

令和元年6月20日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10562

研究課題名(和文)肝転移抑制を目指した癌細胞接着・浸潤メカニズムの解明と予防法の開発研究

研究課題名(英文) Clarification of the mechanisms of cancer cell attachment and infiltration to suppress liver metastasis, and development of its prophylaxis.

研究代表者

近藤 匡 (kondo, tadashi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00375495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：類洞内で癌細胞と血小板が同部位に膠着していることを確認した。しかし、類洞環境変化が血小板の類洞膠着によるものか、生体顕微鏡の熱によるものかの検証は困難と判断された。血小板の類洞内環境に対する影響を詳細に解明するため、大量肝切除モデルで類洞内血小板が肝細胞と非実質細胞に与える影響を分子生物学的に評価した。トロンボポエチンにより血小板が増加すると、類洞内皮細胞やクッパ細胞から分泌されるTNF- α とIL-6の発現が増加し、下流シグナルが活性化した。また、HGF発現量も増加し、抗アポトーシス効果が働くことも明らかとなった。本結果をコントロールとして、肝転移モデルを確立後に、比較検討を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、癌転移の起こるメカニズムを癌細胞と肝に存在する肝細胞や非実質細胞との接着や浸潤の観点から解明することである。肝血管内で癌細胞が血小板に膠着していることを確認したが、癌転移モデルの確立が難しく、その理由を明らかにできなかった。そこで、血小板の血管内の環境に対する影響を解明する必要があると考え、よく使用される大量肝切除モデルで検討した。トロンボポエチンにより血小板が増加すると、肝非実質から分泌される炎症性サイトカインの発現が増加し、下流シグナルも活性化した。また、抗アポトーシス効果を示すHGFの発現も増加した。肝転移モデルを確立後に、本結果と比較検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We clarified that platelets and cancer cells are located at the same place in the sinusoidal space. However, it was difficult to judge if this changes of the sinusoidal environment was secondary to platelet attachment to the sinusoid or the heat from the intravital microscope. In order to elucidate this mechanisms, we decided to use mass hepatectomized model, and assess the impact of platelets on parenchymal cell and non-parenchymal cells in the sinusoidal space. TNF- α and IL-6 levels in the liver, which are mainly released by liver sinusoidal epithelial cells and Kupffer cells, were found to increase under thrombocytotic condition after thrombopoietin administration, with activation of their downstream signals. Further, HGF level increased under thrombocytotic condition, which have anti-apoptotic effect on hepatocytes. Based on these results, we are planning to compare these effects after establishing liver metastasis model.

研究分野：肝臓

キーワード：肝転移 血小板 癌細胞 膠着 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝転移は進行大腸癌において高率に発生し、その後の直接死因となることが多い。手術・治療・化学療法の進歩にもかかわらず肝転移の制御は困難であるため、転移そのものを予防するための研究が国内外ですすめられている。肝転移のプロセスのなかでもっとも重要な肝類洞における癌接着は1990年代から細胞同士の接着や、細胞と細胞外マトリクスの接着に関する研究が広く行われ、細胞接着性ペプチドやキチン誘導体による「細胞接着制御による転移制御」が試みられたが予想された臨床効果は得られなかった。その後の研究からは、癌接着は接着分子だけに依存するのではなく、血管径、流速、内皮の活性化などの微小血流環境の関与が報告されるようになった。さらに近年クッパー細胞の関与する類洞内炎症反応が癌細胞の接着や浸潤を促進することが明らかとなり、癌細胞とクッパー細胞の相互作用や類洞内の細胞動態が注目されるようになってきた。癌転移予防のためには接着のメカニズムの解明が必要だが、リアルタイムでそれらの細胞動態を視覚化した報告はこれまでになかった。

2. 研究の目的

現在までの当研究室の研究では、肝転移モデルにおいて、投与された癌細胞は類洞径の変化などの要因で直後から類洞に接着するが、その多くはクッパー細胞に捕捉されるか、または類洞から剥離され血流中に還る。そこで「クッパー細胞から免れた癌細胞が類洞にとどまることを妨げる」、または「クッパー細胞が効率的に癌細胞を捕捉する」ことができれば、肝転移を制御できる可能性がある。

近年、癌細胞と血小板との相互作用が”fatal interplay”として癌転移を促進させるという報告がある。凝集した血小板は癌細胞の接着を安定させて浸潤の足がかりとなる可能性が示されているが、実際にどのように凝集するのか、部位、個数、類洞血流との関係など可視化した報告はまだない。そこで以下のテーマを目的とし研究を行うこととした。1)類洞内における癌細胞と血小板の相互作用を解析する。2)血小板凝集を足がかりとした肝組織内への浸潤様式を評価する。3)血小板凝集を抑制することによりこれら癌接着・浸潤の防止効果を判定する。

3. 研究の方法

(1)肝転移モデル

Fischer 344 ラット雄、200～250 g に頸動脈カテーテルを留置し、ラット大腸癌細胞株である RCN-H4 を 5×10^6 個投与した。

(2)腫瘍細胞の染色

ラット大腸癌細胞株 RCN-H4 を培養し、以前の研究では Rhodamine-6G を用いて染色していたが、腫瘍細胞と血小板を整体蛍光顕微鏡下での観察において区別するため、NBD-C12-HPC を用いて染色した。また蛍光染色による影響を検討するため、異なる濃度の NBD-C12-HPC (0.5mg, 1.0mg, 1.5mg, 2mg) で染色し、大腸癌細胞株の生存率を確認した。

(3)血小板の染色

F344 ラットより血液を採取する。ラット血液 1ml に対して PBS 200 μ l と PGE1(0.02mg/ml)15 μ l を混和し Rhodamine-6G(0.05%)50 μ l を加え遠心分離する。血小板数を計測して 10^6 個/ml に調整した。

(4)生体蛍光顕微鏡観察

ラットを麻酔下に気管切開を行い人工呼吸器管理として、左頸動脈と左頸静脈にカテーテルを留置した。開腹を行い、肝左葉を脱転しステージで肝臓を固定した。腫瘍細胞は 60 秒かけて

頸動脈から投与した。その後、染色した血小板を投与し、肝微小循環の観察を行った。

4. 研究成果

RCN H4 5×10^6 個を NBD-C₁₂-HPC (0.5mg, 1.0mg, 1.5mg, 2.0mg) で 30 分培養し細胞の生存率を測定し下記の結果を得た。

NBD-C₁₂-HPC 0.5mg: 98%

NBD-C₁₂-HPC 1.0mg: 97%

NBD-C₁₂-HPC 1.5mg: 99%

NBD-C₁₂-HPC 2.0mg: 97%

NBD-C₁₂-HPC の濃度が高くても、RCN H4 の生存率に差は認めなかった。

上記濃度で染色した RCN H4 を生体蛍光顕微鏡で観察すると RCN H4 の蛍光は遮光フィルター2枚使用すると観察できず、1枚ならば観察可能であった。

そのため、NBD-C₁₂-HPC(1.0mg, 2.0mg) で染色した RCN H4 を用いてラット生体内で観察可能か検討した。しかしながら RCN H4 の蛍光量が低く生体内で検討するのが困難であった。腫瘍細胞を観察するため光量を上げると、熱により類洞血流が低下した。

また、Rhodamine6G で染色したラット血小板を投与し、腫瘍細胞との相互作用が観察可能か検討したが、腫瘍細胞の同定に難渋し、十分な観察はできなかった(図1)。しかしながら1箇所

図1

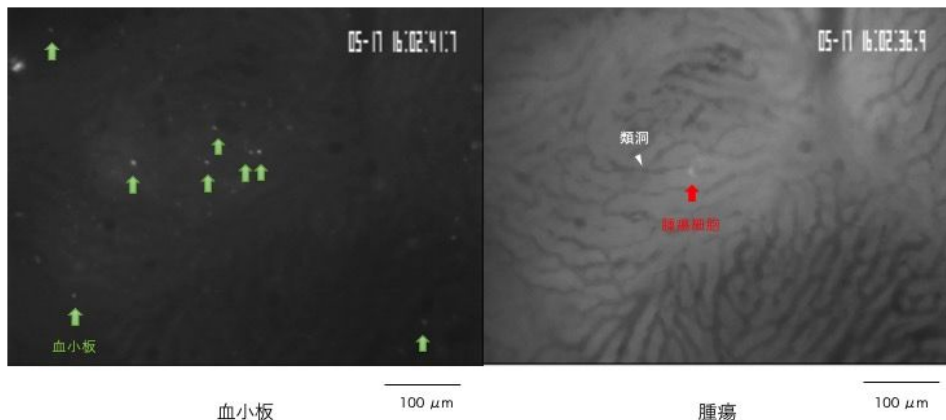
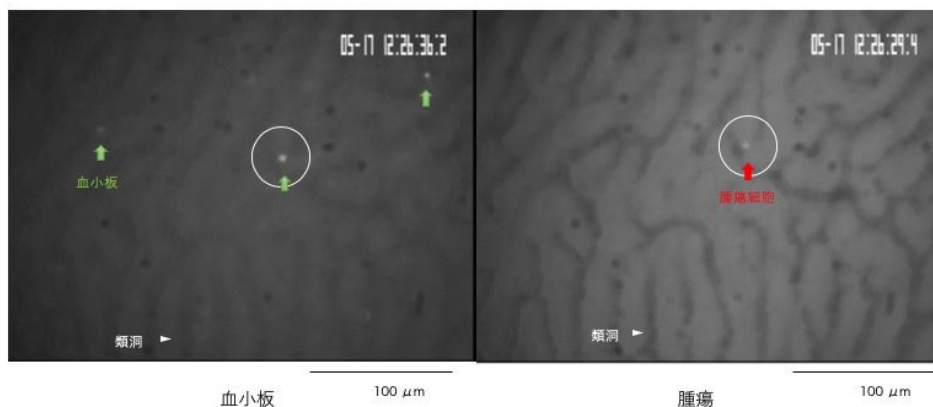


図2



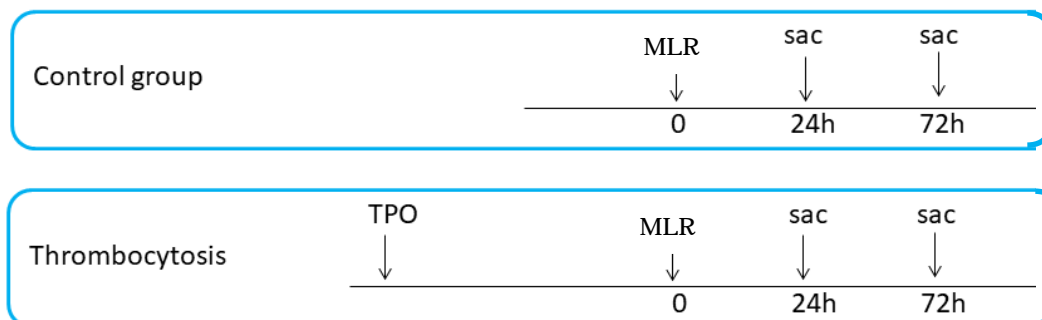
以上で、類洞内で癌細胞と血小板が同部位に膠着していることは確認できた。しかしながら、血小板が類洞に膠着することで類洞環境が変化を起し、癌細胞が同部位に膠着したのか、あ

るいは、生体蛍光顕微鏡の熱により類洞環境が変化を起し、その部位に血小板・腫瘍細胞が膠着したのか、本モデルの検証は困難であると判断された。従って、本研究を進めるにあたりまず、血小板における類洞内環境の影響をより詳細に解明する必要があると考えた。

類洞環境評価モデルとしてよく使用される大量肝切除モデルを使用し、類洞内における血小板が類洞内皮細胞、クッパー細胞および肝細胞に与える影響について、サイトカインやシグナル伝達系などを分子生物学視点から評価した。

そこで、本研究ではラットを動物モデルとして、トロンボポエチン（以下、TPO）で血小板を増多した群と、生食を投与したコントロール群に分け、70%の大量肝切除を行い、術後 24 時間、72 時間後における残肝の IL6, TNF α 、HGF の発現量を比較し、併せて下位のシグナル伝達系を比較した。

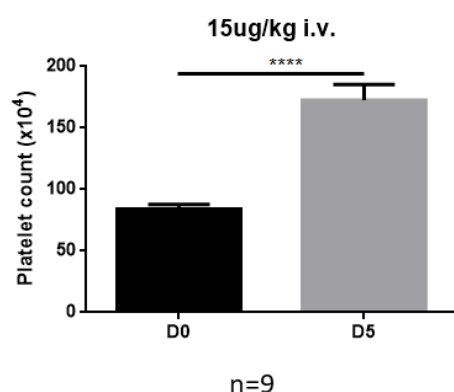
図 3 群分け



* MLR, massive liver resection;; sac, 犠死

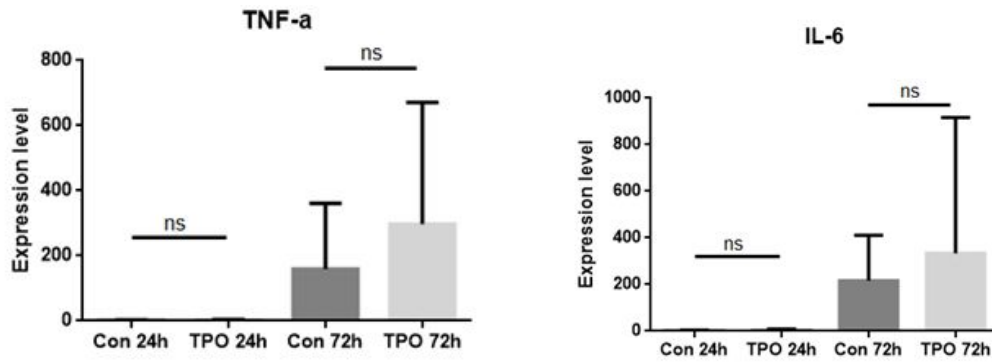
TPO 投与後 5 日目の血小板数の推移を図 2 に示す。TPO 投与により、末梢血血小板数は約 1.5-2 倍の増加を認めた(図 4)。

図 4. TPO 投与前後の血小板数の推移（各 n=9）



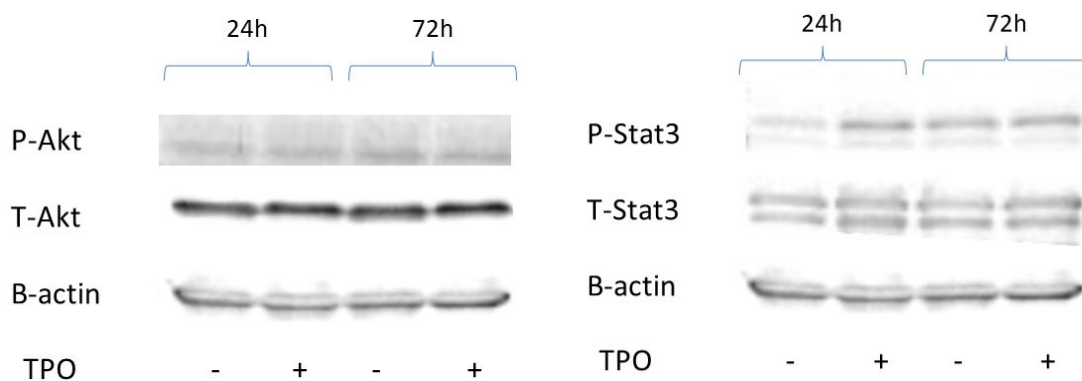
IL6 および TNF-a は Kupffer 細胞および類洞内皮細胞から産生されることが知られている。TPO 群とコントロール群の術後の TNF-a および IL6 を比較することで間接的に血小板の Kupffer 細胞および類洞内皮細胞の効果についての比較ができる。図 5 に示すように RT-PCR による m-RNA の発現量は術後 24 および 72 時間で有意差は認めなかったが、72 時間で TNF-a および IL6 は TPO 群でやや高くなる傾向を認めた。

図 5. TPO 群およびコントロール群における TNF-a および IL-6 の比較(RT-PCR)（各 n=4）



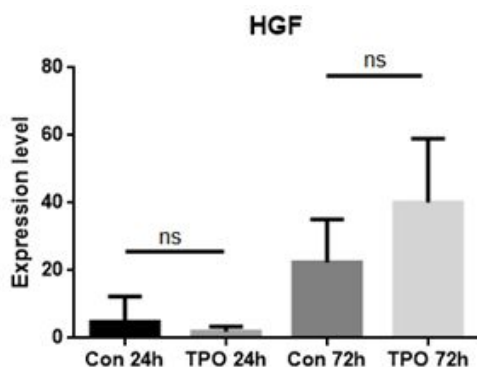
TNF-a および IL-6 の下流シグナルである AKT および STAT3 に対する効果についての比較を行った。Akt のリン酸化は術後 24 時間および 72 時間で有意差を認めなかったが、STAT-3 のリン酸化は術後 24 時間で TPO 群で有意にリン酸化が高い結果となった(図 6)。

図 6. STAT3 および AKT の発現変化



HGF も Kupffer 細胞が主な産生細胞であることが知られている。コントロール群と TPO 群で術後 24 時間および 72 時間で HGF 産生量に有意差を認めなかったが、術後 72 時間で TPO 群で HGF 産生が高い傾向を認めた(図 7)。HGF はアポトーシスを促進する caspase3 の発現を抑制することが知られており、肝細胞のアポトーシスの抑制機構が働いていることが推測された。

図 7. HGF 発現量(各 n=4)



腫瘍細胞、血小板を染めるのに適した蛍光を検討する必要があると考えられた。また、特に、腫瘍細胞を観察するための光量で類洞が熱損傷を受けるため、観察部位の冷却方法を考える必要があった。しかしながら、1 箇所ながら腫瘍細胞と血小板が類洞の同部位に膠着している部位を認めた。血小板と腫瘍細胞が膠着している可能性が示唆された。

TPO 投与により血小板が増加すると、肝類洞内皮細胞やクッパ 細胞から分泌される TNF-a および IL-6 の発現が増加し、その下流シグナル伝達系が活性化することが明らかとなった。また同時に、クッパ 細胞から分泌される HGF 発現量も増加し、抗アポトーシス効果が働くこと

も明らかとなった。本結果をコントロールとして、肝転移モデルを確立後に、両者の比較検討を行う予定である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔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

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田村孝史

ローマ字氏名： Tamura Takafumi

所属研究機関名：筑波大学

部局名： 医学医療系

職名：研究員

研究者番号(8桁): 20633192

研究分担者氏名：大河内信弘

ローマ字氏名： Ohkohchi Nobuhiro

所属研究機関名：筑波大学

部局名： 医学医療系

職名：客員教授

研究者番号(8桁): 40213673

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松村英樹

ローマ字氏名： Matsumura Hideki

研究協力者氏名：高橋一広

ローマ字氏名： Takahashi Kazuhiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。