

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791549

研究課題名(和文)肝内胆管癌における癌関連線維芽細胞(CAF)の分離・機能解析と治療標的の検索

研究課題名(英文)The isolation and characterization of cancer associated fibroblasts for clinical the rapeutic application.

研究代表者

岡部 弘尚(OKABE, Hirohisa)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：40573621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：今研究の目的は癌関連線維芽細胞(CAF)をヒト胆管癌組織より分離し、同時に正常肝組織からNormal fibroblast(NF)を分離し、それらの特性を比較することで、CAFに特異的な治療標的を見つけることであった。胆管癌組織が非常に消化が難しいこと、症例数に制限があることから、マウスを用いて、正常肝および線維肝からのMyofibroblastの分離プロトコールの作成を行った。Liver perfusionを行い、消化酵素の濃度・種類の検証を行い、分離培養に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to isolate cancer-associated fibroblasts (CAFs) and characterize them in cholangiocarcinoma. In addition, we aimed to isolate normal fibroblasts to find the difference from CAFs considering therapeutic application. Since the tissue of human cholangiocarcinoma was quite difficult to digest and the number of patients was limited, we decided to get myofibroblasts from chronic inflammatory liver and normal fibroblasts from normal liver using mouse model. We performed liver perfusion and optimized the digestion buffer. We made the protocol of cell separation for both populations.

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：CAF(癌関連線維芽細胞) 胆管癌

1. 研究開始当初の背景

近年癌の進展に癌間質細胞の関与が報告され、cancer-associated fibroblast(CAF)の役割が注目されている。肝癌においてCAFの由来細胞は明らかでなく、我々は肝星細胞が肝内胆管癌の腫瘍間質に存在、癌の進展に促進的に作用することを報告し、in vitro、in vivo においても胆管癌細胞の増殖を促進させることを確認した。一方、慢性肝炎・肝硬変において肝の線維化に中心的な役割をはたすmyofibroblastとCAFには類似点が存在すると考えられるが、その由来細胞や機能に関しては明らかでない。

2. 研究の目的

肝内胆管癌におけるCAFをtargetとした治療標的を検索するため、症例毎に非癌部由来のfibroblast、myofibroblastとCAFの分離を行い、それらの生物学的相違を明らかにし、治療標的を模索する。

3. 研究の方法

肝内胆管癌切除症例において、肝における非癌部のfibroblast、myofibroblastと癌部のCAFを分離し、miRNAを含めたtotal RNAを抽出する。Microarray、miRarrayを用いて、網羅的に発現の差異を調べる。fibroblastがmyofibroblastへと活性化する際に変化するマーカーを検索し、同時に、癌間質に存在するmyofibroblastと非癌部のmyofibroblastとの差異を調べる。同一個体内での局在の異なる均一な細胞集団を比較することで、それぞれの果たす機能の違いを明らかにする。

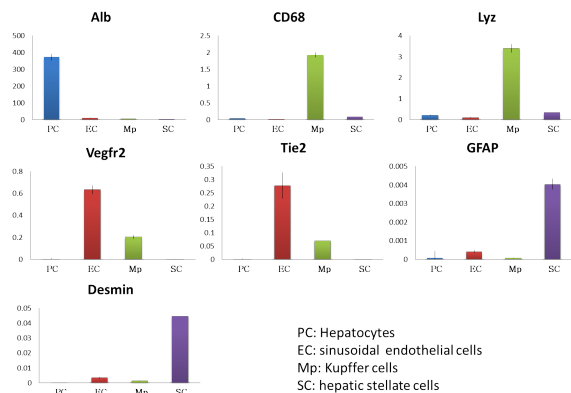
4. 研究成果

(1)胆管癌組織からのヒトCAF分離：胆管癌腫瘍組織は「けしごむ」様の硬さを有し、RNAやDNA抽出においても肝細胞癌と比較してhomogenizeに時間を要する。組織細切後、コラゲナーゼ(II、IV)・ヒアルロニダーゼ・DNase・gentlemax dissociator(miltenyi)を用いて、適切な濃度条件・反応時間を検討したが、もっとも大きな問題点として分離した細胞のほとんどがトリパンブルー陽性すなわち死細胞であり、消化のプロセスにおける細胞へのダメージが非常に大きいということであった。

(2)マウス Myofibroblast、Normal fibroblastの分離：ヒトサンプルは組織を採取できる予定がしばしば夕方になること、腫瘍・背景肝組織の個人間のvariationが非常に大きく、プロトコールの調整が困難であることから、まず基本的なプロトコールの樹立のため、マウス星細胞・myofibroblastの分離にとりくんだ。まず、正常星細胞について、BL6(6 month old)マウスを用いて、Liver perfusionを行い、正常星細胞は、Nycodenzを用いた standard protocol に修正を加え、pronase、collagenaseIVを digestion buffer

