

平成 2 6 年 6 月 1 8 日現在

機関番号 : 3 1 2 0 1

研究種目 : 基盤研究(C)

研究期間 : 2011 ~ 2013

課題番号 : 2 3 5 9 0 4 3 1

研究課題名 (和文) H G F 誘導型上皮－間葉系移行に対する微小管過アセチル化状態の影響に関する研究

研究課題名 (英文) Analysis for acetylation status of microtubules in epithelial mesenchymal transition induced by HGF/MET stimulation

研究代表者

増田 友之 (Masuda, Tomoyuki)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 1 0 1 9 9 6 9 8

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,700,000 円、(間接経費) 1,110,000 円

研究成果の概要 (和文) : 肝癌培養細胞株あるいはヒト肝細胞癌に於いて、HGF/MET刺激誘導型のEMT現象に関して微小管過アセチル化がどのような影響を与えるか、HDAC6/NACC1発現抑制系を使用して検討した。HDAC6の発現抑制は細胞増殖能、運動能を低下させた。HDAC6の過剰発現の見られる肝癌では肝内転移が高頻度に認められた。さらにHDAC6の発現抑制はHGF刺激によるERK1/2の核内移行を抑制することでEMTの抑制果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : The aim of this study was to investigate the significance of HDAC6 in the invasion and metastasis activities of hepatocellular carcinoma (HCC). And we also examined the effect on epithelial mesenchymal transition induced by HGF/MET system. HDAC6 expression was greater in all of the HCC cell lines compared to the primary cultures of hepatocytes. Knockdown of HDAC6 markedly downregulated the migration and invasion activities of all HCC cell lines ($P < 0.05$). Overexpression of HDAC6 protein to a level higher than that in the corresponding normal hepatocytes was observed in 14 (20%) of the 70 primary HCCs, and was significantly correlated with high clinical stage, number of tumors, vascular invasion and intrahepatic metastasis ($P < 0.05$). Downregulation of HDAC6 inhibited ERK1/2 translocation to the nucleus. These results suggest that overexpression of the HDAC6 protein is involved in EMT of HCC cells.

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 靱帯病理学・分子病理学

キーワード : 肝癌 HDAC6 アセチル化 微小管 EMT

1. 研究開始当初の背景

上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) は上皮系細胞が間葉系細胞に形態変換する現象であり、細胞接着装置の緩み、細胞外基質分解酵素 (metalloproteinase: MMP) の過剰発現や、細胞運動の亢進をきたし、がん細胞では浸潤/転移能の獲得に寄与している。EMT 関連分子はがんの浸潤転移抑制の観点から格好の治療標的分子となり得る。HGF (hepatocyte growth factor) は、TGF- β (transforming growth factor) とならび EMT を誘導する増殖因子である。HGF はその受容体である MET (hepatocyte growth factor) に結合し、RAS-RAF-MEK-ERK1/2 と順次シグナルが伝達され、Snail、Slug、Twist、Est-1 などの核内転写因子の作用を介して、E-cadherin の発現抑制や、マトリックス分解酵素の過剰発現を誘導し EMT を引き起こす。また HGF によって活性化した ERK および Src は、細胞接着 (Focal adhesion; FA) に於いて focal adhesion kinase (FAK) を活性化させ、FA 形成-崩壊の turnover rate を上げ、細胞の運動能を加速させることが知られている。さらに、HGF によって活性化した ERK および Src は、低分子 G 蛋白である RAC を活性化させ、細胞の辺縁でのラメリボディアの形成に寄与することで、アクチンフィラメントによる細胞運動の推進力となっている。

HGF/MET は、がん治療戦略に於いて格好の EMT 抑制標的分子であり、既に生物製剤の開発も進んでいる。しかし、これまでの EMT 現象に関連する細胞骨格分子の研究では、actin や中間径 filament に関するもの多く、微小管はあまり注目されてこなかった。

本研究では、HGF/MET 誘導型の EMT 現象に関連して生じる肝細胞癌の EMT 現象に関して、HDAC6-NACC1 の微小管アセチル化系に注目した研究を展開する。

2. 研究の目的

本申請課題では、HGF/MET 刺激誘導型の EMT 現象に対して、微小管過アセチル化がどのような影響を与えるか、MET のリン酸化状態、

下流シグナル分子 (ERK1/2、RAC1) への影響、細胞機能形態 (細胞運動/浸潤能/増殖能) に関して検証し、その分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、肝癌培養細胞株を用いて HGF 刺激ならびに HDAC6 の発現抑制による下流のシグナル分子の動態を生化学的手法およ

び免疫組織学的手法を用いて解析した。

ヒト肝癌培養細胞 3 株 (HLF, PLC/PRF/5, Hep3B) とヒト正常肝細胞 2 株 (Hc-cells, WRL-68) について HDAC6 の発現を定量 PCR 法、Western blot 法で評価した。siRNA (Life Technologies, Co. Ltd.) 処理を行い、cell scratch assay にて HDAC6 発現抑制下の細胞運動能を評価した。浸潤能については Matrigel invasion assay にて評価した。

また、2006 年 8 月から 2011 年 10 月まで、岩手医科大学外科学講座において肝細胞癌の診断で肝切除術を施行した 70 症例に関して HDAC6 の発現を Ventana 社製の自動免疫染色装置を用い labeled streptavidin-biotin 法にて染色し、臨床病理学的事項との相関を検討した。

有意差の判定には、Mann-Whitney U test, Fisher's exact probability test, Kruskal-Wallis test を用いた。全ての検定で、危険率が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

4. 研究成果

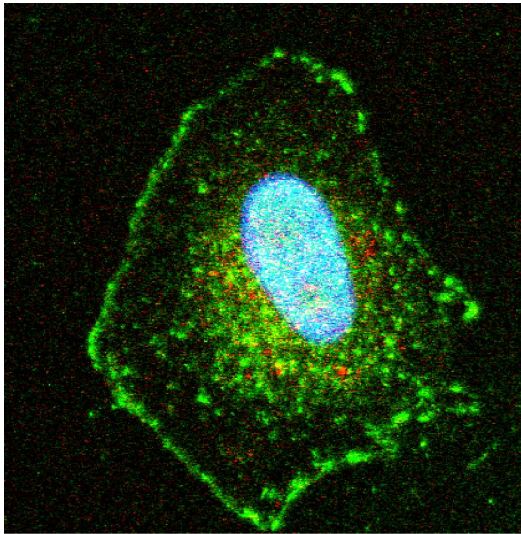
(1) HDAC6 の mRNA/蛋白質の発現量は細胞株間でばらつきが認められたが、正常肝細胞に比較して肝細胞癌株で過剰発現していた。siRNA 処理による HDAC6 の発現抑制は肝細胞癌株 3 株全てで細胞運動能を低下させた ($p < 0.05$)。

(2) HDAC6 の発現抑制は全ての肝細胞癌株の浸潤能を有意に低下させた ($p < 0.05$)。

(3) HDAC6 は細胞質に陽性で正常肝細胞でも発現が認められた。正常肝細胞より発現の強い肝癌は 14 例 (14/70, 20%)、肝細胞と同等の発現強度が 35 例 (35/70, 50%)、肝細胞より強度の弱い症例が 21 例 (21/70, 30%) であった。

