

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461909

研究課題名(和文) 肝癌の治療標的探索を目的とした線維化関連間質細胞の基礎研究

研究課題名(英文) The study of stromal cells constituting fibrous stroma for the treatment of liver cancer

研究代表者

祝迫 恵子 (IWAISAKO, Keiko)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：70625300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌では、様々な線維化が共存し、癌の進展をサポートしていると考えられている。本研究では、線維化を構成する癌細胞以外の細胞を解析することにより、肝癌の新たな治療戦略を見出すことを目標とした。従来の臨床検体を用いた解析は、「癌部」と「非癌部」を肉眼的に識別して、バルクで検討を行う。しかし、「癌部」組織を顕微鏡で見ると腫瘍間質の線維増生と線維芽細胞や免疫細胞の浸潤が著しい。そこで、腫瘍間質を分取して遺伝子解析発現を行ったところ、胆管細胞癌の間質には線維化関連遺伝子や免疫細胞のマーカー遺伝子が高発現することがわかった。胆管細胞癌の腫瘍間質に存在する細胞が治療標的となる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In liver cancer, it is thought that various fibrosis presents and supports the progress of cancer. In this study, we aimed to find a new treatment strategy for liver cancer by analyzing cells constituting fibrous cancer stroma. To analysis of clinical samples, we have discriminated "tumor" and "non-tumor" macroscopically and investigated in bulk. However, the microscopically observation revealed that "tumor" tissue markedly increased fibrosis and infiltration of fibroblasts and immune cells. Therefore, using by laser capture microdissection, we isolated cancer stroma and investigated gene expression. It was found that fibrotic genes and marker genes of immune cells were highly expressed in the stroma of cholangiocellular carcinoma. Stroma cells of cholangiocellular carcinoma can be considered as therapeutic targets.

研究分野：外科学一般

キーワード：線維化 肝癌 胆管細胞癌

1. 研究開始当初の背景

【肝癌治療の現状】

原発性肝癌の90%以上は肝細胞癌であり、残る多くは胆管細胞癌である。肝細胞癌の治療法としては、肝切除、ラジオ波焼灼法、肝動脈塞栓化学療法などの局所療法が用いられるが、これらが適応とならない進行肝細胞癌の場合には、全身化学療法が適応となる。しかし、大多数の症例で抗癌剤に抵抗性を示す。胆管細胞癌では抗癌剤の奏効率はさらに低く、標準的な化学療法が確立していないのが現状である。進行性原発性肝細胞癌や、胆管細胞癌における抗癌剤抵抗性の一因として、P糖たんぱく質の過剰発現などが提唱されているが不明点も多く、申請者は、その一因として下記のような肝癌における線維性変化が関与すると考えた。

【仮説：線維化に関連する腫瘍間質細胞は肝癌治療の妨げであり新治療標的となりうる】

肝細胞癌が、患者体内で増殖するに伴い、() 癌病変周囲に線維性被膜が形成されることで動脈支配となり、癌部内圧が上昇するとともに(特筆すべきこととして、齧歯類の肝癌モデルではこの線維性被膜は形成されず、ヒト癌の特徴といえる)、() 腫瘍間質にも線維が増生する、という特異な線維性変化が認められる。さらに、() 胆管細胞癌では、特に、腫瘍内部にまで著しい線維の増生が観察され、抗癌剤の癌細胞への到達率の低下につながると思われる。既存の抗癌剤が、癌細胞株を用いた *in vitro* での検討や、齧歯類を用いた病態モデルでは高い治療効果を示しながら、臨床において効果が得られない理由として、このような、ヒトの肝癌に特徴的な、線維性変化が顧みられていなかったことが一因である可能性が挙げられる。肝臓における発癌の機序として、前癌病変部における線維化が関与するという事は、従来から指摘されてきたが、癌の進展や治療抵抗性と線維化の関係には明らかになっていない点が多い。

今後の抗癌剤治療は、癌細胞だけでなく癌微小環境を構築する腫瘍間質細胞をも制御することを目指すべきであると考えて、以下で説明する本研究を企画した

2. 研究の目的

本研究では、癌部および非癌部の腫瘍間質細胞を細胞レベルで解析することにより、これまで「癌部」の特徴として捉えられたりまた、癌部の大きな変化に隠されていた腫瘍間質細胞の性状を明らかにし、肝癌の新たな治療標を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

臨床検体の解析において、癌部、非癌部における線維化、間質細胞の分布を組織学的に評価した。シリウスレッド染色にて癌部、非癌部の線維化を比較、評価した。次に免疫染色による細胞の局在と増殖の解析、肝に特異的

に存在し、線維化に寄与する細胞について、組織内局在を同定した。肝星細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞について、各々のマーカーである Vimentin、EMR-1、PECAM-1 の免疫染色を行い癌部と非癌部で細胞密度や細胞の形態、配列などの相違を観察し、形態学的に癌の進展への関与について検討した。

肝において線維を産生する細胞として、肝星細胞以外の portal fibroblasts が注目されるようになった。これらを識別するため、肝星細胞特異的マーカーの Vimentin、portal fibroblasts のマーカーとされている Fibulin2 や Elastine の免疫染色、共通に発現していると考えられる SMA の免疫染色を行った。

レーザーマイクロディセクションによって癌部の腫瘍間質(癌細胞をできるだけ含まない)を分取し、線維化関連遺伝子の発現レベルを解析した。

4. 研究成果

肝癌のうち胆管細胞癌は腫瘍間質に線維化関連遺伝子や免疫細胞のマーカー遺伝子が高発現する症例が多く、肝細胞癌では腫瘍間質の増生自体が軽度で線維芽細胞や免疫細胞の浸潤も軽度であることがわかった。胆管細胞癌の腫瘍間質に存在する線維芽細胞が TGF- β などの液性因子を放出して癌の増生をサポートしていることが示唆された。これらの結果から、腫瘍間質の線維芽細胞は治療標的の候補であり、その活性化を抑制することで腫瘍の増生が抑えられる可能性があらと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計21件)

査読有

Koyama Y, Wang P, Liang S, Iwaisako K, Liu X, Xu J, Zhang M, Sun M, Cong M, Karin D, Taura K, Benner C, Heinz S, Bera T, Brenner DA, Kisseleva T. Mesothelin/mucin 16 signaling in activated portal fibroblasts regulates cholestatic liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2017 Apr 3;127(4):1254-1270.

Kawaguchi K, Suzuki E, Nishie M, Kii I, Kataoka TR, Hirata M, Inoue M, Pu F, Iwaisako K, Tsuda M, Yamaguchi A, Haga H, Hagiwara M, Toi M. Downregulation of neuropilin-1 on macrophages modulates antibody-mediated tumoricidal activity. *Cancer Immunol Immunother.* 2017 Apr 21. (in print)

Ohmae S, Noma N, Toyomoto M, Shinohara M, Takeiri M, Fuji H, Takemoto K, Iwaisako K, Fujita T, Takeda N, Kawatani M, Aoyama M, Hagiwara M, Ishihama Y, and Asagiri M. Actin-binding

protein coronin 1A controls osteoclastic bone resorption by regulating lysosomal secretion of cathepsin K. *Sci Rep*. 2017.

Kasai Y, Toriguchi K, Hatano E, Nishi K, Ohno M, Yoh T, Fukuyama K, Nishio T, Okuno M, Iwaisako K, Seo S, Taura K, Kurokawa M, Kunichika M, Uemoto S, Nishi E. Nardilysin promotes hepatocellular carcinoma through activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Sci*. 2017 Feb 16. (in print)

Nishio T, Taura K, Iwaisako K, Koyama Y, Tanabe K, Yamamoto G, Okuda Y, Ikeno Y, Yoshino K, Kasai Y, Okuno M, Seo S, Sakurai T, Asagiri M, Hatano E, Uemoto S. Hepatic vagus nerve regulates Kupffer cell activation via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol*. 2017 Jan 2. (in print)

Shi G, Yoshida Y, Yuki K, Nishimura T, Kawata Y, Kawashima M, Iwaisako K, Yoshikawa K, Kurebayashi J, Toi M, Noda M. Pattern of RECK CpG methylation as a potential marker for predicting breast cancer prognosis and drug-sensitivity. *Oncotarget*. 7(50):82158-82169, 2016.

Fujita T, Soontrapa K, Ito Y, Iwaisako K, Moniaga CS, Asagiri M, Majima M, Narumiya S. Hepatic stellate cells relay inflammation signaling from sinusoids to parenchyma in mouse models of immune-mediated hepatitis. *Hepatology*. 63(4):1325-39, 2016.

Niikura N, Hashimoto J, Kazama T, Koizumi J, Ogiya R, Terao M, Oshitanai R, Morioka T, Tsuda B, Okamura T, Saito Y, Iwaisako K, Iwamoto T, Hayashi N, Imai Y, Tokuda Y. Diagnostic performance of (18)F-fluorodeoxyglucose PET/CT and bone scintigraphy in breast cancer patients with suspected bone metastasis. *Breast Cancer*. 23:662-667, 2016.

Murakami Y, Kubo S, Tamori A, Itami S, Kawamura E, Iwaisako K, Ikeda K, Kawada N, Ochiya T, Taguchi YH. Comprehensive analysis of transcriptome and metabolome analysis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep*. 5:16294, 2015.

Yokoo T, Wolfson T, Iwaisako K, Peterson MR, Mani H, Goodman Z, Changchien C, Middleton MS, Gamst AC, Mazhar SM,

Kono Y, Hassanein T, Ho SB, Sirlin CB. Evaluation of liver fibrosis using texture analysis on combined-contrast-enhanced magnetic resonance image 3.0T. *Biomed Res Int*. 2015:387653, 2015.

