

平成 21 年 4 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790473
 研究課題名 (和文) 消化器疾患への LI-cadherin の関与とその分子機構の解明
 研究課題名 (英文) The elucidation of role and molecular mechanism of LI-cadherin in gastrointestinal disease
 研究代表者
 高村 昌昭 (TAKAMURA MASAOKI)
 新潟大学・医歯学総合病院・医員
 研究者番号：20422602

研究成果の概要：肝内胆管癌症例での LI-cadherin の臨床病理学的検討では、LI-cadherin 発現陰性例は分化度及び脈管浸潤と有意な相関を認め、独立した予後不良因子であった。培養細胞株に LI-cadherin siRNA を導入し、マイクロアレイを行った。LI-cadherin siRNA 導入株で発現上昇がみられた転写因子 MTF-1 に注目し、下流制御分子の一つ PIGF の発現上昇を確認した。以上、LI-cadherin の発現動態が肝内胆管癌において重要であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：LI-cadherin、肝内胆管癌、脈管浸潤、予後因子、siRNA、マイクロアレイ、MTF-1、PIGF

1. 研究開始当初の背景

Cadherin はカルシウム依存性の細胞間接着を担う分子として同定され、その分子的・機能的性質がおもに E-cadherin を中心に詳しく研究されてきた。その結果、cadherin の機能異常や欠損が癌をはじめとした様々な疾患に関与していることが明らかになってきた。最近、これまで知られていた E-, N-cadherin といった

classic cadherin 以外に新しい種類の cadherin が多数存在することが徐々に示されるようになり、これらの分子はいわゆる cadherin superfamily を構成していることが明らかとなってきた。この superfamily に属する LI-cadherin は classical cadherin と構造的・機能的にも異なったユニークな cadherin である。これまでに (1) 細胞外ドメインが

classic cadherin に比し長い、(2) 細胞内ドメインが約 20 アミノ酸と classic cadherin (約 150-160 アミノ酸) に比し非常に短く、さらに β -catenin の結合領域が存在しない、(3) 接着分子としての機能だけでなく腸管におけるペプチドトランスポーターとしての機能を有することが報告されており、生体内において重要な役割を担っていることが考えられる。申請者は国立がんセンター研究所にて作製した LI-cadherin を認識するモノクローナル抗体を用いて、膵癌及び大腸癌切除症例における臨床病理学的検討を行い、その発現減少および消失は腫瘍悪性度と関連することを見いだした。LI-cadherin はこれまでに主に消化器領域の癌における発現を検討した報告が散見するのみで、癌以外の疾患における LI-cadherin の発現の検討及び同分子の機能解析に関する報告はほとんどないのが現状である。

2. 研究の目的

LI-cadherin の消化器疾患における意義を見いだすことを目的とする。対象疾患は、良性疾患であるにもかかわらず致死率の高い急性膵炎と肝細胞癌に比べ診断・治療面で大きく遅れをとり予後不良な肝内胆管癌である。

3. 研究の方法

(1) 急性膵炎

ヒトの生体試料を採取することは現実的に困難であることから、ヒト急性膵炎に類似した動物モデルとしてその発症に関与する分子機構が詳細に検討されているセルレイン膵炎 (Balb/c マウス (7 週齢、雌性) にセルレイン 50 g/kg 13 回/12 時間、皮下投与) を用いる。無処置対照群は生理食塩水皮下投与とする。経時的に膵組織を採取し、RNA 及び蛋白レベルでの LI-cadherin の発現変化を検討する。

(2) 肝内胆管癌

①当院消化器外科及び関連病院の切除症例を用いて、免疫染色法で LI-cadherin の発現を検討した。並行して症例の臨床病理学的データのまとめを行い、臨床病理学的観点から検討を行った。

②3種類の肝内胆管癌培養細胞株 (IHGGK, HuCCT1, HuH-28) を用いて LI-cadherin 発現を real-time PCR 法及び Western Blot 法で検討し発現している株に対し LI-cadherin siRNA 導入を行った。さらに LI-cadherin siRNA 導入株と control 株間でマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行った。ピックアップされた候補遺伝子はその再現性を確認後、切除症例に戻り免疫染色法を行った。なお、腫瘍内微小血管密度は抗 CD34 抗体を用いた。評価方法は Weidner ら (N Engl J Med 1991;324:1-8) の報告 (弱拡大で高密度 CD34 陽性領域を 5カ所ピックアップし、強拡大でそれらの領域をカウントする) に準じて行った。

4. 研究成果

<研究の主な成果>

(1) 急性膵炎

予備実験として、薬剤未投与マウスの膵組織のホルマリン切片の免疫染色及び蛋白抽出を試みたが、抗体に起因すると思われる染色性の問題や検討可能な蛋白量が回収できなかったため、肝内胆管癌における検討を行うことに注力した。

(2) 肝内胆管癌

①肝内胆管癌切除例における

LI-cadherin の臨床病理学的解析

34 例の肝内胆管癌切除標本での

LI-cadherin の免疫組織学的解析を行った。評価方法は癌細胞全体の 10%以上の癌細胞で LI-cadherin 陽性であった場合に LI-cadherin 陽性例とした。非腫瘍部の胆管上皮細胞では LI-cadherin 発現はみられなかった。癌部では、高分化型癌では強い発現がみられ、浸潤部や中分化・低分化と脱分化するにつれてその発現が減弱あるいは消失することが判明した。

LI-cadherin 陰性例は分化度及び脈管浸潤と有意な相関を認めた ($P < 0.05$)。また LI-cadherin 陰性例は陽性例と比較して有意に予後不良であった ($P < 0.05$)。単変量解析による有意な予後不良因子は脱分化・リンパ節転移陽性・切除断端陽性・LI-cadherin 発現消失であった ($P < 0.05$)。これらの因子を用いた多変量解析において、LI-cadherin 発現消失はリンパ節転移陽性ととも独立した予後不良因子であった ($P < 0.05$)。

②肝内胆管癌培養細胞株を用いた

LI-cadherin の機能解析

3種類の肝内胆管癌培養細胞株 (IHGGK, HuCCT1, HuH-28) における LI-cadherin の発現を real-time PCR 法及び Western Blot 法で解析したところ、IHGGK のみ LI-cadherin 発現がみられた。同株に LI-cadherin に対する合成 siRNA を導入したところ、導入 48 時間後に mRNA レベルでの発現抑制が最も顕著であることを確認し、この時点で LI-cadherin siRNA 導入株と control siRNA 導入株間でマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行った。control siRNA 導入株に比し、LI-cadherin siRNA 導入株で 2 倍以上の発現上昇がみられた遺伝子は metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) や purinergic receptor P2X (P2RX7) をはじめとする 12 遺伝子、2 倍以上の発現低下がみられた遺伝子は LI-cadherin や inversin をはじめとする 9 遺伝子であった。上記の肝内胆管癌切除例における LI-cadherin の臨床病理学的解析結果 (LI-cadherin 発現消失は脱分化や脈管浸潤と相関する) をふまえ、LI-cadherin siRNA 導入株で発現上昇がみられた遺伝子 MTF-1 に注目した。MTF-1 は重金属依存性転写因子で、発生や分化に重要な遺伝子群の制御をしていることが知られている。また癌発生に対しては抑制的に作用する一方、癌の悪性化に対して促進的に作用するという 2 面性を有する。MTF-1 の下流制御遺伝子の一つに VEGF family に属する placenta growth factor (PlGF) があるため、LI-cadherin siRNA 導入株における VEGF family (VEGF-A, -B, -C, PlGF) の発現変化を real-time PCR 法で検討したところ、PlGF のみが control siRNA 導入株に比し LI-cadherin siRNA 導入株で発現が有意に上昇していた ($P < 0.05$)。肝内胆管癌切除例の免疫染色を検討したところ、LI-cadherin 発現陰性例で PlGF の発現及び腫瘍内微小血管密度が有意に上昇していることが判明した。結論として、LI-cadherin 発現消失により MTF-1 さらにその制御遺伝子である PlGF の発現が上昇し血管新生を促進することが示唆され、肝内胆管癌の腫瘍進展のメカニズムの一つとして考えられた。

<得られた成果の国内外における位置づけとインパクト>

肝内胆管癌は肝細胞癌と比べ腫瘍進展のメカニズムについては十分理解されているとは言い難く、新たな治療法を開発するためにはそのメカニズムの解明が重要である。また肝内胆管癌における LI-cadherin の発現動態及びその意義に

関しては過去に報告がない。今回の成果は肝内胆管癌の腫瘍進展のメカニズムの一つとして LI-cadherin の発現動態が重要であることが示唆され、LI-cadherin の制御が肝内胆管癌における新たな分子標的治療の候補になりうると考えられる。

<今後の展望>

肝内胆管癌も申請者が過去に報告した膵癌・大腸癌同様、LI-cadherin の発現減弱あるいは消失が癌の悪性度と相関していることが示唆された。今回マイクロアレイで候補遺伝子としてピックアップされた MTF-1 は PlGF 以外にも多くの制御遺伝子が報告されている。これらの肝内胆管癌における関連を検討していきたい。また他の候補遺伝子の中にも、肝内胆管癌の腫瘍進展のメカニズムに関与するものがあるか解析を進めていきたい。

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 8 件)

1. Yamazaki K, Takamura M, Masugi Y, Mori T, Du W, Hibi T, Hiraoka N, Ohta T, Ohki M, Hirohashi S, Sakamoto M.: Adenylate cyclase-associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility. *Laboratory Investigation*, 89, 425–432, 2009, 査読有.
2. Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Honda Y, Takamura M, Sugahara S, Ishikawa T, Ohkoshi S, Sato Y, Aoyagi Y.: Sustained response to interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells. *Hepatology Research*, 38, 664–672, 2008, 査読有.
3. Yamazaki K, Suzuki K, Ohkoshi S, Yano M, Kurita S, Aoki YH, Toba K, Takamura MA, Yamagiwa S, Matsuda Y, Aoyagi Y.:

- Temporal treatment with interferon-beta prevents hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus X gene transgenic mice. *Journal of Hepatology*, 48, 255–265, 2008, 査読有.
4. Tuboi K, Takamura M, Sato Y, Yokoyama H, Takeuchi M, Igarashi M, Kondo D, Omori K, Ogawa A, Takeyama A, Koyama Y, Ajioka Y, Aoyagi Y.: Severe acute pancreatitis as an initial manifestation of primary hyperparathyroid adenoma in a pediatric patient. *Pancreas*, 35, 100–101, 2007, 査読有.
5. Takamura M, Matsuda Y, Yamagiwa S, Tamura Y, Honda Y, Suzuki K, Ichida T, Aoyagi Y.: An inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase, SP600125, protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic failure by modulating BH3-only proteins. *Life Sciences*, 80, 1335–1344, 2007, 査読有.
6. Takamura M, Ichida T, Ohkoshi S, Tsubata S, Osaki A, Aoyagi T, Nomoto M, Uehara K, Terada H, Aoyagi Y.: Decompensated lamivudine-resistant hepatitis B virus-related cirrhosis treated successfully with adefovir dipivoxil allowing surgery for hepatocellular carcinoma. *Internal Medicine*, 46, 367–371, 2007, 査読有.
7. Honda Y, Yamagiwa S, Matsuda Y, Takamura M, Ichida T, Aoyagi Y. Altered expression of TLR homolog RP105 on monocytes hypersensitive to LPS in patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 47, 404–411, 2007, 査読有.
8. Hokari M, Matsuda Y, Wakai T, Shirai Y, Sato M, Tsuchiya A, Takamura M, Yamagiwa S, Suzuki K, Ohkoshi S, Ichida T, Kawachi H, Aoyagi Y.: Tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 potentates the anchorage-independent growth of human hepatoma HepG2 cells. *Life Sciences*, 81, 336–345, 2007, 査読有.
- [学会発表] (計 3 件)
1. 高村昌昭、Expression of liver-intestine cadherin in intrahepatic cholangiocarcinoma: Its prognostic significance and relationship with vascular invasion、The 59th annual meeting of the american association for the study of liver diseases、2008年11月3日、Moscone West Convention Center (SAN FRANCISCO).
2. 高村昌昭、肝内胆管癌における Liver-intestine (LI)-cadherin 発現動態とその意義、第 40 回 日本臨床分子形態学会、2008年10月3日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
3. 高村昌昭、肝内胆管癌における Liver-intestine (LI)-cadherin の発現の検討、第 44 回 日本肝臓学会総会、2008年6月5日、愛媛県民文化会館 (愛媛県松山市).
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
高村 昌昭 (新潟大学、医歯学総合病院、医員)
研究者番号 : 20422602
- (2) 研究分担者
無し
研究者番号 :
- (3) 連携研究者
無し
研究者番号 :