は、3日おきに投与した。

肝細胞癌肝内転移モデルマウス

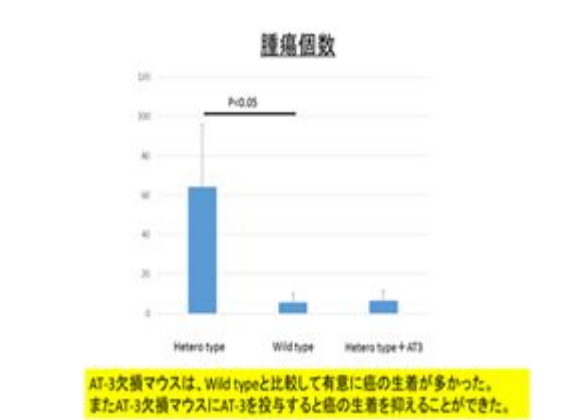


A T I I I 低下マウスにおいては、ワイルドマウスに比べ、がん転移巣が有意に増加し、さらにA T I I Iの投与によりがん転移巣は抑制された(図7、8)。

図7 .



図8 .



考察

A T 欠損マウスでは、D E Nと四塩化炭素投

与による肝障害および肝腫瘍発症が増加していた。A Tは抗炎症作用を介して肝障害や肝腫瘍の発症を抑制する事が示唆された。現在、A Tの投与によりA T欠損マウスでの腫瘍発生や肝機能障害が軽減されるか検討中である。

また、肝転移モデルにおいて、A T I I I 欠損マウスでは、肝転移が促進され、A T I I I 投与により、その肝転移は有意に抑制された。現在、A T I I Iによる転移抑制もメカニズムを検討中であるが、トロンピンやI L - 8 刺激による腫瘍促進がA T I I Iにより抑制されると仮定し、ヒト臨床検体や in vitro で検討中である。

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 2 件)

1 . 田代裕尊、アンチトロンピン I I I 低下は肝発癌を促進する。第76回日本癌学会学術総会2017年

2 . 田代裕尊、血中アンチトロンピン活性の低下は肝腫瘍発症を促進する。第118回日本外科学会定期学術総会

[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

田代裕尊 (Tashiro, Hirotaka)
独立行政法人国立病院機構 (呉医療センター
臨床研究部) ・ その他部局等 ・ その他

研究者番号： 9 0 3 5 9 8 9 4

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()