

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893177

研究課題名(和文) トロンボスポンディン制御による消化器癌の放射線耐性解除に関する研究

研究課題名(英文) The role of THBS-1 expression in radioresistance

研究代表者

高須 千絵 (TAKASU, Chie)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：70582823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HDAC阻害剤によりTHBS1が放射線の効果を高める作用機序を検討した。THBS1が放射線の効果を高める作用機序として、本研究によりHDAC阻害剤による放射線増感作用には、血管新生関連遺伝子VEGF、Autophagy関連因子Beclin3、Apoptosis 関連因子caspase3が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We revealed that VEGF (Vascular endothelial growth factor), Beclin3 (autophagy-related gene) and caspase 3 (autophagy-related gene) played important role for enhancing radiosensitivity by HDAC inhibitor.

研究分野：消化器外科

キーワード：HDAC阻害剤 放射線増感作用

1. 研究開始当初の背景

Thrombospondin 1 (THBS1)は血管新生抑制、血小板凝集、炎症反応、創傷治癒、腫瘍発育など多彩な生理活性を有している。THBS1はCD36あるいはCD47と結合して一酸化窒素で誘導される血管新生を阻害するとされ、更に活性化マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)のレベルを低下させて細胞外基質からのVEGF(vascular endothelial growth factor)の遊離を阻止し、血管新生を抑制する。また、CD47が欠乏するとTHBS1が作用せず、放射線によるDNA損傷に対してApoptosisよりもAutophagyが活性化され、放射線抵抗性を示すとの報告があり、HIF-1はCD47を促進するとの報告がある。一方、Epigenetic遺伝子発現制御が注目され、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC: histone deacetylase)はヒストン蛋白を脱アセチル化することで転写抑制、分化抑制が起こり、発癌や癌悪性度との関連が報告されている。HDAC阻害剤はTHBS1と結合すると血管新生抑制作用を増強させると報告されており、更にTHBS1促進が血管新生阻害作用を有することから抗腫瘍効果並びに腫瘍血管の正常化によるDrug delivery効果と腫瘍内の酸素分圧上昇効果により放射線増感作用を期待できる。

以上のことから、THBS1が放射線増感作用を有している可能性に着目し、更にHDAC阻害剤によるTHBS1促進で更に放射線増感作用を高めることと腫瘍血管の正常化によるDrug delivery効果や腫瘍内の酸素分圧上昇により放射線感受性を高める可能性を検討することとした。

2. 研究の目的

HDAC阻害剤によりTHBS1が放射線の効果を高める作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1).HDAC阻害によるTHBS1の発現誘導  
ヒト大腸癌細胞株(HT-29)にHDAC阻害剤(VPA、TSA)と放射線照射(4Gy/day)を行い、HDAC阻害剤と放射線治療併用によるTHBS1発現と血管新生関連、Autophagy関連因子、微小環境関連遺伝子の変化を検討した。

MTT assay: 72時間incubate後にcellular viabilityを測定する。

第1群: コントロール

第2群: RT(放射線)単独; 2Gy(150kv,5mA)/日, 2回/週, 4回照射

第3群: HDAC阻害剤(バルプロ酸,TSA)単独: 0.5mM

第4群: RT+HDAC阻害剤(バルプロ酸,TSA)

RT-PCR:

- 1.低酸素関連遺伝子、タンパク質(HIF 1 $\alpha$ )
- 2.血管新生関連遺伝子、タンパク質(VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ ,Angiopoietin1)

3.細胞周期関連遺伝子、タンパク質(p53)

4.DNA修復関連遺伝子

(Rad51, BRCA2, DNA-PK)

5.Autophagy関連因子

(CD47, mTOR, ULK, PI3K, ERK, LC3, SQSTM1, ATG, Beclin3, Vps34)

6.Apoptosis関連因子(TUNEL染色)

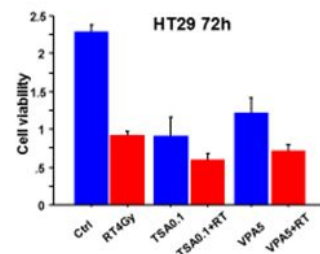
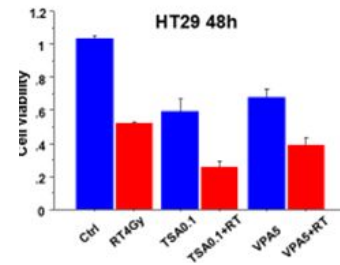
(2).大腸癌肝転移におけるTHBS1発現の意義の検討