として用いた。最終的に culture dish へ張り付く細胞を回収し、purificationの specificityを確認すると、血管内皮細胞、マクロファージ分画の除去がどうしても困難であったため、これらの除去を抗体およびcolumn(Miltenyi Biotech)を用いて行い、非常に純度の高い星細胞の分離に成功した。星細胞、血管内皮細胞、Kupffer cellの分離も同時に行い、それぞれの細胞の特異性の確認には特異的な primerを用いて、mRNAの発現で確認した。次に、myofibroblastの分離にとりくんだ。慢性肝炎を誘発することで広く知られる、DDC(diethoxycarbonyl dihydrocollidine) dietを用いて、マウス肝のmyofibroblastを誘発し、同様に分離を行った。より多くの Digestion buffer、Collagenaseを通常の星細胞よりも必要としたが、培養の際はRat tail collagen処理したdishへ良好な培養が可能であった。肝細胞とstellate cellは強固に接着しており、同時に肝細胞を分離培養することは不可能であった。これらのプロトコールをベースに、人胆管癌細胞と、背景肝組織を用いて、現在プロトコールを改良中である。

Cell separation



(Unpublished data)

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19件)

Okabe H, Delgado E, Lee JM, Yang J, Kinoshita H, Hayashi H, Tsung A, Behari J, Beppu T, Baba H, Monga SP. Role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a biomarker in hepatocellular carcinoma. Plos One. 2014 (in press) 査読有

Yang J, Nejak-Bowen KN, Okabe H, Lang RA, Williams RO, Monga SP. Beta-catenin signaling in murine liver zonation and regeneration: A Wnt-Wnt situation! Hepatology 2014 (in press). 査読有
 DOI: 10.1002/hep.27082.

Okabe H, Beppu T, Hayashi H, Masuda T, Mima K, Nakagawa S, Kuroki H, Imai K, Nitta H, Masuda T, Hashimoto D, Chikamoto A, Watanabe M, Ishiko T, Yoshida M, Yamashita Y, Baba H. Rank classification based on the combination of indocyanine green retention rate at 15 min and (99m)Tc-DTPA-galactosyl human serum albumin scintigraphy predicts the safety of hepatic resection. Nucl Med Commun. 2014; 35:478-483. 査読有
DOI: 10.1097/MNM.0000000000000075.

Ishimoto T, Sugihara H, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Okabe H, Hidaka K, Yokoyama N, Miyake K, Yoshikawa M, Nagano O, Komohara Y, Takeya M, Saya H, Baba H. Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation. Carcinogenesis. 2014 May;35(5):1003-11. 査読有
DOI: 10.1093/carcin/bgt402.

Okabe H, Ishimoto T, Mima K, Nakagawa S, Hayashi H, Kuroki H, Imai K, Nitta H, Saito S, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Nagano O, Beppu T, Saya H, Baba H. CD44s signals the acquisition of the mesenchymal phenotype required for anchorage-independent cell survival in hepatocellular carcinoma. Br J Cancer. 2014 Feb 18;110(4):958-66. 査読有
DOI: 10.1038/bjc.2013.759.

Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Yoshida M, Masuda T, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Ishiko T, Yamashita Y, Baba H. Remnant liver volume-based predictors of postoperative liver dysfunction after hepatectomy: Analysis of 625 consecutive patients from a single institution. Int J Clin Oncol. 2013 Jul 17. [Epub ahead of print], 査読有
DOI: 10.1007/s10147-013-0591-0

Okabe H, Beppu T, Nakagawa S, Yoshida M, Hayashi H, Masuda T, Imai K, Mima K, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Yamashita Y, Baba H. Percentage of future liver remnant volume before portal vein embolization influences the degree of liver regeneration after hepatectomy. J Gastrointest Surg. J Gastrointest Surg. 2013 Aug;17(8):1447-51. 査読有
DOI: 10.1007/s11605-013-2237-y.

Saito S, Okabe H, Watanabe M, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Tanaka Y, Kurashige J, Miyamoto Y, Baba H. CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer. Oncol Rep. 2013; 29:1570-1578. 査

読有

DOI: 10.3892/or.2013.2273.

Mima K, Hayashi H, Kuroki H, Nakagawa S, Okabe H, Chikamoto A, Watanabe M, Beppu T, Baba H. Epithelial-mesenchymal transition expression profiles as a prognostic factor for disease-free survival in hepatocellular carcinoma: Clinical significance of transforming growth factor- signaling. Oncol Lett. 2013; 5:149-154. 査読有
DOI: 10.3892/ol.2012.954

Mima K, Hayashi H, Imai K, Kuroki H, Nakagawa S, Okabe H, Chikamoto A, Watanabe M, Beppu T, Baba H. High CD44s expression is associated with the EMT expression profile and intrahepatic dissemination of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2013 Apr;20(4):429-34. 査読有
DOI: 10.1007/s00534-012-0580-0.

Kinoshita H, Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Yokoyama N, Ishiko T, Shinriki S, Jono H, Ando Y, Baba H. CYLD downregulation is correlated with tumor development in patients with hepatocellular carcinoma. Mol Clin Oncol. 2013; 1:309-314. 査読有
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649166>

Kinoshita H, Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Ishimoto T, Miyake K, Yokoyama N, Ishiko T, Baba H. Cystine/glutamic acid transporter (xCT) is a novel marker for predicting poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. Oncol Rep. 2013; 29:685-689. 査読有
DOI: 10.3892/or.2012.2162.

Baba H, Watanabe M, Okabe H, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Baba Y, Iwatsuki M, Chikamoto A, Beppu T. Upregulation of ERCC1 and DPD expressions after oxaliplatin based first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer. Br J Cancer. 2012; 107:1950-1955. 査読有
DOI: 10.1038/bjc.2012.502.

Otao R, Beppu T, Ishiko T, Mima K, Okabe H, Hayashi H, Masuda T, Chikamoto A, Takamori H, Baba H. External biliary drainage and liver regeneration after major hepatectomy. Br J Surg. 2012;99 :1569-74. 査読有
DOI: 10.1002/bjs.8906.

Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, Watanabe M, Beppu T, Tamada M, Nagano O, Saya H, Baba H. CD44s regulates the TGF- β -mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor

prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 2012;72:3414-23.

査読有

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0299.

Okabe H, Beppu T, Ueda M, Hayashi H, Ishiko T, Masuda T, Otao R, Hasita H, Mima K, Miyake K, Jono H, Shinriki S, Ando Y, Baba H. Identification of CXCL5 involved in the interaction between cholangiocarcinoma and cancer associated fibroblasts. Int J Cancer. 2012;131:2234-41. 査読有

DOI: 10.1002/ijc.27496.

Okabe H, Beppu T, Hayashi H, Ishiko T, Masuda T, Otao R, Horlad H, Baba H. The role of hepatic stellate cells in the pathogenesis of hepatocellular and cholangiocarcinoma. Europ J Clin Med Oncol 2011; 3: (2). 査読有

Okabe H, Beppu T, Ishiko T, Masuda T, Hayashi H, Otao R, Hasita H, Okabe K, Sugiyama S, Baba H. Preoperative portal vein embolization (PVE) for patients with hepatocellular carcinoma can improve resectability and may improve disease-free survival. J Surg Oncol. 2011; 104:641-6. 査読有

DOI: 10.1002/jso.21928.

Okabe H, Beppu T, Hayashi H, Ishiko T, Masuda T, Otao R, Hasita H, Jono H, Ueda M, Shinriki S, Ando Y, Baba H. Hepatic stellate cells accelerate the malignant behavior of cholangiocarcinoma cells. Ann Surg Oncol. 2011; 18:1175-84. 査読有

DOI: 10.1245/s10434-010-1391-7.

〔学会発表〕(計4件)

Okabe H, Beppu T, Ueda M, Hayashi H, Masuda T, Mima K, Nakagawa S, Miyake K, Yokoyama N, Baba Y, Takamori H, Ishiko T, Jono H, Shinriki S, Ando Y, Baba H: Identification of CXCL5/ENA-78 regulating the interaction of cholangiocarcinoma and cancer-associated fibroblasts, AACR103th Annual Meeting 2012, 2012.4.1~4.2, Chicago convention center, IL, USA

岡部弘尚、別府 透、植田光晴、石河隆敏、近本 亮、美馬浩介、中川茂樹、今井克憲、城野博史、高森啓史、安東由喜雄、馬場秀夫、「肝内胆管癌の癌間質相互作用におけるCXCL5の役割」、第112回日本外科学会定期学術集会、2012年4月12日、千葉(幕張メッセ国際会議場)

岡部弘尚、別府 透、植田光晴、石河隆敏、近本 亮、増田稔郎、ハスタホスラッド、美馬浩介、城野博史、高森啓史、安東由喜男、馬場秀夫、「質量分析を用いた癌関連線維芽細胞と胆管癌細胞の相互作用を制御する因子CXCL5の同定」、第70回日本癌学会学術総会、2011年11月3日、名古屋(名古屋国際

会議場)

Okabe H, Beppu T, Ishiko T, Chikamoto A, Masuda T, Otao R, Hasita H, Mima K, Takamori H, Baba H: Side population cells have some stem-like properties in hepatocellular carcinoma, AACR102nd Annual Meeting 2011, 2011.4.2, Orland convention center, FL, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 弘尚 (OKABE, Hirohisa)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号: 40573621

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: