

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 27 日現在

機関番号：34519
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009 ～ 2011
 課題番号：21591738
 研究課題名（和文） 転写因子 NF-κB 抑制による大腸癌放射線感受性増強効果と非癌部腸管保護作用の検討
 研究課題名（英文） The effect of suppression of NF κB activity on the radio-sensitivity of colon cancer cells and on the prevention of intestinal damage.
 研究代表者
 吉田 康彦（YOSHIDA YASUHIKO）
 兵庫医科大学・医学部・研究生（研究員）
 研究者番号：40434948

研究成果の概要（和文）：

放射線による晩期障害では、粘膜下層の線維化亢進を認めた。この線維化予防に対する HGF、NF-κB decoy 投与の効果を検討したところ、HGF 投与群では非投与群に比べて線維化抑制が見られたが、NF-κB decoy 投与群では認められなかった。低濃度 HGF では癌細胞株の増殖能に影響はなかったが、NF-κB decoy は大腸癌細胞株の増殖能抑制効果を認めた。また、低濃度 HGF 及び NF-κB 投与による癌細胞における EMT 関連分子発現変化について調べたが、明らかな関与は見当たらなかった。

研究成果の概要（英文）：

In a mouse model of radiation induced-chronic intestinal injury, fibrogenesis was seen in the submucosal layer. We investigated the effect of HGF administration and NF-κB decoy transfection on fibrogenesis of intestinal wall in a mouse model. HGF administration, but not NF-κB decoy transfection, inhibited the fibrogenesis in the intestinal wall. Next, we investigated the effect of low-dose HGF administration and NF-κB decoy transfection on proliferation ability of a cell line of human colon cancer. NF-κB decoy transfection, but not low-dose HGF administration, inhibited proliferation of cancer cells. Last, we investigated the relationship between NF-κB and EMT in cancer cells. Unfortunately, NF-κB transfection did not change the gene expression of EMT related molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、消化器外科学

キーワード：(1)放射線感受性 (2) 肝細胞増殖因子 (3) おとり型核酸 (4) 放射線障害

1. 研究開始当初の背景

大腸癌特に直腸癌に対する放射線療法は分子標的治療薬をはじめとする新規抗癌

性腫瘍剤の開発が進むにつれて併用される機会も多く、欧米では様々な臨床試験がなされている。術前術後の放射線化学療法は腫瘍

の制御のみならず、肛門機能の温存に寄与している。しかし、放射線治療には大きな二つの課題があり、それは(1)放射線障害および(2)放射線感受性である。(1)に関しては一定の放射線量を超えると放射線腸炎を合併し、急性期では粘膜傷害に伴う出血、下痢、吸収不良を認め、晩期では、消化管線維化に伴う狭窄、穿孔、難治性ろう孔など重篤な合併症をおこし治療に難渋する。(2)に関しては直腸癌の放射線感受性は比較的良好であるがCRとなるのは全体の20%以下である。中には感受性が悪く効果のないものもある。この相反する二つの問題を解決すべく、様々なサイトカインの転写因子であるNF- κ Bの活性を抑制するおとり型核酸であるNF- κ B decoyと組織修復因子である肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor: HGF)をHVJ法により導入し、これらの大腸癌治療における腸管障害保護作用、感受性増強作用について検討した。

2. 研究の目的

NF- κ Bの活性を抑制するおとり型核酸であるNF- κ B decoyと組織修復因子であるHGFをHVJ法により導入し、これらの大腸癌治療における腸管障害保護作用、感受性増強作用への関与を調べる。

3. 研究の方法

(1)放射線性腸炎モデルにおける組織学的検討:急性期障害組織と慢性期障害組織をHE染色によって評価。アポトーシスはTUNEL染色で、線維化はSirius red染色で評価し、その他CTGF TGF- β の免疫染色を行った。

(2)放射線性腸炎モデルにHVJ法を用いてHGFおよびNF- κ B decoyを遺伝子導入し、線維化はSirius red染色で評価した。

(3)大腸癌細胞株HCT119細胞におけるHGF投与、NF- κ B decoy transfectionの効果:大腸がん細胞株HCT119細胞を5%FCS含んだRPMI培養液で培養。培養24時間後にHGF投与、NF- κ B decoy transfectionを行い、72時間後に増殖能の評価をAlamer Blueにて評価した。

(4)大腸癌細胞株のEMT関連遺伝子発現とHGFおよびNF- κ Bの関係について:癌細胞のEMT(epithelial-mesenchymal transition)関連遺伝子としてSnail, S100A, uPAR, PAI-1, TPAが報告されている。HGF投与、NF- κ B decoy transfectionが大腸癌細胞のEMT関連遺伝子の変動に関与しているかRT-PCRにて調べた。

(5)大腸癌細胞株腹腔内投与モデルの作成:腹腔内に大腸癌細胞株を投与し、腹腔内大腸癌モデルを作成する。また、放射線線量による腫瘍効果、腸炎の程度との関係を調べた。

4. 研究成果

(1)放射線による急性期障害では、マウス腸管のcryptに存在する細胞のアポトーシスを多く認め、また、放射線の晩期障害では、急性期に認められた粘膜下層の炎症細胞浸潤は軽減し、粘膜下層の線維化が充進していた。また、CTGF, TGF- β の発現を認めた。

(2)この放射線による晩期障害の一つである線維化予防に対して、HGFまたは、NF- κ B decoy投与に効果があるか検討した。Sirius染色による検討では、HGF投与群では非投与群に比べて放射線による腸管線維化の改善傾向が見られたが、NF- κ B decoy投与群は非投与群に比べ障害の程度に変化は認められなかった。

(1)(2)より、放射線によって起こる腸管の線維化抑制にHGFが有効である可能性が考えられた。

(3)次にHGFが、大腸癌細胞の増殖に及ぼす影響をIn Vitroの実験で行った。使用した大腸癌細胞株はHCT119で、低濃度HGFでは癌細胞株の増殖に影響はなかったが、高濃度では増殖が促進される傾向にあった。NF- κ B decoyのtransfectionは大腸癌細胞株の増殖能抑制効果を認め、NF- κ Bのがん増殖にかかわっている可能性が認められた。

(4)HGF投与及びNF- κ B decoyのtransfectionが癌細胞におけるEMT(Epithelial-mesenchymal transition)に深くかかわっているか、EMT関連分子(E-cadherin, Snail, S100A, uPAR, PAI-1, TPA)遺伝子発現との関連について調べたが、明らかな関与は見当たらなかった。

(5)腹腔内大腸癌モデルを作成できなかった。マトリゲル、コラーゲンゲルなども使用したが無理であった。今後、細胞株を変えて行う予定である。

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 6件)

1. Uyama N, Imuro Y, Kawada N, Reynaert H, Suzumura K, Hirano T, Kuroda N, Fujimoto J. Fascin, a novel

- marker of human hepatic stellate cells, may regulate their proliferation, migration, and collagen gene expression through the FAK-PI3K-Akt pathway. Laboratory Investigation、査読有、92 (1) 2012、57-71、DOI: 10.1038/labinvest.2011.150.
2. Hoshikawa Y, Kanki K, Ashla AA, Arakaki Y, Azumi J, Yasui T, Tezuka Y, Matsumi Y, Tsuchiya H, Kurimasa A, Hisatome I, Hirano T, Fujimoto J, Kagechika H, Shomori K, Ito H, Shiota G. c-Jun N-terminal kinase activation by oxidative stress suppresses retinoid signaling through proteasomal degradation of retinoic acid receptor α protein in hepatic cells. Cancer Science、査読有、102 (5)、2011、934-941、DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01889.x.
 3. Seki E, Park E, Fujimoto J. Toll-like receptor signaling in liver regeneration, fibrosis and carcinogenesis. Hepatology Research、査読有、41(7)、2011、597-610、DOI:10.1111/j.1872-034X.2011.00822.x.
 4. Iimuro Y, Kashiwagi T, Yamanaka J, Hirano T, Saito S, Sugimoto T, Watanabe S, Kuroda N, Okada T, Asano Y, Uyama N, Fujimoto J. Preoperative estimation of asialoglycoprotein receptor expression in the remnant liver from CT/99mTc-GSA SPECT fusion images correlates well with postoperative liver function parameters. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 査読有、2010 Sep;17(5):673-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703846>
 5. Tsutsui H, Imamura M, Fujimoto J, Nakanishi K. The TLR4/TRIF-Mediated Activation of NLRP3 Inflammasome Underlies Endotoxin-Induced Liver Injury in Mice. Gastroenterol Res Pract. 査読有、2010:641865. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20634907>
 6. Ishikawa T, Nakai N, Liu NN, Shiba K, Isozaki K, Matsuda I, Ito T, Fujimoto J, Hatakeyama K, Kanda T, Hirota S. In vivo effect of imatinib on progression of cecal GIST-like tumors in exon 17-type c-kit knock-in mice. Lab Invest. 査読有、2009 Oct;89(10):1161
- 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19636292>
- [学会発表] (計 22 件)
1. Uyama N, Iimuro Y, Kuroda N, Hirano T, Okada T, Asano Y, Suzumura K, Fujimoto J. A novel small molecule inhibitor of FAK inhibits the ability of proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cell lines in vitro. International Surgical Week 2011、2011.8.28、Yokohama .
 2. 宇山直樹, 飯室勇二, 近藤祐一, 鈴木和夫, 吉田康彦, 佐竹真, 麻野泰包, 岡田敏弘, 平野公通, 黒田暢一, 藤元治朗. 肝内胆管癌組織におけるFAKの発現とその役割. 第47回日本肝臓学会総会、2011.6.4、東京
 3. 飯室勇二, 近藤祐一, 宇多優吾, 鈴木和夫, 吉田康彦, 宇山直樹, 麻野泰包, 岡田敏弘, 平野公通, 田中弘教, 飯島尋子, 西口修平, 藤元治朗. 肝臓外科切除における最終確認診断としての術中造影エコーの有用性. 第47回日本肝臓学会総会 2011.6.3 東京
 4. Fujimoto J, Iimuro Y, Yada A, Kondo Y, Saito S, Sueoka H, Ohashi K. Impact of preoperative 3D hepatectomy simulation system for liver resection and transplantation: Application to various kind of liver resection procedure. 46th Annual Congress of the European Society for Surgical Research、2011.5.25、Aachen
 5. Uyama N, Iimuro Y, Kawada N, Reynaert H, Suzumura K, Satake M, Okada T, Hirano T, Kuroda N, Fujimoto J. Fascin, an actin bundling protein, can be a novel marker of human hepatic stellate cells and may regulate functions of HSCs through FAK-PI3K-AKT pathway. Digestive Disease Week 2011、2011.5.7 Chicago
 6. Iimuro Y, Okada T, Yada A, Kondo Y, Suzumura K, Yoshida Y, Uyama N, Fujimoto J. Analysis of unique liver regeneration in patients with giant liver cysts after fenestration of cysts without liver resection. The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2010.10.30 Boston
 7. 宇山直樹, 飯室勇二, 中井紀博, 近藤祐一, 鈴木和夫, 佐竹真, 吉田康彦, 杉本貴昭, 麻野泰包, 齊藤慎一, 王孔志, 岡田敏弘, 平野公通, 黒田暢一, 山中潤

- 一, 藤元治朗. 肝細胞癌内線維化領域に存在する線維芽細胞の免疫組織学的検討. 第14回日本肝臓学会大会 2010.10.14 横浜
8. 平野公通, 山中潤一, 麻野泰包, 飯室勇二, 黒田暢一, 岡田敏弘, 斉藤慎一, 杉本貴昭, 宇山直樹, 藤元治朗. 2年以上生存リンパ節転移陽性肝内胆管癌 (ICC) 切除症例の検討. 第110回日本外科学会定期学術集会 2010.4.10 名古屋
9. Iimuro Y, Uyama N, Sugimoto T, Saito S, Hirano T, Yamanaka J, Fujimoto J. Application of computational portal flow dynamics simulation to liver regeneration analysis. The 43rd World Congress of the International Society of Surgery 2009.9.7 Adelaide
10. Uyama N, Kuroda N, Ohashi K, Sugimoto T, Kondo Y, Suzumura K, Yoshida Y, Satake M, Asano Y, Saito S, Oh K, Okada T, Hirano T, Yamanaka J, Iimuro Y, Fujimoto J. Heat shock protein 47 regulates expression of Collagen V and TIMP2 in pancreatic cancer cells. Digestive Disease Week and the 110th Annual Meeting of the AGA Institute 2009.5.31 Chicago
11. 藤元治朗. 肝細胞癌に対する分子治療の基礎的検討. (ワークショップ) 第109回日本外科学会定期学術集会 2009.4.2 福岡
12. 飯室勇二, 宇山直樹, 斉藤慎一, 麻野泰包, 黒田暢一, 山中潤一, 藤元治朗. 肝再生制御因子としての肝内門脈血流動態の解析と肝内メカニカルストレス受容体の検索. 第109回日本外科学会定期学術集会 2009.4.2 福岡
13. 平野公通, 山中潤一, 飯室勇二, 黒田暢一, 岡田敏弘, 斉藤慎一, 杉本貴昭, 麻野泰包, 吉田康彦, 鈴木和夫, 藤元治朗. 肝細胞癌に対する遺伝子治療—臨床応用に向けての問題点. 第109回日本外科学会定期学術集会 2009.4.1 福岡

[図書] (計 3件)

1. 大橋浩一郎, 藤元治朗. 肝胆膵の画像診断. 渡邊昌彦, 國土典宏, 土岐祐一郎 監修. 消化器外科学レビュー2011—最新主要文献と解説—. 第1版. 東京:総合医学社, 2011:239-44.
2. 飯室勇二. 総胆管輪状狭窄症. 井廻道夫編. 肝・胆道系症候群—その他の肝・胆道系疾患を含めて— III肝外胆道編. 第2版. 大阪:日本臨牀社, 2011:180-3.
3. 岡田敏弘, 藤元治朗. 腹腔鏡検査. 松田暉, 荻原俊男, 難波光義, 鈴木久美, 林直

子 編. 疾病と検査. 東京:南江堂, 2010:220-1.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 康彦 (YOSHIDA YASUHIKO)
兵庫医科大学・医学部・研究生 (研究員)
研究者番号: 40434948
(H22→H23)

王 孔志 (OH KOSHI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80340967
(H21→H22: H23. 1. 25 交替)

(2) 研究分担者

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90199373

飯室 勇二 (IIMURO YUJI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30252018

平野 公通 (HIRANO TADAMICHI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90340968

岡田 敏弘 (OKADA TOSHIHIRO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70351799

宇山 直樹 (UYAMA NAOKI)
兵庫医科大学・医学部・研究生 (研究員)
研究者番号: 70402873

(3) 連携研究者

()

研究者番号: