

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16333

研究課題名(和文)肝細胞癌におけるPDIA3の役割：新規治療標的としての臨床応用を目指した検討

研究課題名(英文)The role of PDIA3 in hepatocellular carcinoma

研究代表者

高田 英志(Takata, Hideyuki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70591262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究でprotein disulfideisomerase A3(PDIA3)の高発現が肝細胞癌(HCC)の予後不良と関連することを示してきた。ヒト肝細胞癌培養株を用いた今回の研究では、PDIA3の発現を抑制すると増殖能が低下し、アポトーシスが増加することを明らかにした。今回の研究結果から、PDIA3はHCCの細胞増殖やアポトーシス抑制に関与していると考えられる。今回研究ではさらに腫瘍の細胞増殖において重要な役割をするmTOR経路に注目し、PDIA3の発現を抑制しその下流の分子の変化を調べたが、細胞株によって異なる結果であり、一定の見解は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト肝細胞癌培養株を用いた今回の研究で、PDIA3の発現がHCCの細胞増殖やアポトーシス抑制に関与していることが明らかとなった。PDIA3制御によって腫瘍の増殖抑制やアポトーシス促進が得られれば、予後改善につながる新規肝細胞癌治療薬に結び付く可能性がある。PDIA3のmTOR経路への関与については一定の見解は得られなかったが、mTOR経路への関与を示唆する結果であり、今後のHCCにおけるPDIA3の役割のさらなる解明の一助になると考える。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have shown that high expression of protein disulfideisomerase A3 (PDIA3) is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma (HCC). In the present study, using human hepatocellular carcinoma culture lines, we showed that suppression of PDIA3 expression decreased cell growth and increased apoptosis. The results of this study suggest that PDIA3 is involved in HCC cell proliferation and suppression of apoptosis. In this study, we focused on the mTOR pathway, which plays an important role in tumor cell proliferation, and suppressed the expression of PDIA3 and investigated changes in downstream molecules. However, the results are cell line dependent and its role is still unclear.

研究分野：消化器外科

キーワード：PDIA3 肝細胞癌 mTOR

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌（HCC）は近年の治療法の進歩により予後は改善されつつある。しかしながら、根治的
外科切除後の累積再発率は5年で約70%とまだまだ高く、新規の予後予測分子や治療標的薬の
創出が望まれている。これまで本研究者らは、根治的外科切除がおこなわれたHCC症例のホルマ
リン固定パラフィン包埋標本を用い、網羅的蛋白発現解析の研究をおこなってきた。Antigen
processing and presentation のカテゴリーに属する蛋白質である protein disulfide-
isomerase A3 (PDIA3) が癌部で2倍以上高く発現していることに注目し、HCCにおけるPDIA3
の高発現が癌の予後不良と関与することを初めて示した (Takata, et al. Oncol Lett, 2016)。
さらに、PDIA3は、小胞体ストレス伝達に関連しており、小胞体ストレスによるアポトーシスを
抑制する (Corazzari M, et al. Br J Cancer, 2007)。これまでの本申請者らの研究においても、
PDIA3が高発現のHCCではアポトーシスが少ないことが示されている (Takata, et al. Oncol
Lett, 2016)。HCCの細胞増殖においてはmTOR経路が重要な役割をすることが既に知られてい
る。PDIA3はmTORと複合体を形成し、シグナル経路の調節に関与しており、HCCにおいてもPDIA3
がmTOR経路を介して細胞増殖に関与している可能性が考えられる。HCCにおけるPDIA3の役割
のさらなる解明が必要であるが、PDIA3はHCCの肝切除後の予後予測因子となるばかりでなく、
新規の治療標的分子となる可能性がある。

2. 研究の目的

PDIA3高発現がHCCの不良な予後に関連し、またPDIA3がアポトーシス抑制や細胞増殖に関与す
ることがこれまでの研究で言われており、本研究における目的はHCCのPDIA3の役割を解明し、
PDIA3を用いたHCCにおける診断や治療への応用を目指すことである。PDIA3制御によって腫瘍
のアポトーシス促進や増殖抑制が得られれば、予後改善につながる新規肝細胞癌治療法に結び
付く可能性もある。また、PDIA3制御によって変動する分子を解明することで、HCCのさらなる
病態解明につながる可能性がある。本研究では、ヒト肝細胞癌培養株を用いて、PDIA3の発現と
細胞増殖およびアポトーシスの関連について検討した。また、PDI阻害剤投与による細胞増殖へ
の影響、およびmTOR経路に関連する分子への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝細胞癌培養細胞株におけるPDIA3発現抑制および細胞増殖との関連

2種類のヒト肝細胞癌培養株 (HuH-7、Li-7) を培養し、western blottingにてPDIA3の発現を
確認した。PDIA3に対するsiRNAを2種類のヒト肝細胞癌培養株 (HuH-7およびLi-7) に導入
し、PDIA3の発現を抑制した。PDIA3の発現抑制による24、48、72時間後の細胞増殖の変化につ
いて検討した。

(2) PDIA3発現と細胞増殖能とアポトーシスとの関連

細胞増殖能およびアポトーシスを、Ki-67およびFITC-Annexin Vの蛍光免疫染色により解析し、
PDIA3発現との関連を検討した。

(3) PDI阻害剤 (16F16) 投与と細胞増殖の関連

PDI 阻害剤 (16F16) 投与による細胞増殖への影響について検討した。16F16 の濃度を 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ に設定し、24、48 および 72 時間後の細胞増殖について評価し、72 時間後の 50% 阻害濃度を測定した。

(4) PDIA3 発現抑制および 16F16 による mTOR 経路への影響

PDIA3 の mTOR 経路への関連の評価として、PDIA3 発現抑制および 16F16 投与下で mTOR 経路の下流に位置する p70 S6 kinase および phosphorylation of p70 S6 kinase の発現を western blotting にて確認した。

4 . 研究成果

(1) ヒト肝細胞癌培養細胞株における PDIA3 発現抑制および細胞増殖との関連

HuH-7 および Li-7 へ PDIA3 に対する siRNA を導入した結果、72 時間後の培養において有意に細胞増殖の減少がみられた (図 1A, B)。Western blotting にて各々の細胞株において PDIA3 の発現が抑制されている事が確認された (図 1C)。

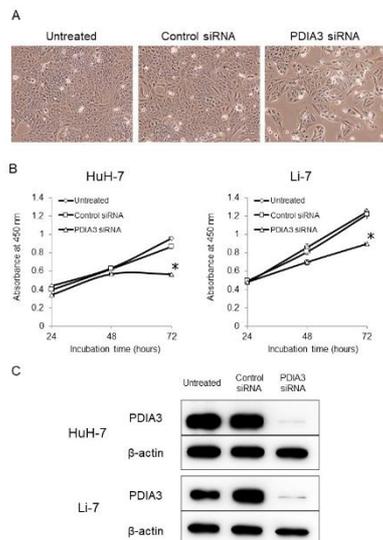


図 1

PDIA3 発現抑制により有意に細胞増殖が抑制された。

(2) PDIA3 発現と細胞増殖能とアポトーシスとの関連

HuH-7 および Li-7 へ PDIA3 に対する siRNA を導入し、72 時間培養した後に Ki-67 および FITC-Annexin V の蛍光免疫染色をおこない、細胞増殖能およびアポトーシスについて評価した (図 2A)。PDIA3 の発現を抑制すると、抑制しなかった場合と比較して有意に Ki-67 陽性細胞の占める比率が少なかった (図 2B)。反対に、PDIA3 の発現を抑制すると、有意に FITC-Annexin V 陽性細胞の占める比率が高かった (図 2C)。

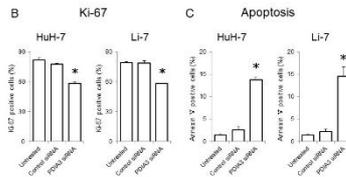
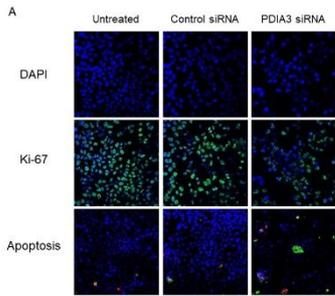


図 2

PDIA3 の発現を抑制した細胞株では、増殖能は低下し、アポトーシスが多い。

(3) PDI 阻害剤 (16F16) 投与と細胞増殖の関連

16F16 を投与し細胞増殖の評価をした結果、投与しなかった群と比較し、1.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度を投与した群で有意に細胞増殖の低下がみられ、16F16 の濃度が 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 以上では細胞増殖はみられなかった (図 3B)。今回の研究において、16F16 の 50%阻害濃度は、HuH-7 が 1.1 $\mu\text{g/ml}$ で、Li-7 が 1.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。

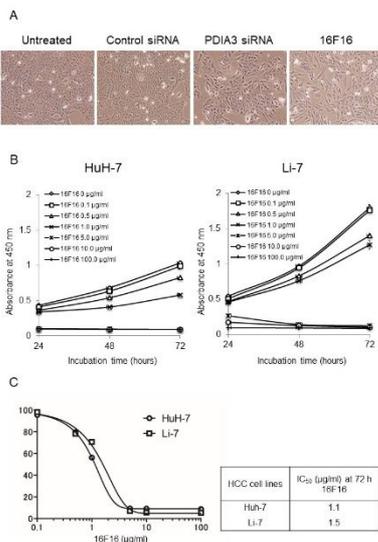


図 3

16F16 投与により細胞増殖が抑制された。

(4) PDIA3 発現抑制および 16F16 による mTOR 経路への影響

HuH-7 では PDIA3 の発現を抑制させても、p70 S6 kinase および phosphorylation of p70 S6 kinase の発現に変化はみられなかった。一方、Li-7 では PDIA3 の発現抑制により、phosphorylation of p70 S6 kinase の発現低下がみられた。16F16 投与では、いずれの細胞株においても p70 S6 kinase および phosphorylation of p70 S6 kinase の発現に変化はみられなかった。

