

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590423

研究課題名(和文) Heregulinを介した大腸癌肝転移のメカニズムの解明とその治療法の研究

研究課題名(英文) A study to explore the mechanism of hepatic metastasis of colon cancer through Heregulin

研究代表者

吉岡 年明 (Yoshioka, Toshiaki)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：80302264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌肝転移の際に、肝細胞がHeregulin(HRG)を産生する機序を解明する目的で検討した。免疫組織学的にヒトの肝転移手術検体の88.7%で、転移巣周囲の直接傷害された肝細胞ではなく、その周囲の肝細胞で、腫瘍の遠位よりは近位でHRG産生が認められた。ジメチルニトロソアミンによる肝傷害モデルでは、投与後1日目からHRGのmRNA量が増加し、傷害された肝小葉中心域ではなく、その周囲のグリソン領域に免疫染色され、ヒト検体と同様の結果を示した。部分肝切除でも残存肝細胞にHRGの発現がみられた。以上から、HRGは肝臓の傷害から再生の際に残存肝細胞で発現する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated a mechanism why hepatocytes express Heregulin(HRG) in the situation of hepatic metastasis of colorectal cancer. Immunohistochemical(IHC) examination on human specimen of hepatic metastasis revealed that HRG was expressed in hepatocytes at 88.7%. The expression was evident in hepatocytes which were close to the metastatic tumor but not in those which were contact to the tumor with being injured nor in far region. Dimethylnitrosoamine(DMN) caused significantly increased expression of HRG mRNA in rat hepatocytes from day 1 compared with that of the control. IHC examination revealed that HRG expression in hepatocytes started from day 1 around the area of Glisson's capsule but not in the area of central zone of hepatic lobules where were injured by DMN. Partial hepatectomy also revealed that hepatocytes in the residual liver expressed HRG. These results suggest that HRG expression is appeared in the residual hepatocytes in the stage of injury and regeneration of the liver.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肝転移 大腸癌 Heregulin 肝細胞

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは肝転移形成のメカニズムを検討するため、ヒト大腸癌細胞LS174Tを用いて、重症免疫不全(SCID)マウスでの肝転移を繰り返して、高肝転移ヒト大腸癌細胞LS-LMシリーズを樹立し、大腸癌が発現する癌胎児性抗原(CEA)どうしの同種結合が、肝転移形成に重要であることを報告した (Yoshioka et al. *Jpn J Cancer Res* 1998). 我々はさらに、高肝転移ヒト大腸癌細胞LS-LM6が、自身が発現するインテグリン $\alpha$ V $\beta$ 5と受容体型チロシンキナーゼのErbB3とErbB2によるヘテロダイマーとの共同作業により、肝細胞が産生するVitronectin(VN)上での遊走能を増強させて肝転移能を上昇させていること、そしてこの共同作業には、肝細胞が産生する、細胞増殖因子のHeregulin (HRG)により、ErbB3がリン酸化されることが必要であり、肝細胞が産生するHRGが肝転移形成に重要な役割を果たしていることを報告した (Yoshioka et al. *Cancer Sci* 2010). 実際にLS-LM6細胞において、HRGによって活性化され、共同作業を行なうErbB3とインテグリン $\alpha$ VをsiRNAを用いて発現を低下させたところ、VN上での遊走能が抑制され、さらに肝転移形成能が有意に抑制された (Yoshioka et al. *Cancer Sci* 2010). 我々はマウスの肝転移モデルから得られたこの結果が、ヒトでも同様に行われていると予想し、大腸癌肝転移において、肝細胞がHRGを産生するメカニズムを解明するため、本研究を始めるに至った。

## 2. 研究の目的

大腸癌において重要な予後因子である肝転移のメカニズムの解明は、その治療法を探る上で非常に重要である。大腸癌の肝転移に関わる様々な分子が報告されているが、大腸癌と転移先の肝臓の主な構成細胞である、肝細胞との相互作用という面から、転移のメカニズムを解明した報告は少ない。本研究では、我々が初めて報告した、肝転移の際、肝細胞が産生する増殖因子であるHeregulin (HRG)に着目して、大腸癌細胞の影響により肝細胞がHRGを産生し、それを大腸癌が利用して転移が形成されると予想し、その仮説のもと、大腸癌肝転移において、肝細胞がHRGを産生するメカニズムを解明する。また、HRGのレセプターであり、大腸癌が発現するErbB3と、これとヘテロダイマーを形成するErbB2を介した分子標的療法による肝転移の治療の可能性を検討する。さらに、高肝転移ヒト大腸癌細胞LS-LM6の性状を探索し、高肝転移細胞に対する新たな標的療法の可能性を検討す

る。

## 3. 研究の方法

目的を達成するために以下の方法で検討した。

(1) ヒト大腸癌肝転移手術検体を用いた免疫組織化学的検討。

我々は、マウスの実験肝転移のみならず、ヒト大腸癌肝転移においても、転移巣周囲の肝細胞がHRGを産生すると予想し、当院で肝転移切除された手術検体53症例を用いて、抗HRG抗体を使用して免疫組織化学的にHRGの発現を検討した。さらに、転移巣から近位(2 cm以内)とそれより遠位に分けて、肝細胞のHRG産生が腫瘍の近くに限局される可能性を検討した。ヒト手術標本を用いた検討は、当大学医学部倫理委員会承認されている。

(2) ジメチルニトロソアミン(DMN)による肝傷害時における肝細胞からのHRG産生の検討。

肝細胞がHRGを産生するメカニズムに関しては、a) 肝転移形成により傷害された肝細胞から産生される、b) 傷害後の肝再生のために、残存する肝細胞から産生される、などが予想され、その点を検討するため、実験的肝傷害モデルを用いて検討を進めた。ジメチルニトロソアミン(DMN)をラットに30 mg/kg投与して肝傷害を引き起こし、投与後1日目、2日目、4日目、6日目に犠牲死させて肝臓を摘出し、肝細胞におけるHRG産生を検討した。採取した肝細胞からRNAを抽出して定量性RT-PCRにて、また抗HRG抗体による免疫組織染色にて、経時的な発現の変化を検討した。さらにその際のErbBレセプターの発現の変化を、定量性RT-PCRにて検討した。

(3) 部分肝切除時の残存肝の肝細胞におけるHRG産生の検討。

上述の(2)で、傷害後の肝再生のために、残存する肝細胞から産生される可能性も考えられたので、その検討のため、ラット部分肝切除モデルを用いて、部分肝切除後、1日目、2日目、3日目、4日目、7日目に犠牲死させて肝臓を摘出し、残肝でのHRGの産生を検討した。肝細胞からRNAを抽出し、定量性RT-PCRにて、また免疫組織染色にて、経時的な発現の変化を検討した。さらにその際のErbBレセプターの発現の変化を、定量性RT-PCRにて検討した。

(4) HRGレセプター(ErbB3)も含めた、ErbBファミリーに対する分子標的療法の検討。

ErbB2を発現する大腸癌が肝転移しやす

いことは、ヒト大腸癌手術検体による臨床病理学的な検索からも報告されており (Ishida et al. *Oncol Rep*; 2000), またErbB3とErbB2のヘテロダイマーは、HRGによる刺激を、下流にあり遊走やアポトーシスなどに関与する phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)に伝えることから、ErbB3やErbB2に対する分子標的療法は大腸癌肝転移の抑制効果があると予想される。我々はそれらの可能性に関して検討を進めた。

(5) 高肝転移細胞における新たな性質の検索とそれに対する分子標的療法の検討。

高肝転移ヒト大腸癌細胞LS-LM6の持つ特徴を探索することにより、それに対する治療が、肝転移した細胞に対する治療となりうる可能性がある。我々は高肝転移細胞と親株のヒト大腸癌細胞LS174Tにおける違いを検討し、特徴的な分子に対しては、標的療法の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌肝転移の際の、肝転移巣周囲の肝細胞におけるHeregulin(HRG)産生の検討。

ヒトでのHRG産生を確認するため、当院で肝転移切除された手術検体(53症例)を、抗HRG抗体で免疫組織的に検討したところ、47例(88.7%)に肝細胞でのHRGの産生を確認した(Table 1)。その発現は、転移巣周囲の直接傷害された肝細胞ではなく、その周囲の肝細胞にHRGの発現を確認した(Figure 1)。

Table 1. ヒト肝転移切除検体における転移巣周囲の肝細胞でのHRG産生の割合

HRG	Cases (53 in total)	Percentage
Positive	47	88.7 %
Negative	6	11.3 %

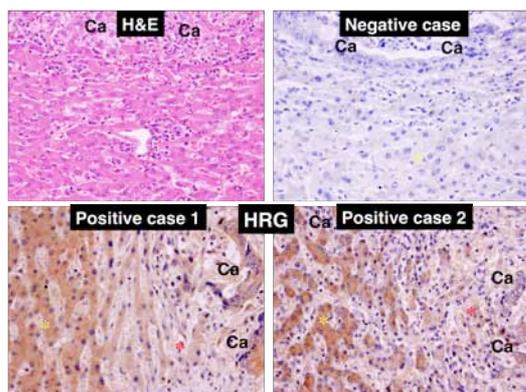


Figure 1. ヒト大腸癌肝転移巣周囲の肝細胞のHRG産生(免疫組織化学染色)。HRGは大

腸癌肝転移巣(Ca)に接する直接傷害された肝細胞(赤色星印)ではなく、その周囲の肝細胞(黄色星印)に発現が認められた(下段 Positive case 1と2)。

また、53症例のうちの20症例で、肝転移腫瘍から2 cm以内(近位)と、それより離れた(遠位)肝細胞のHRG産生を比較したところ、70%(14例)に、近位の肝細胞での発現の増加を認めた(Table 2, Figure 2)。このことから、HRGは傷害された肝細胞から産生されるのではなく、その周囲の肝細胞から産生されるが、その産生細胞は、転移巣周囲の比較的限局された範囲に留まっていると考えられた。

Table 2. 肝転移巣近位および遠位における肝細胞におけるHRG発現の違い(20症例)。

Difference of HRG expression	Intensity of HRG-staining		Cases
	Closed side (within 2 cm)	Far side (over 2 cm)	
Significant	Strong	Weak	14 (70 %)
Smaller	Moderate	Weak	4 (20 %)
Little	Moderate	Moderate	2 (10 %)

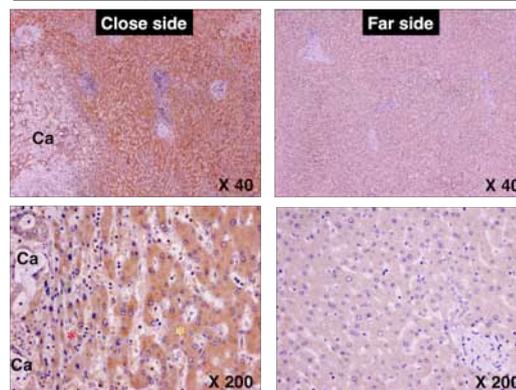


Figure 2. 肝転移腫瘍から近位と遠位における肝細胞のHRGの発現。肝転移腫瘍から2 cm以内の肝細胞(Close side)ではHRGを高度に発現していたが、それより以遠の肝細胞(Far side)では発現が低下していた。Figure 1と同様に、HRGは大腸癌肝転移巣(Ca)に接する直接傷害された肝細胞(赤色星印)ではなく、その周囲の肝細胞(黄色星印)に発現が認められた。