対象は大腸癌肝転移初回肝切除症例94例で、大腸癌肝転移におけるTHBS1発現と各種臨床病理学的因子との関連、ついでTHBS1と関連する因子としてKi-67 labelling index, E-cadherin, microvessel density, HIF-1発現を免疫染色で検討した。

4. 研究成果

(1).HDAC阻害によるTHBS1の発現誘導

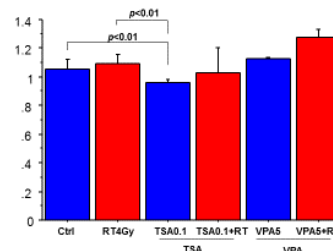
Cellular viability (MTT assay): CTLに比しRT単独、HDAC阻害剤(VPA、TSA)投与により有意に低下し、さらにRTとHDAC阻害剤併用(VPA、TSA)によりさらに有意に低下したが、相乗効果まではいかなかった。



RT-PCR:

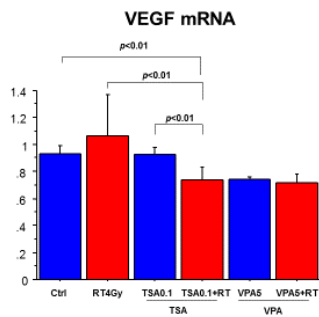
1.低酸素関連遺伝子(HIF 1 $\alpha$ )

HIF-1 mRNA



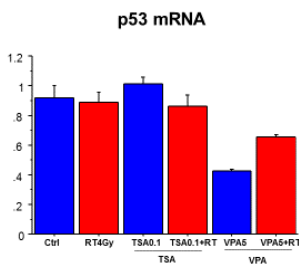
TSA投与で発現が有意に低下したが、RT併用による変化は認めなかった。

## 2.血管新生関連遺伝子 (VEGF)



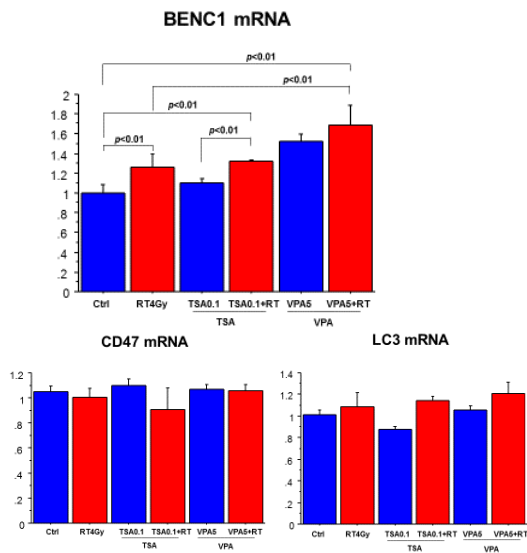
CTL、RT 単独、TSA 単独に比し TSA+RT 併用で有意に低下した。

## 3.細胞周期関連遺伝子 (p53)



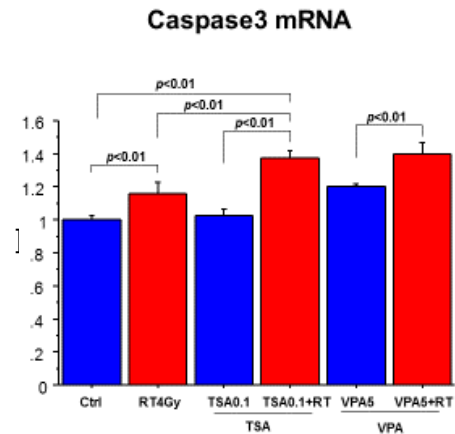
各群で有意差は認めなかった。

## 4.Autophagy 関連因子(Beclin3、CD47、LC3)



5.Autophagy 関連因子 Beclin3 mRNA は、CTL に比し RT 単独で増加し、さらに TSA+RT 併用で増加した。CD47 mRNA、LC3 mRNA 発現に関しては各群で有意差は認められなかった。

## 6.Apoptosis 関連因子(Caspase3)



CTL に比し RT 単独で増加し、さらに TSA+RT 併用で増加した。

## (2).大腸癌肝転移における THBS1 発現の意義検討

臨床病理学的背景

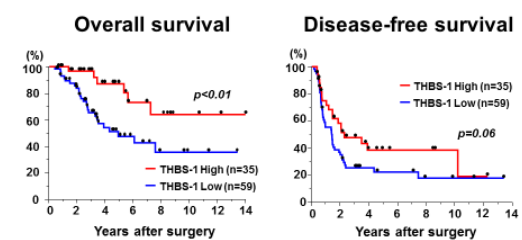
### Clinicopathological factors

Factors	THBS-1		p-value
	High (n=35)	Low (n=59)	
Age (65> / 65≤)	17 / 18	26 / 33	0.67
Sex (M / F)	9 / 26	24 / 35	0.13
Meta. period (synchro / metachro)	19 / 16	32 / 27	0.90
Tumor size (5cm> / 5cm≤)	28 / 7	42 / 17	0.42
Tumor number (3> / 3≤)	17 / 18	35 / 24	0.27
H (1 / 2, 3)	24 / 11	38 / 21	0.75
Grade (A / B, C)	24 / 11	23 / 36	0.01
CEA (low / high)	9 / 19	10 / 34	0.37
CA19-9 (low / high)	18 / 10	28 / 16	0.95
Primary region (colon / rectum)	19 / 16	36 / 23	0.52
Diff. (well / others)	10 / 25	20 / 39	0.86
Lymph nodes metastasis (- / +)	20 / 15	19 / 40	0.02

臨床病理学的因子の検討では、THBS-1 低発現群では GradeB,C が多く、リンパ節転移を有意に多く認めた。

THBS-1 発現と予後

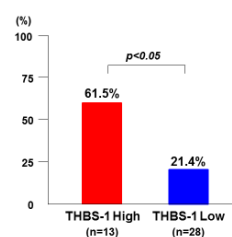
### Prognosis



THBS-1 低発現群は有意に予後不良であり、また無再発予後に関しても低発現群で再発が多い傾向を認めた。

THBS-1 発現と肝再発に対する再肝切除率

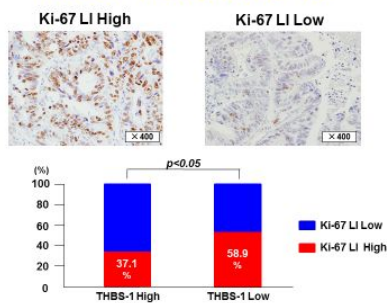
### Repeat hepatectomy rate



肝再発に対する再肝切除率では THBS-1 低発現群で有意に低率であり、THBS-1 低発現群における再発は制御不能な再発が多いことが考えられた。

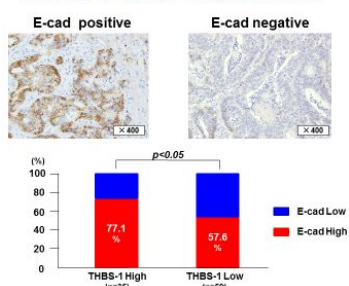
### THBS-1 発現と関連メカニズム

#### THBS-1 and Ki-67 LI



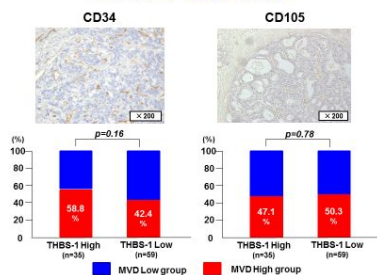
腫瘍増殖に関し Ki-67LI は THBS-1 低発現群で高かった。

#### THBS-1 and E-cadherin



EMT マーカーの E-cadherin は THBS-1 低発現群では発現が低く正の相関を認めた。

#### THBS-1 and MVD



THBS-1 発現と MVD との相関は認めなかった。

### 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 12 件)

- Iwahashi S, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Takasu C, Saito Y, Yamada S. Epithelial-mesenchymal transition-related genes are linked to aggressive local recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Cancer Lett.* 2016 May 28;375(1):47-50.

doi: 10.1016/j.canlet.2016.02.041. 査読有

- Eto S, Yoshikawa K, Nishi M, Higashijima J, Tokunaga T, Nakao T, Kashihara H, Takasu C, Iwata T, Shimada M. Programmed cell death protein 1 expression is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection. *Gastric Cancer.* 2016 Apr;19(2):466-471. doi: 10.1007/s10120-015-0519-7. 査読有
- Nakao T, Shimada M, Yoshikawa K, Higashijima J, Tokunaga T, Nishi M, Takasu C, Kashihara H, Suzuka I, Nishizaki T, Okitsu H, Yagi T, Miyake H, Miura M, Fukuyama M, Wada D, Bando Y. Propensity score-matched study of laparoscopic and open surgery for colorectal cancer in rural hospitals. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016 Feb 19. doi: 10.1111/jgh.13322. [Epub ahead of print] 査読有
- Davaadorj M, Imura S, Saito Y, Morine Y, Ikemoto T, Yamada S, Takasu C, Teraoku H, Yoshikawa M, Shimada M. Loss of SFRP1 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res.* 2016 Feb;36(2):659-664. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Loss+of+SFRP1+Expression+Is+Associated+with+Poor+Prognosis+in+Hepatocellular+Carcinoma>. 査読有
- Yoshikawa K, Shimada M, Higashijima J, Nakao T, Nishi M, Kashihara H, Takasu C. Limited lymph node dissection in elderly patients with gastric cancer. *J Med Invest.* 2016;63(1-2):91-95. doi: 10.2152/jmi.63.91. 査読有
- Yoshikawa K, Shimada M, Higashijima J, Nakao T, Nishi M, Takasu C, Kashihara H, Eto S. Combined liver mobilization and retraction: A novel technique to obtain the optimal surgical field during laparoscopic total gastrectomy. *Asian J Endosc Surg.* 2015 Dec 18. doi: 10.1111/ases.12271. [Epub ahead of print] 査読有
- Nakao T, Iwata T, Hotchi M, Yoshikawa K, Higashijima J, Nishi M, Takasu C, Eto S, Teraoku H, Shimada M. Prediction of response to preoperative chemoradiotherapy and establishment of individualized therapy in advanced rectal cancer. *Oncol Rep.* 2015 Oct;34(4):1961-1967 doi: 10.3892/or.2015.4196. 査読有
- Zhu C, Takasu C, Morine Y, Bando Y, Ikemoto T, Saito Y, Yamada S, Imura S,

- Arakawa Y, Shimada M. KISS1 Associates with Better Outcome via Inhibiting Matrix Metalloproteinase-9 in Colorectal Liver Metastasis. *Ann Surg Oncol*. 2015 Oct 15. [Epub ahead of print] doi: 10.1245/s10434-015-4891-7. 査読有
9. Eto S, Yoshikawa K, Shimada M, Higashijima J, Tokunaga T, Nakao T, Nishi M, Takasu C, Sato H, Kurita N. The Relationship of CD133, Histone Deacetylase 1 and Thrombospondin-1 in Gastric Cancer. *Anticancer Res*. 2015; Apr;35(4):2071-2076.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+Relationship+of+CD133%2C+Histone+Deacetylase+1+and+Thrombospondin-1+in+Gastric+Cancer>  
査読有
10. Kashihara H, Shimada M, Kurita N, Sato H, Yoshikawa K, Higashijima J, Chikakiyo M, Nishi M, Takasu C. Duodenal-jejunal bypass improves diabetes and liver steatosis via enhanced glucagon-like peptide-1 elicited by bile acids. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Feb;30(2):308-315  
doi: 10.1111/jgh.12690. 査読有
11. Kanamoto M, Imura S, Morine Y, Utsunomiya T, Mori H, Arakawa Y, Takasu C, Shimada M. Effective uses of a vessel-sealing system for laparoscopic unroofing of liver cysts. *Asian J Endosc Surg*. 2015;91-94  
doi: 10.1111/ases.12134. 査読有
12. Higashijima J, Shimada M, Iwata T, Yoshikawa K, Nakao T, Nishi M, Kashihara H, Takasu C. New ports placement in laparoscopic central lymph nodes dissection with left colic artery preservation for sigmoid colon and rectal cancer. *J Med Invest*. 2015;62(3-4):223-227  
doi: 10.2152/jmi.62.223. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 中尾寿宏, 島田光生, 岩田貴, 吉川幸造, 東島潤, 西正暁, 高須千絵, 江藤祥平  
非癌部組織における Thrombospondin-1 (THBS1)と胃発癌との関連 第115回日本外科学会定期学術集会 2015年4月16-18日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
2. 高須千絵, 森根裕二, 居村暁, 荒川悠佑, 岩橋衆一, 齋藤裕, 山田眞一郎, 石川大地, 島田光生 肝虚血再灌流障害の発生・進展機序の解明と統合的治療法開発の取り組み 第115回日本外科学会定期学術

集会 2015年4月16-18日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

3. 江藤祥平, 島田光生, 岩田貴, 吉川幸造, 東島潤, 徳永卓哉, 中尾寿宏, 西正暁, 高須千絵

胃癌における PD-1, THBS1 発現は再発と関係する 第115回日本外科学会定期学術集会 2015年4月16-18日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高須 千絵 (TAKASU, Chie)

徳島大学・病院・助教

研究者番号: 70582823