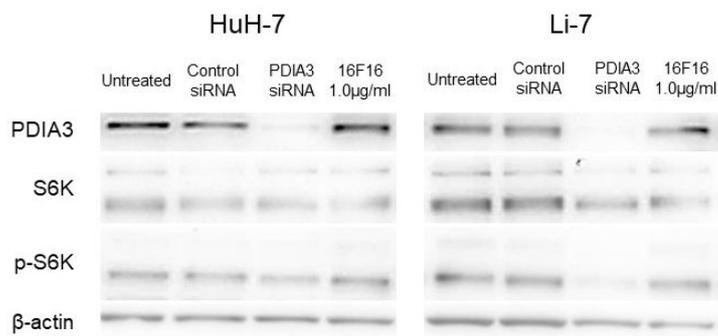


図 4
Li-7 において PDIA3 の発現抑制により、phosphorylation of p70 S6 kinase の発現低下がみられた

これまでの研究で、PDIA3 高発現の HCC 症例ではアポトーシスが少なく、増殖能が高いことを示してきた (Takata H, et al. Oncol Lett, 2016)。今回研究では、2 種類のヒト肝細胞癌培養株 (HuH-7、Li-7) において、PDIA3 の発現を抑制すると、増殖能は低下し、アポトーシスが多くなることを新たに示した。また、PDI 阻害剤である 16F16 を投与すると、細胞増殖の抑制がみられた。PDIA3 が HCC の成長に関与しているものと考えられる。現時点で、HCC における PDIA3 の詳細なメカニズムは明らかになっておらず、本研究では mTOR 経路への関与に注目し、その下流に存在する p70 S6 kinase および phosphorylation of p70 S6 kinase の発現を評価したが、細胞株によっても異なる結果であった。PDIA3 の mTOR 経路への関与についてはその他分子の発現を含めたさらなる検討が必要である。HCC における PDIA3 の役割についてさらなる解明が必要であるが、PDIA3 は HCC の新規の治療標的分子となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takata Hideyuki, Hirakata Atsushi, Ueda Junji, Yokoyama Tadashi, Maruyama Hiroshi, Taniai Nobuhiko, Takano Ryotaro, Haruna Takahiro, Makino Hiroshi, Yoshida Hiroshi	4. 巻 406
2. 論文標題 Prediction of portal vein thrombosis after hepatectomy for hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langenbeck's Archives of Surgery	6. 最初と最後の頁 781 ~ 789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00423-021-02125-9	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 Kaneya Yohei, Takata Hideyuki, Wada Ryuichi, Kure Shoko, Ishino Kousuke, Kudo Mitsuhiro, Kondo Ryota, Taniai Nobuhiko, Ohashi Ryuji, Yoshida Hiroshi, Naito Zenya	4. 巻 21
2. 論文標題 Inhibitor for protein disulfide?isomerase family A member?3 enhances the antiproliferative effect of inhibitor for mechanistic target of rapamycin in liver cancer: An <i>in vitro</i> study on combination treatment with everolimus and 16F16	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12289	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 Takata Hideyuki, Hirakata Atsushi, Makino Hiroshi, Yokoyama Tadashi, Furuki Hiroyasu, Mizutani Satoshi, Katsuno Akira, Taniai Nobuhiko, Yoshida Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Two synchronous pseudoaneurysms after bile duct resection for distal cholangiocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1151 ~ 1157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-022-01711-8	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田英志
2. 発表標題 肝細胞癌に対する肝切除術後の門脈血栓の発生と臨床病理学的因子の検討
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田英志
2. 発表標題 門脈血栓症の診断と治療戦略 肝細胞癌に対する肝切除術後の門脈血栓の検討
3. 学会等名 日本門脈圧亢進症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤亮太、高田英志
2. 発表標題 Protein disulfide-isomerase A3はSTAT3シグナルを介して肝細胞癌の進展を促進する
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤亮太、高田英志
2. 発表標題 肝細胞癌におけるprotein disulfide isomerase A3の役割の検討
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田英志、平方敦史、上田純志、水谷聡、勝野暁、中田亮輔、吉岡正人、川野陽一、谷合信彦、吉田寛
2. 発表標題 肝切除術後の門脈血栓の発生に関する検討
3. 学会等名 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田英志、水谷聡、平方敦史、勝野暁、上田純志、中田亮輔、春名孝洋、谷合信彦、吉田寛
2. 発表標題 肝胆膵領域腹腔鏡下手術におけるエネルギーデバイスを用いた止血法
3. 学会等名 日本腹部救急医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田英志、平方敦史、上田純志、谷合信彦、吉田寛
2. 発表標題 肝細胞癌に対する肝切除術後の胆汁漏と門脈血栓形成の検討
3. 学会等名 日本外科感染症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田英志、平方敦史、上田純志、谷合信彦、吉田寛
2. 発表標題 肝細胞癌に対する肝切除術後の門脈血栓と凝固・線溶系因子の検討
3. 学会等名 日本門脈圧亢進症学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------