Noma N, Asagiri M, Takeiri M, Ohmae S, Takemoto K, Iwaisako K, Maeda-Yamamoto M, Minato N, Simizu S, Umezawa K: Inhibition of MMP-2-Mediated Mast Cell Invasion by NF- κ B Inhibitor DHMEQ in Mast Cells. *International archives of allergy and immunology* 166(2): 84-90, 2015.

Tanabe K, Taura K, Koyama Y, Yamamoto G, Nishio T, Okuda Y, Nakamura K, Toriguchi K, Takemoto K, Yamanaka K, Iwaisako K, Seo S, Asagiri M, Hatano E, Uemoto S: Migration of splenic lymphocytes promotes liver fibrosis through modification of T helper cytokine balance in mice. *Journal of gastroenterology* 50:1054-1068, 2015.

Kageyama S, Hata K, Tanaka H, Hirao H, Kubota T, Okamura Y, Iwaisako K, Takada Y, Uemoto S: Intestinal Ischemic preconditioning ameliorates hepatic ischemia reperfusion injury in rats: Role of heme oxygenase-1 in the second-window of protection. *Liver Transplantation* 21(1): 112-122, 2015.

Takemoto K, Hatano E, Iwaisako K, Takeiri M, Noma N, Ohmae S, Toriguchi K, Tanabe K, Tanaka H, Seo S, Taura K, Machida K, Takeda N, Saji S, Uemoto S, Asagiri M: Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure. *FEBS Open Bio* 4: 777-787, 2014.

Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, Liu X, Xu J, Wang P, Paik YH, Meng F, Asagiri M, Murray LA, Hofmann AF, Iida T, Glass CK, Brenner DA, Kisseleva T: Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *PNAS* 111(32): E3297-3305, 2014.

Jobara K, Kaido T, Hori T, Iwaisako K, Endo K, Uchida Y, Uemoto S: Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats. *Nutrition* 30(10): 1195-1207, 2014.

Koyama Y, Taura K, Hatano E, Tanabe K, Yamamoto G, Nakamura K, Yamanaka K, Kitamura K, Narita M, Nagata H, Yanagida A, Iida T, Iwaisako K, Fujinawa H, Uemoto S: Effects of oral intake of hydrogen water on liver fibrogenesis in mice. *Hepatology Research* 44(6): 663-677, 2014.

Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Ikeda K, Asagiri M, Uemoto S: Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Hepatology Research* 44(4): 460-473, 2014.

査読無

Taura K, Iwaisako K, Hatano E, Uemoto S. Controversies over the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Liver Fibrosis. *J Clin Med.* 2016 Jan 14;5(1). pii: E9. doi: 10.3390/jcm5010009.

Iwaisako K, Taura K, Koyama Y, Takemoto K, Asagiri M: Strategies to Detect Hepatic Myofibroblasts in Liver Cirrhosis of Different Etiologies. *Current pathobiology reports* 2(4): 209-215, 2014.

- ② 祝迫恵子, 朝霧成拳, 上本伸二 肝線維化における筋線維芽細胞の起源 細胞 47: 172-175, 2015.

〔学会発表〕(計6件)

国際学会一般公演

Iwaisako K, Zhao X, Asagiri M, Kawamoto M, Uemoto S: Reconstruction of the hepatic artery in mouse liver transplantation. 2017 Keystone Symposia Conference C8: Injury, Inflammation and Fibrosis (Snowbird, USA) 2017.

招待講演

祝迫 恵子: 肝線維化はどこまで解明されたか? 京都大学 再生医科学研究所 生体組織工学研究部門 生体材料学分野セミナー(京都) 2015年3月14日

祝迫 恵子: 教育セッション3 腎障害後の線維化と再生のターニングポイント 線維化と再生を多臓器に学ぶ Liver fibrosis and regeneration 第57回日本腎臓学会学術総会(横浜) 2014年7月5日

国内学会一般公演

祝迫 恵子, 朝霧 成拳, 瀬尾 智, 田浦 康

二郎、波多野 悦朗、上本 伸二、佐治 重衡: 肝胆膵領域の悪性腫瘍におけるメンテリンの診断用バイオマーカーとしての意義. 第52回日本癌治療学会学術集会(横浜) 2014.

祝迫 恵子, 河本 宏、佐治 重衡: 肝線維症における筋線維芽細胞の起源第35回 日本炎症・再生医学会年次集会(沖縄) 2014.

祝迫 恵子, 朝霧 成拳, 木下 正彦, 濱野 玄弥, 野沢 彰紀, 西岡 孝芳, 浦田 順久, 坂田 親治, 竹村 茂一, 久保 正二 肝臓の筋線維芽細胞の起源 肝疾患の治療標的探索 第114回 日本外科学会定期学術集会(京都) 2014.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祝迫 恵子 (IWASAKO, Keiko)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号: 70625300