

## 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 25 年 5 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012 年度

課題番号：22591515

研究課題名（和文） がん間質の再構築誘導による新規難治がん治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new refractory cancer treatment by remodeling induction of cancer stroma

研究代表者

太田 哲生 (OHTA TETSUO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40194170

研究成果の概要（和文）：豊富な間質増生を伴う肝内胆管癌（ICC）組織においてトリプシン受容体 PAR-2 およびアンジオテンシン II（AngII）受容体 AT-1 が癌細胞および線維芽細胞に認められた。また、ICC・肝星細胞株に AT-1 発現を認め、AngII 添加により ICC・肝星細胞の増殖能、肝星細胞の活性化亢進を生じ、ARB 添加によりそれらの反応は抑制された。これにより ICC 組織において局所 AngII 産生系は腫瘍細胞の増殖と間質の線維化に関与し、ARB には抗腫瘍・抗線維化効果がある可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Angiotensin II (Ang II) receptor AT-1 and receptor of trypsin (PAR-2) were observed in fibroblasts and cancer cells in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) tissue. In addition, AT-1 receptor expression was detected in ICC and hepatic stellate cell lines. Moreover, Ang II caused proliferative potential of ICC and hepatic stellate cells and Ang II increased activation of hepatic stellate cells. These reactions were inhibited by the addition of Ang II receptor blocker (ARB). It was suggested that local Ang II production system affect to interstitial fibrosis and proliferation of tumor cells in ICC tissue, and that there are anti-tumor and anti-fibrotic effects in ARB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

キーワード：癌間質、線維化、アンジオテンシン、トリプシン、胆管癌、ARB、PAR2

### 1. 研究開始当初の背景

血液癌と違って、難治性の進行固形癌を征

圧するには、癌細胞だけではなく、それを取り巻く腫瘍間質細胞、とくに血管内皮細胞

(腫瘍血管のみならず、腫瘍内に存在する平滑筋を有する既存の血管) や desmoplastic な線維化と密接な関係にある筋線維芽細胞 (肝や膵では、とくに活性化した星細胞) との相互作用の病態を詳細に解明し、その病態に基づいて癌細胞と間質細胞に共通した分子群を癌治療の標的としていくことが極めて重要な戦略のひとつと考えられる。しかし、これまでの“癌と間質の相互作用”に関する基礎研究の多くは発癌過程 (carcinogenesis) における研究がほとんどであり、すでに出来上がってしまった進行癌での“癌と間質の相互作用”という視点に立ってなされた研究はきわめて少ない。また、膵癌に代表されるように、難治がんでの腫瘍血管は構造的にも機能的にも異常性 (周皮細胞を欠き、endothelial dysfunction を呈する) を有し、かつ腫瘍内線維芽細胞が活性化するため、血管透過性の亢進や細胞外マトリックスの異常沈着で間質圧上昇が惹起されて抗癌剤の drug delivery が不良となるだけでなく、低酸素・低栄養環境下で“がん細胞と間質細胞の相互作用”により上皮・間葉系移行 (EMT) が誘導されて“がん細胞の浸潤・転移能”が亢進し、さらなる抗癌剤抵抗性を獲得するといった特殊な環境下にさらされる。このような微小環境下においては、最新の抗癌剤や分子標的治療薬を使用しても、薬剤本来の機能が適切に発揮できない可能性が推察される。一方、申請者らは、これまで動脈硬化性の血管病変や肺・肝・腎などの臓器の線維化病巣での主要責任分子として注目されてきた TGF- $\beta$  とアンジオテンシン II がある腫瘍の組織内にも高濃度で存在していることを発見し、“がん細胞と間質細胞の相互作用”のがん進展における役割を報告してきた (1-3)。そして、この2つの分子こそが腫瘍血管の endothelial dysfunction を惹起し、線維芽細胞を活性化する重要な標的分子群であると考えに至った。

## 2. 研究の目的

がん細胞と間質細胞の相互作用によるがん間質リモデリングの病態解析をさらに推し進め、同時に最近注目されているヒストン・デアセチラーゼ阻害薬 (HDAC inhibitor) とアンジオテンシン受容体ブロッカー (ARB) を用いて、TGF- $\beta$  とアンジオテンシン II 分子の発現を modulate し、“がん間質の再構築”を誘導して組織内 drug delivery の改善をはかって抗癌剤や分子標的治療薬による治療効果を最大限に引き出す治療法の開発を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 固形癌における Ang II 産生系の存在

外科的治療の対象となった各種消化器癌や乳癌での切除標本を用いて、腫瘍の中心部

ならびに腫瘍の辺縁部、さらには非癌部肝組織からそれぞれ拇指等大の組織片を採取し、ただちに-80度にて凍結保存し、その後の検査に供する。組織中アンジオテンシン II 含有量の測定には、手術時採取した組織片をホモジネート後にフロリジル法 (Morimoto T, et al., Folia Endocrinol Jap 59: 215-229, 1983) でアンジオテンシン II を吸着し、その後 RIA 法にて計測する。ACE 活性値は笠原法 (Kasahara Y, et al., Clin Chem 27: 1922-1925, 1981) で測定する。材料採取数の目安は、癌の進行度別に比較検討するため、各種癌において約 30 例づつを予定している。さらに、アンジオテンシン II が産生されるには癌組織内での腫瘍細胞由来のトリプシン活性や肥満細胞由来のトリプターゼ活性の存在が必要であり、それらの発現状況とアンジオテンシン II 含有量との関係について検討する。そのほか、癌組織中における AT1 アンジオテンシン受容体の発現、がん間質の線維化の程度や筋線維芽細胞の増生程度とアンジオテンシン II 含有量との関係についても検討する。

### 2) TGF- $\beta$ およびアンジオテンシン II 分子が線維芽細胞や肝星細胞の活性化に及ぼす影響および HDAC 阻害薬ならびにアンジオテンシン受容体ブロッカーの筋線維芽細胞活性化制御の分子機構の解明

ヒト肝星細胞由来細胞株 (LI-90, obtained from Human Science Cell Bank, Saitama, Japan) や線維芽細胞株を継代培養する。これら培養細胞株を用いて、TGF- $\beta$  およびアンジオテンシン II 刺激により培養細胞の細胞質内に活性化のマーカーである  $\alpha$ -SMA の発現が誘導されるか否かを評価する。その活性化に伴って、培養細胞が stromal-cell derived factor-1 (SDF-1)、HGF, Type 1 collagen などの発現が増強するか否かを mRNA (RT-PCR & Southern blotting 法) および蛋白 (Western 法) レベルで評価する。そして、これら活性化の細胞内シグナルが smad2, smad3 経路のリン酸化で核内移行がおこなわれてシグナルが伝達されるや否か、さらには non-smad 経路の関与についても検索する。次に、これら肝星細胞や線維芽細胞の活性化がヒストン・デアセチラーゼ阻害剤であるバルプロ酸 (抗癲癇薬として既に臨床で使用されている) によって、その活性化が制御されるか否かを検討する。そして、抑制される場合には、その細胞内シグナル伝達のどの部位がブロックされることで活性化が抑制されるのかを詳細に検討する。バルプロ酸と同様に、アンジオテンシン受容体ブロッカーを用いて同様の実験を行い、アンジオテンシン受容体ブロッカーの肝星細胞や線維

芽細胞の活性化抑制機序の分子メカニズムを解明する。

### 3) TGF- $\beta$ およびアンジオテンシン II 分子の endothelial dysfunction 誘導に関する機能的・形態学的研究および HDAC 阻害薬ならびにアンジオテンシン受容体ブロッカーの endothelial dysfunction 防御機構の解明とその有用性

本実験では、ヒトの血管内皮細胞である HUVEC 培養細胞を用いて基本的には研究 2 と同様の手法で行う。とくに、血管内皮細胞に対して、TGF- $\beta$  およびアンジオテンシン II が contraction を引き起こして血管内皮細胞間に隙間が生じて血管透過性亢進の原因となるか否かを形態学的に研究する。そしてこれらの形態学的変化がヒストン脱アセチル酵素阻害剤であるバルプロ酸あるいはアンジオテンシン受容体ブロッカーで抑制されるか否かも検討する。

### 4) 筋線維芽細胞の癌細胞に対する paracrine としての役割；とくに上皮・間葉系移行の視点から

### 5) 癌細胞における上皮・間葉系移行の情報伝達系と抗癌剤抵抗性獲得の分子メカニズムの解明

研究 4) と 5) は、ともに癌組織内における腫瘍・間葉細胞の相互作用を、上皮・間葉系移行の観点から研究するものである。本研究では、消化器癌のなかでも腫瘍内に desmoplastic change を認める胆管癌や膵癌の培養細胞株を用いて行う。とくに、すでに癌細胞膜に CXCR-4 が発現していることが報告されている (Ohira S, et al., Am J Pathol, 168: 1155-1168, 2006) 胆管細胞癌培養細胞株 HuCCT-1, と CCKS-1 を用いて筋線維芽細胞の癌細胞に対する paracrine としての役割を SDF-1/CXCR-4 シグナルシステムの視点から研究する。とくに、TGF- $\beta$  やアンジオテンシン II によって活性化した肝星細胞の胆管細胞癌に対する浸潤・転移促進機構の解明を目的に、活性型肝星細胞 LI-90 から分泌される SDF-1 が胆管細胞癌の細胞膜に発現している CXCR-4 を介して胆管細胞癌の浸潤能が増大するか否かを LI-90 の培養上清を用いた Matrigel invasion assay 法を用いて検討する。この浸潤能が SDF-1 中和抗体を培養上清に添加することにより、partial inhibition が認められることも確認する予定である。さらに、胆管細胞癌培養細胞株が SDF-1 刺激により、上皮・間葉系移行 (EMT) が惹起されるか否かも検索する。すなわち、EMT の指標として、E-cadherin 細胞膜発現の減弱、beta-catenin の細胞質あるいは核内移行、

MMP-7 発現増強、細胞質内 vimentin 発現誘導の有無に加え、Snail/Slug や Twist 蛋白発現の推移についても評価する。膵癌培養細胞の Capan-1 と BxPC-3 を用いて、同様の研究を行い、さらには癌細胞における上皮・間葉系移行の情報伝達系と抗癌剤抵抗性獲得の分子メカニズムの解明も行う。

### 6) ヒストン脱アセチル酵素阻害薬およびアンジオテンシン受容体ブロッカーの“がん間質の再構築”ならびに組織内 drug delivery の改善に関する解析 (小動物モデルを用いての研究)

まず、ヒストン脱アセチル酵素阻害剤の線維化抑制作用の有無をみるため、BALB/c ノードマウス (8 週齢) に対し、四塩化炭素 200  $\mu$  L/kg を週 2 回 4 週間にわたって腹腔内投与することで肝線維化モデル (慢性肝障害モデル) を作製して、その効果を検討する。肝組織をシリウス・レッド染色して組織中の線維化部位を染色し、肝線維化面積比 (組織中に占める線維化部位の割合) を定量することで、肝線維化抑制作用を評価す。ついで、Capan-1 膵癌培養細胞 (皮下移植腫瘍でも、癌間質成分の多い腫瘍を形成する) の皮下移植腫瘍モデルを用いて、ヒストン脱アセチル酵素阻害剤ならびにアンジオテンシン受容体ブロッカーの腫瘍内間質の線維化の程度を評価する。また、抗癌剤投与での組織内移行を組織中の抗癌剤濃度を測定して検討する。

## 4. 研究成果

平成 22 年度の研究においては ICC と HCC を比較することにより、トリプシンの受容体である protease activated receptor 2 (PAR-2) およびアンジオテンシン II (AngII) の特異的受容体 AT-1 が ICC 組織において癌細胞および線維芽細胞に認められること、癌組織の線維化や癌細胞の浸潤・増殖に肝星細胞 (伊東細胞) が重要な役割を担うこと明らかとなった。また、ICC・肝星細胞株に AT-1 発現を認め、AngII 添加により ICC・肝星細胞の増殖能、肝星細胞の活性化亢進を認め、ARB 添加によりそれらの反応は抑制された。

これらの結果より ICC 組織において局所 AngII 産生系は、腫瘍細胞の増殖と癌間質の線維化に相乗効果をもたらすと考えられ、ARB には AT-1 が発現する腫瘍に対する抗腫瘍・抗線維化効果がある可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕 (計 6 件)

1. Tajima H, Ohta T, Shinbashi H, et al. Successful treatment of unresectable gallbladder cancer with low-dose paclitaxel as palliative chemotherapy

after failure of gemcitabine and oral S-1: A case report. *Oncology Letters* 4, 2012, 1281-1284, 査読あり.

Doi: 10.3892/ol.2012.909

2. Okamoto K, Tajima H, Nakanuma S, et al. Angiotensin II enhances epithelial-to-mesenchymal transition through the interaction between activated hepatic stellate cells and the stromal cell-derived factor-1 /CXCR4 axis in intrahepatic cholangiocarcinoma.

*International Journal of Oncology* 41, 573-582, 2012, 査読あり.

Doi: 10.3892/ijo.2012.1499. Epub 2012 May 29.

3. Watanabe T, Tajima H, Hayashi H, et al. Sodium valproate blocks the transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 autocrine loop and attenuates the TGF- $\beta$ 1-induced collagen synthesis in a human hepatic stellate cell line. *International Journal of Molecular Medicine*, 28, 2011, 919 - 925, 査読あり. Doi: 10.3892/ijmm.2011.768.

4. Nakanuma S, Tajima H, Ohta T, et al. Tumor-derived trypsin enhances proliferation of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by activating protease-activated receptor-2.

*International Journal of Oncology*, 36, 2010, 793-800, 査読あり. Doi:

10.3892/ijo\_00000555

5. 岡本浩一, 田島秀浩, 太田哲生 ほか, 肝内胆管癌の増殖・線維化におけるレニン・アンギオテンシン系非依存性アンギオテンシン II 産生系の役割. *癌と化学療法*, 37, 2010, 2231-2233, 査読あり.

<http://www.pieronline.jp/content/serial/0385-0684>

6. Okamoto K, Tajima H, Ohta T, et al. Angiotensin II induces tumor progression and fibrosis in intrahepatic cholangiocarcinoma through an interaction with hepatic stellate cells.

*International Journal of Oncology*, 37, 2010, 1251-1259, 査読あり.

Doi: 10.3892/ijo\_00000776

#### [学会発表] (計4件)

1. 廣瀬淳史, Low-dose paclitaxel inhibits the induction of EMT in a human cholangiocarcinoma cell line, CCKS-1, 第21回 日本癌転移学会, 2012年7月12日, ホ

テルオリエンタル広島 (広島県).

2. 渡邊 利史, ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の膵線維化治療薬としての可能性.

日本膵臓学会大会, 2011年7月30日, ホテルニューキャッスル (青森県).

3. 岡本浩一, 胆管細胞癌の浸潤・転移・線維化におけるレニン・アンギオテンシン系非依存性アンギオテンシン II 産生系の役割: Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) との関与. 第31回 癌免疫外科研究会, 2010年5月20日, ホテルニューオータニ大阪 (大阪市).

4. 中沼伸一, 癌境界部でみた肝内胆管癌における肝星細胞の関与と腫瘍由来トリプシンによる肝星細胞活性化についての検討. 第14回 日本肝臓学会大会, 2010年10月14日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

太田 哲生 (OHTA TETSUO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 40194170

##### (2) 研究分担者

北川 裕久 (KITAGAWA HIROHISA)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号: 80272970

田島 秀浩 (TAJIMA HIDEHIRO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 00436825