(2) ジメチルニトロソアミン(DMN)による肝傷害時における肝細胞からのHRG産生の検討。

上述の結果から、肝細胞が傷害を受けることにより、周囲の肝細胞にHRG産生が導かれる可能性が示唆されたため、実験的肝傷害モデルを用いて検討を進めた。ラットにジメチルニトロソアミン(DMN)を30 mg/kg投与して肝傷害を引き起こし、経時的に犠牲死させて肝細胞でのHRG産生を検討した(Figure 3A)。DMN投与後2日目で、

肝細胞逸脱酵素であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)やアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)は血中で200 U/Lを越えて、生化学的にも肝傷害が確認できた(Figure 3B).

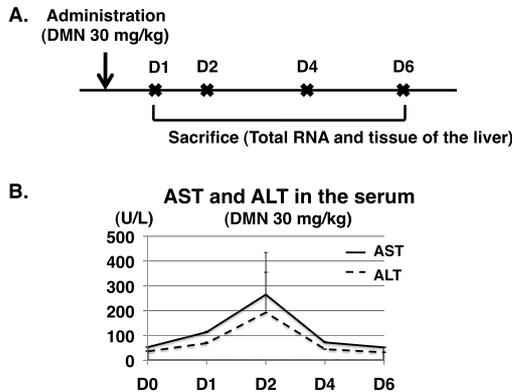


Figure 3. DMN投与による肝傷害の誘導と経時的変化 A. DMN(30 mg/kg)投与後、1日目(D1), 2日目(D2), 4日目(D4), 6日目(D6)に犠牲死させて、肝細胞におけるHRG産生を、肝細胞からRNAを抽出して定量性RT-PCRにて、また免疫組織染色にて検討した. B. DMN投与後のラット血中AST, ALTを生化学的に検討した.

その条件で、肝細胞からRNAを取り出して、定量性RT-PCRによりHRG mRNA量を計測したところ、投与後1日目でHRGの量はコントロールの25倍に達して、以後6日目まで5倍以上を維持し有意な発現上昇が認められた(Figure 4). 以上により、DMN投与により、肝細胞では速やかにmRNAの発現上昇を来すことが示された.

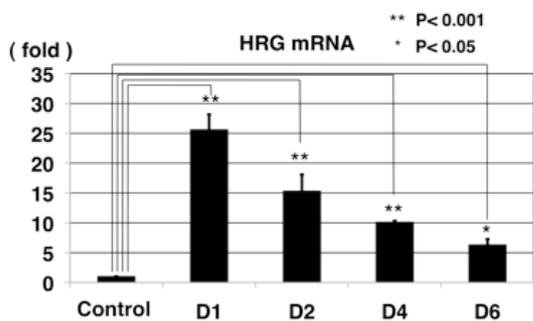


Figure 4. DMN投与後の肝細胞におけるHRG発現の経時的変化 DMN投与後、ラットの肝臓におけるHRG mRNAは、D1に約25倍と最も上昇し、D6まで有意に発現の上昇が続いた.

次にその際のHRGの発現上昇の局在を検討するため、免疫組織化学的にHRGの産生を検討したところ、DMNにより傷害を受けた肝小葉中心域(中心静脈周囲)の肝

細胞ではなく、その周囲の門脈域の肝細胞にHRG産生を確認した(Figure 5). 以上から、ヒト肝転移手術症例と同様に、DMNによる肝傷害においても、直接傷害を受けた肝細胞ではなく、その周囲の肝細胞からHRGが発現することが確認された.

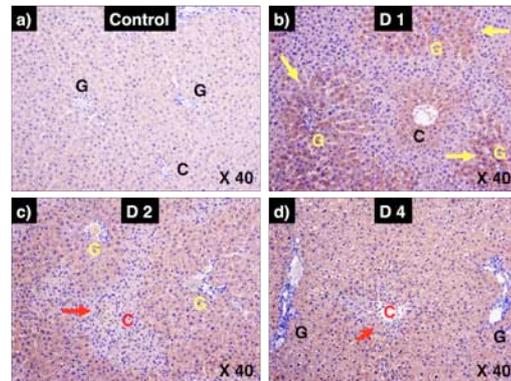


Figure 5. DMN投与後の肝臓におけるHRG発現の局在の経時的変化 DMN投与後D1において、HRGの発現は傷害された小葉中心域(C)ではなく、グリソン領域(G)において確認され、時間が経過するに従い、次第に肝臓全体に広がっていった.

HRGのレセプターであるErbB3も含めたErbBファミリーの発現の変化を、定量性RT-PCRを用いて肝細胞中のmRNAの変化で検討したところ、ErbB2においてD1からD6まで有意な発現の増加を認めた(Figure 6). レセプターであるErbB3の増加はみられなかったが、ErbB2はErbB3とヘテロダイマーを形成してシグナルを伝達することから、HRGの増加を効果的に利用している可能性が考えられた.

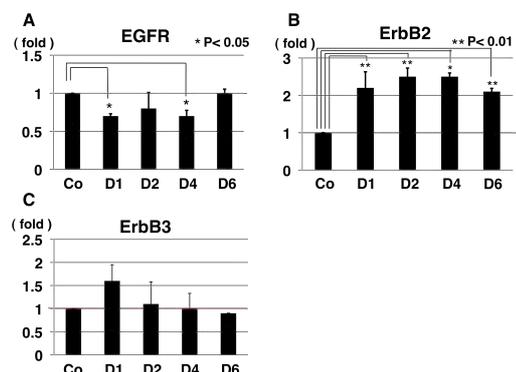


Figure 6. DMN投与後の肝細胞におけるErbBレセプターの発現の変化. A. EGFR, B. ErbB2, C. ErbB3のmRNAの発現の経時的変化

(3) 肝部分切除時の残存肝の肝細胞におけるHRG産生の検討.

我々は、HRG産生が肝傷害後の肝再生に関与している可能性が考えられたので、ラ

ット部分肝切除モデルを用いて、切除後経時的に犠牲死させて肝臓を摘出し、残肝でのHRGの産生を検討した(Figure 7A). 肝細胞からRNAを抽出し、定量性RT-PCRにてHRGのmRNA量を検討したところ、第2日目(D2)をピークに第1日目(D1)から第4日目(D4)まで有意な上昇を認め、部分肝切除後の肝再生時にも、HRGのmRNAの発現が上昇することを確認した(Figure 7B). また、免疫組織学的に残肝でのHRGの発現を検討したところ、第1日目(D1)から第3日目(D3)までHRG陽性の肝細胞が非局在性に残肝全体に増加した(Figure 8).

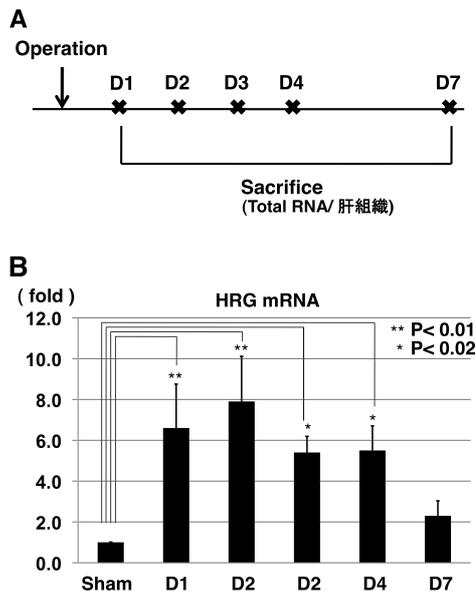


Figure 7. 部分肝切除時のHRGの発現の経時的变化 A. 部分肝切除後、第1日目(D1)から第7日目(D7)まで犠牲死させて検討した. B. 第2日目(D2)をピークに、第1日目(D1)から第4日目(D4)まで、肝細胞中のHRG mRNAの有意な増加を認めた.

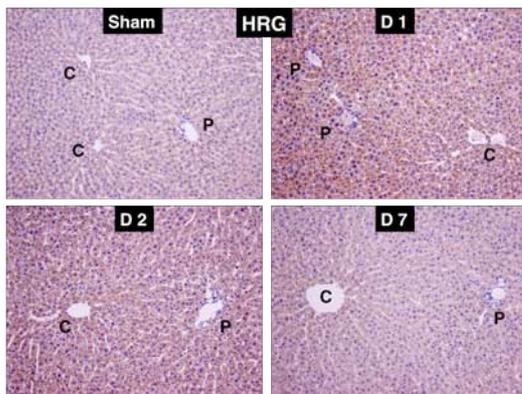


Figure 8. 部分肝切除時のHRG発現の経時的变化(免疫組織化学的) 第1日目(D1)から第3日目(D3)までHRG陽性の肝細胞が残肝全体に増加した.

以上から、部分肝切除における肝再生時にも、HRGが関与している可能性が示された。またその際におけるErbBレセプターのmRNAの発現量は、有意差は認められなかったものの、DMN投与時と同様に、ErbB2の発現が最高で8倍程度増加していた(Figure 9). これらの結果から、HRGが、肝細胞の傷害から再生に関しての経過の中で、ErbB2の発現増加とも関連しながら、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

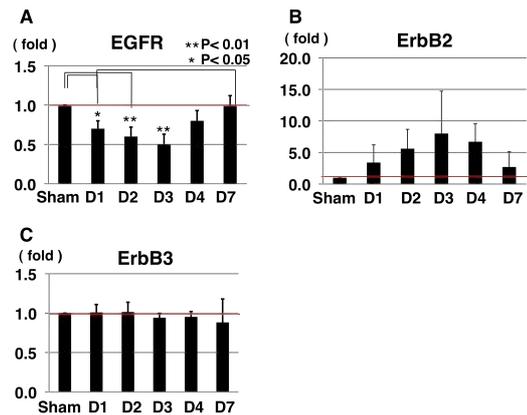


Figure 9. 部分肝切除後の肝細胞におけるErbBレセプターの発現の変化 A. EGFR, B. ErbB2, C. ErbB3のmRNAの発現の経時的变化.

(4) 新規ErbB3抗体による分子標的療法を視野に入れた検討.

我々は、共同研究者が作製した新規ErbB3抗体に検討を加え、新規抗体は大腸癌細胞のHRGによるErbB3のリン酸化を阻害すること、ヒト組織中の大腸癌細胞を認識することを確認し、新規ErbB3抗体が分子標的薬となりうる可能性を示し報告した(Okita et al. 2013). 今後新規ErbB3抗体が腫瘍細胞に与える影響などを詳細に調べ、分子標的薬となりうるのかの検討を進めていきたい.

(5) 高肝転移細胞における新たな性質の検索とそれに対する分子標的療法の検討.

我々は共同研究者とともに、樹立した高肝転移ヒト大腸癌細胞の新たな性質として、小胞体ストレス応答に関与する、分子シャペロンのGRP78を高発現することを確認した.そして、内因性血管新生阻害効果を示すIsthiminが、癌細胞表面のGRP78に結合してミトコンドリアの機能不全を引き起こし、アポトーシスを導くことを確認し報告した(Chen et al. 2014). GRP78は癌細胞、特に転移性癌細胞などの高悪性度の細胞に高発現する傾向を示すことから、高肝転移細胞に対する、IsthiminによるGRP78を介

した分子標的療法の可能性を示した。

#### 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) Chen, M., Zhang, Y., Yu, VC., Chong, YS., Yoshioka, T., Ge, R. (2014) Isthmin targets cell-surface GRP78 and triggers apoptosis via induction of mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ.* 21:797-810
- 2) Yoshioka, T., Otero, J., Chen, Y., Kim, YM., Koutcher, JA., Satagopan, J., Reuter, V., Carver, B., de Stanchina, E., Enomoto, K., Greenberg, NM., Scardino, PT., Scher, HI., Sawyers, CL., Giacotti, FG. (2013)  $\beta$ 4 integrin signaling induces expansion of prostate tumor progenitors. *J. Clin. Invest.* 123: 682-699.
- 3) Nishikawa, Y., Sone, M., Nagahama, Y., Kumagai, E., Doi, Y., Omori, Y., Yoshioka, T., Tokairin, T., Yoshida, M., Yamamoto, Y., Ito, A., Sugiyama, T., Enomoto, K. (2013) Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes bile ductular transdifferentiation of mature rat hepatocytes in vitro. *J. Cell. Biochem.* 114: 831-843.
- 4) Sone M, Nishikawa Y, Nagahama Y, Kumagai E, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, Yoshida M, Sugiyama T, Enomoto K. Recovery of mature hepatocytic phenotype following bile ductular transdifferentiation of rat hepatocytes in vitro. (2012) *Am J Pathol.* 181, 2094-104
- 5) Kawasaki Y, Omori Y, Li Q, Nishikawa Y, Yoshioka T, Yoshida M, Ishikawa K and Enomoto K. Cytoplasmic accumulation of connexin32 expands cancer stem cell population in human HuH7 hepatoma cells by enhancing its self-renewal. (2011) *Int. J. Cancer* 128: 51-62  
[他 3 件]

[学会発表] (計 12 件)

- 1) Okita, K., Ueda, S., Tokiwa, R., Yagi, H., Inoue, M., Yoshioka, T., Masuko, T. Reactivity with human cancers and anti-tumor effect of novel anti-HER3 rat monoclonal antibodies. (2013) 第72回 日本癌学会学術総会
- 2) Yoshioka, T., Nishikawa, Y., Yamamoto, Y., Omori, Y., Nanjo, H., Enomoto, K. Study of expression of heregulin in the human liver metastasis. (2012) 第71回日本癌学会総会

- 3) 吉岡年明, 西川祐司, 山本洋平, 大森泰文, 南條 博, 榎本克彦. ラット傷害肝および部分肝切除における肝細胞での heregulin発現の検討 (2012) 第101回日本病理学会総会
- 4) Yoshioka T, Nishikawa Y, Yamamoto Y, Omori Y, Nanjo Y, Enomoto K. Study on heregulin expression of the hepatocysts in liver metastasis and liver injury. (2011) 第71回日本癌学会総会
- 5) 吉岡年明, 西川祐司, 山本洋平, 大森泰文, 南條博, 榎本克彦. 肝転移巣周辺部および傷害肝における肝細胞での heregulin発現の検討. (2011) 第100回日本病理学会総会  
[他 7 件]

[図書] (計 2 件)

- 1) Yoshioka T, Otero J and Giacotti FG. Beta4 Integrin induces expansion of prostate tumor progenitors, “Beyond the Abstract” (2013) *URO TODAY*
- 2) Omori, Y., Kawasaki, Y., Li, Q., Yoshioka, T., Yamamoto, Y. and Enomoto, K. Cytoplasmic connexin32 and self-renewal of cancer stem cells: Implication in metastasis. (2012) In “Hepatocellular Carcinoma – Basic Research”. (ed) Lau W-Y, pp235-252, InTech, Rijeka.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bvouril/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉岡 年明 (YOSHIOKA TOSHIKI)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号：80302264

##### (2) 研究分担者

大森 泰文 (OMORI YASUFUMI)  
秋田大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90323138  
山本 洋平 (YAMAMOTO YOHEI)  
秋田大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：70400512  
榎本 克彦 (ENOMOTO KATSUHIKO)  
秋田大学・大学院医学系研究科・教授  
(2011-2012)  
研究者番号：20151988