

令和 2 年 9 月 10 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15040

研究課題名(和文) 進行肝細胞癌における癌周辺微小環境を標的とした新規治療法の確立

研究課題名(英文) Sphingosine-1-phosphate receptor-1 promotes vascular invasion and EMT in hepatocellular carcinoma

研究代表者

野島 広之 (NOJIMA, HIROYUKI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：10507320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌において、EMT、cancer stemnessの制御に、スフィンゴシン1リン酸(S1P)のレセプターの関与について解析した。S1Pレセプター1(S1PR1)が高発現では、全生存期間、無再発生存期間の短縮、脈管浸潤や肝内転移例を多く認めた。肝細胞癌株にS1PR1agonist、antagonist投与にてS1PR1の作用でEMTが促進される可能性を示した。肝細胞癌株ではS1PR1にてcell invasionの促進、細胞が間葉系細胞へと形態変化を示した。S1PR1がEMTやcancer stemnessの誘導、同レセプターの制御が肝細胞癌における新たな治療となりうる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行肝細胞癌は未だ予後不良であり、特に血管浸潤を有する場合は肝内転移や術後早期の再発をしばしば認める。血管浸潤や転移にはepithelial-mesenchymal transition (EMT)、cancer stemnessの関与が示唆されている。S1PR1がEMTを促進しcancer stemnessを誘導していることが示唆された。S1PR1がEMTやcancer stemnessの誘導しており、同レセプターの制御が肝細胞癌における新たな治療となりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Among patients with HCC, the high S1PR1 expression group had significantly shorter overall survival (OS) than the low S1PR1 expression group. Moreover, high S1PR1 expression levels were significantly associated with shorter recurrence-free survival (RFS), and increased risk for portal and hepatic vein invasion and intrahepatic metastasis. Moreover, these patients had significantly shorter OS and RFS irrespective of the expression of S1PR3. Multivariate analyses revealed that S1PR1 overexpression was an independent prognostic factor in HCC patients. S1PR1 overexpression positively correlated with vimentin and MMP-9 expression, and negatively correlated with E-cadherin. Additionally, S1PR1 overexpression induced EMT and enhanced tumor invasion and cancer stemness. These results indicate the potential of S1PR1 to serve as a therapeutic target for HCC patients with vascular invasion.

研究分野：消化器外科学

キーワード：進行肝細胞癌 スフィンゴシン1リン酸 EMT cancer stemness

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、治療の進歩にもかかわらず、未だ予後不良である。進行肝細胞癌は術後早期に肝転移再発を来し易く、とくに脈管浸潤を伴うものは予後不良と報告されている。Epithelial mesenchymal transition (EMT)は様々な癌において腫瘍の浸潤や転移の促進における中心的な役割を担っていると報告されており、また、cancer stemness は転移再発を促進していると考えられている。しかし、肝細胞癌においては、このようなメカニズムの制御因子は未だ明確ではない。

2. 研究の目的

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P)はスフィンゴシン 1 リン酸レセプターを介して、細胞増殖、遊走、分化といったさまざまな作用を発揮する脂質メディエーターである。スフィンゴシン 1 リン酸レセプターの中で S1PR1、3 は腫瘍に深くかかわる作用を有しており、様々な癌において腫瘍の遊走性や浸潤能、血管新生を促進すると報告されている。肝細胞癌において、S1PR 発現が EMT や cancer stemness に関与し、更には S1PR の制御が脈管浸潤を有する肝細胞癌の治療となりうるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

2009 年～2012 年に当院で初回肝切除を施行した肝細胞癌 108 例を対象とし、切除標本に対し、S1PR1 と S1PR3 の免疫染色を行い、高発現群と低発現群に分類し、臨床病理学的背景因子を検討した。また、同じ標本に対し、vimentin、MMP-9、E-cadherin の免疫染色を行い、S1PR1 の発現との相関関係を検討した。肝細胞癌株である HuH7 細胞と HLE 細胞に S1PR1 のアゴニストである SEW2871、S1PR1 のアンタゴニストである W146 を投与し、種々の細胞実験を行った。western blot を用いて、S1PR1、EMT marker である E-cadherin、N-cadherin、vimentin、MMP-9、Snail の発現を評価した。細胞浸潤アッセイを行って、細胞浸潤能を、3D カルチャーで細胞の形態変化を、アノキスアッセイで、アノキス耐性を評価した。得られたデータは JMP11 を用いて統計学的解析を行った。

4. 研究成果

108 例中、男性が 85 例、女性が 23 例であった。年齢の平均は 65 ± 1.0 歳で腫瘍径の平均は 51.3 ± 3.7 mm、術式は拡大葉切除が 4 例、葉切除が 13 例、区域切除が 24 例、亜区域切除が 48 例、部分切除が 19 例であった。病理所見として低分化が 9 例、中分化が 76 例、高分化が 23 例であった。UICC のステージ分類では I が 11 例、II が 45 例、III が 24 例、IV が 28 例であった。S1PR1、S1PR3 とともに高発現群では全生存率と無再発生存率の低下を認めた。臨床病理学的背景因子において、S1PR1 高発現群では門脈浸潤、肝静脈浸潤、肝内転移、AFP 高値、PIVKAI 高値例を有意に多く認め、S1PR3 の高発現群では、門脈浸潤例を有意に多く認めた。S1PR1 および S1PR3 の高発現と低発現を 4 群にわけて比較すると、S1PR3 の高発現、低発現に関わらず、S1PR1 高発現において全生存率、無再発生存率の低下を強く認めた。肝細胞癌の全生存率における多変量解析を行うと、S1PR1 の高発現が独立した予後不良因子として抽出され、無再発生存率に対する多変量解析では、肝炎ウイルス感染、腫瘍径 (> 50 mm)、S1PR1 高発現、S1PR3 高発現が独立した予後不良因子として抽出された。また、EMT マーカーの免疫染色を行うと、vimentin、MMP-9 の発現では S1PR1 の発現と正の相関を、E-cadherin の発現と S1PR1 の発現とは負の相関を認めた。細胞実験において高分化肝細胞癌株である HuH7 細胞と低分化肝細胞癌株である HLE 細胞を用いて western blot で EMT マーカーの発現を調べると HLE 細胞では vimentin の発現を強く、HuH7 細胞では E-cadherin の発現を強く認めた。続いて、SEW2871 投与群では HuH7 細胞、HLE 細胞ともに間葉系マーカーである vimentin、N-cadherin、MMP-9、snail の発現の増強を認め、上皮系マーカーである E-cadherin の減弱を認め、W146 投与群では反対の結果を認めた。細胞浸潤アッセイでは HuH7 細胞、HLE 細胞ともに S1PR1 の活性化にて細胞浸潤能が促進されることが認められた。つづいて 3D カルチャーにて細胞の形態変化を評価すると、HuH7 細胞、HLE 細胞ともに S1PR1 を活性化すると間葉系である spindle shaped 細胞へと形態変化を示し、S1PR1 を抑制すると上皮系である spheroid cyst へ形態変化を示した。アノキスアッセイにてアノキス耐性を評価すると、HuH7 細胞、HLE 細胞ともに S1PR1 を活性化するとアノキス耐性の増強を認めた。このことから、S1PR1 が EMT や細胞浸潤を促進し、cancer stemness へ関与していることが示唆された。

肝細胞癌において S1PR1 高発現が予後不良であり、また、S1PR1 高発現が門脈浸潤や肝静脈浸潤、肝内転移のリスク因子であることを認めた。本研究において、低分化肝細胞癌代表細胞株である HLE 細胞では高分化肝細胞癌代表細胞株である HuH7 細胞に比べて S1PR1、vimentin の発現が強く、また、S1PR1 の活性化にて Snail が増強し、EMT と細胞浸潤が促進された。このことから S1PR1 の発現の増加が門脈浸潤や肝静脈浸潤を引き起こし、予後不良を来したと考えられた。Cancer stemness とは腫瘍の自己複製能や多分化能などの性質であり、転移や再発に関連していると報告されている。本研究では S1PR1 を活性化することにより、3D カルチャーにて細胞の分化が変化することを示し、アノキスアッセイではコロニーフォーメーションが促進されることを示した。このことから S1PR1 の活性化は腫瘍の浸潤能の促進だけでなく、cancer stemness の獲得にも関与し、腫瘍細胞の転移先において、腫瘍細胞の細胞死を抑制することから、肝内転

移や遠隔転移に寄与する可能性が考えられた。以上より、S1PR1 は EMT を通して細胞浸潤を促進し、cancer stemness の獲得により、肝内転移や血行性転移を起こし、肝切除後の予後不良な結果へと寄与する可能性が考えられた。この結果から脈管浸潤を有する肝細胞癌患者に対し、S1PR1 の制御は肝細胞癌の新たな治療標的となりうることが考えられた。

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 3件）

1. 著者名 Tamura A, Ogasawara T, Fujii Y, Kaneko H, Nakayama A, Higuchi S, Hashimoto N, Miyabayashi Y, Fujimoto M, Komai E, Kono T, Sakuma I, Nagano H, Suzuki S, Koide H, Yokote K, Iseki K, Oguma R, Matsue H, Nojima H, Sugiura K, Yoshitomi H, Ohtsuka M, Rahmutulla B, Kaneda A, Inoshita N, Ogawa S, Tanaka T	4. 巻 103
2. 論文標題 Glucagonoma With Necrolytic Migratory Erythema: Metabolic Profile and Detection of Biallelic Inactivation of DAXX Gene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab	6. 最初と最後の頁 2417-2423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jc.2017-02646	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 Matsuo M, Furukawa K, Shimizu H, Yoshitomi H, Takayashiki T, Kuboki S, Takano S, Suzuki D, Sakai N, Kagawa S, Nojima H, Ohsuka M	4. 巻 4
2. 論文標題 Novel treatment strategy with radiofrequency ablation and surgery for pregnant patients with hepatocellular carcinoma: a case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-018-0434-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi M, Nojima H, Kuboki S, Horikoshi T, Yokota T, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Takano S, Ohtsuka M	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Comparing prognostic factors of Glut-1 expression and maximum standardized uptake value by FDG-PET in patients with resectable pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 Aug 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2020.07.407.	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 Ashizawa Y, Kuboki S, Nojima H, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Takano S, Miyazaki M, Ohtsuka M	4. 巻 3
2. 論文標題 Progression by Inhibiting GRIM19 Expression in Human Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 954-970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yokota T, Takano S, Yoshitomi H, Kagawa S, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Suzuki D, Sakai N, Nojima H, Mishima T, Nakadai E, Ohtsuka M	4. 巻 10
2. 論文標題 Successful treatment of a locally advanced unresectable pancreatic cancer patient with interstitial pneumonitis by conversion surgery following gemcitabine plus nab-paclitaxel chemotherapy: A case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 419-424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2019.1807	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakada S, Kuboki S, Nojima H, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Takano S, Miyazaki M, Ohtsuka M	4. 巻 3
2. 論文標題 Roles of Pin1 as a Key Molecule for EMT Induction by Activation of STAT3 and NF- B in Human Gallbladder Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 907-917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-018-07132-7	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 野島広之 久保木 知 吉富秀幸 古川勝規 高屋敷 吏 高野重紹 鈴木大亮 酒井 望 賀川真吾 佐藤豊 宮崎 勝 大塚将之
2. 発表標題 胃癌肝転移に対する適切な手術適応、予後予測因子としてのmodified Glasgow prognostic score (mGPS)の有用性の検討
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 H Nojima, H Yoshitomi, K Furukawa, T Takayashiki, S Kuboki, S Takano, D Suzuki, N Sakai, S Kagawa T Mishima, M Miyazaki, M Ohtsuka
2. 発表標題 Risk factors for postoperative complications after hepatectomy in super-elderly patients
3. 学会等名 第30回日本肝胆膵外科学会・学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 野島広之 吉富秀幸 古川勝規 高屋敷 史 久保木 知 高野重紹 鈴木大亮 酒井 望 宮崎 勝 大塚将之
2. 発表標題 80歳以上の超高齢者に対する肝切除術での術後合併症とリスク因子の検討
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 横田哲生 野島広之 久保木 知 吉富秀幸 古川勝規 高屋敷 史 高野重紹 鈴木大亮 酒井 望 賀川真吾 佐藤豊 宮崎 勝 大塚将之
2. 発表標題 肝細胞癌におけるスフィンゴシン1リン酸レセプターの発現についての検討
3. 学会等名 第16回 日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 野島広之, 高野重紹, 吉富秀幸, 古川勝規, 高屋敷史, 久保木知, 鈴木大亮, 酒井望, 賀川真吾, 三島敬, 中台英里, 大塚将之
2. 発表標題 局所進行膵癌に対する門脈合併切除再建の意義
3. 学会等名 第80回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 野島広之 吉富秀幸 古川勝規 高屋敷 史 久保木 知 高野重紹 鈴木大亮 酒井 望 賀川真吾 三島 敬 宮崎 勝 大塚将之
2. 発表標題 当科における3D腹腔鏡を使用した腹腔鏡下脾動静脈温存尾側膵切除術
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～2020年

1. 発表者名 H Nojima, , M Ohtsuka
2. 発表標題 Initial results and the effectiveness of laparoscopic hepatectomy
3. 学会等名 2nd World Congress of the International Laparoscopic Liver Society
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 野島広之 久保木 知 吉富秀幸 古川勝規 高屋敷 吏 高野重紹 鈴木大亮 酒井 望 賀川真吾 大塚将之
2. 発表標題 肝門部領域胆管癌での胆道再建を伴う肝葉切除におけるSSIリスク因子の検討野島広之 久保木 知 吉富秀幸 古川勝規 高屋敷 吏 高野重紹 鈴木大亮 酒井 望 賀川真吾 大塚将之
3. 学会等名 3第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 野島広之 清水宏明 幸田圭史 吉富秀幸 古川勝規 高屋敷 吏 久保木 知 高野重紹 大塚将之
2. 発表標題 脾動脈背側アプローチによる腹腔鏡下尾側脾切除術の有用性
3. 学会等名 第11回膵臓内視鏡外科研究会
4. 発表年 2019年～2020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
---------------------------	-----------------------	----