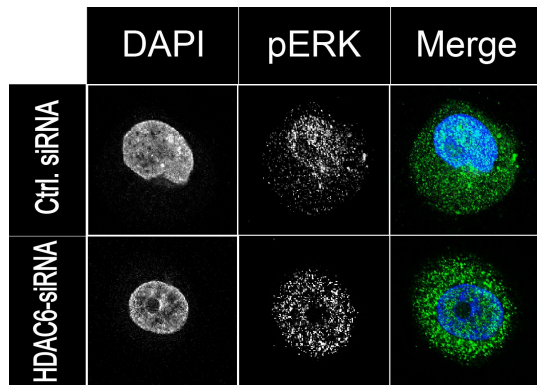
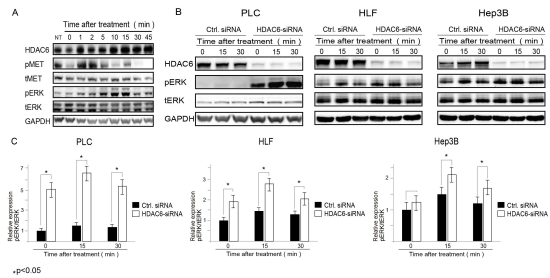
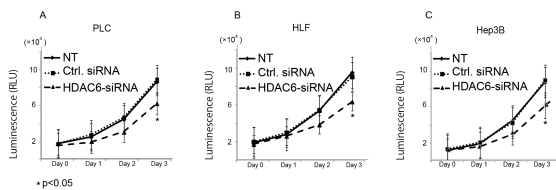
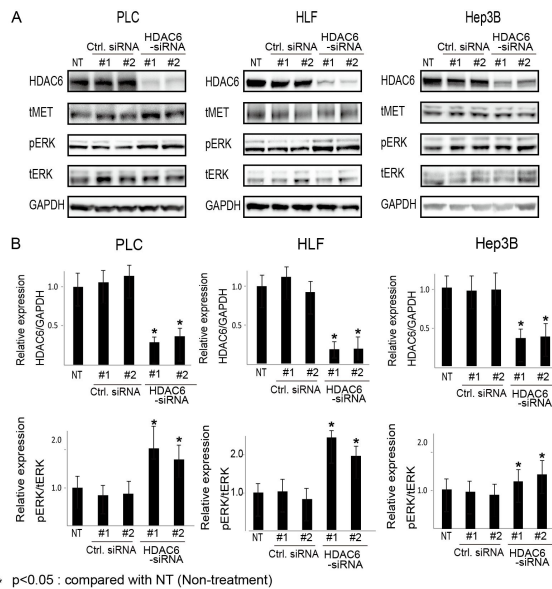
(3) 免疫染色結果と臨床病理学的事項との比較では、正常肝細胞に比較して HDAC6 の過剰発現を認めた症例 14 例では、残りの 56 例に比較して進行例が多く、腫瘍数/脈管侵襲/肝内転移が高頻度に認められた ($p < 0.05$)。

(5) HDAC6-NACC1 システムの発現抑制は、MET の細胞膜への凝集を誘導し自己リン酸化を促した。



(6) HDAC6 発現抑制下では、HGF 刺激により細胞増殖能が抑制された。

(7) この状態では MET の自己リン酸化は亢進していたものの ERK1/2 の核内移行が阻害されており細胞増殖能の低下の原因となると考えられた。



以上の結果より、HDAC6 の発現抑制下において、MET の細胞内局在が変化し細胞膜での発現の増強を認めるものの、微小管の過アセチル化により ERK1/2 の核内移行は極端に抑制され細胞増殖に影響を与える事が明らかとなった。HDAC6 の過剰発現は HGF/MET 誘導型の EMT に関して促進的に作用することが明らかとなった。

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 8 件)

1. Miura S, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Kasai S, Tsunoda K, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T. Immunohistochemistry for histone h3 lysine 9 methyltransferase and demethylase proteins in human melanomas. Am J Dermatopathol. 2014 Mar;36(3):211-6. doi: 10.1097/DAD.0b013e3182964e02.
2. Oikawa H, Maesawa C, Tatemichi Y, Nishinari Y, Nishiya M, Mizugai H, Ikeda A, Oikawa K, Takikawa Y, Masuda T. A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates epidermal growth

- factor receptor transactivation by angiotensin II on hepatic stellate cells. *Life Sci.* 2014 Mar 3;97(2):137-44. doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.028.
3. Sakurai E, Satoh T, Akiko YA, Maesawa C, Tsunoda K, Endo M, Akasaka T, Masuda T. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (SPTCL) with hemophagocytosis (HPS): successful treatment using high-dose chemotherapy (BFM-NHL & ALL-90) and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Exp Hematop.* 2013;53(2):135-40. PubMed PMID: 23995110.
4. Miura S, Shibazaki M, Kasai S, Yasuhira S, Watanabe A, Inoue T, Kageshita Y, Tsunoda K, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. A somatic mutation of the KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. *J Invest Dermatol.* 2014 Feb;134(2):553-6. doi: 10.1038/jid.2013.343.
5. Watanabe A, Yasuhira S, Inoue T, Kasai S, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. BCL2 and BCLxL are key determinants of resistance to antitubulin chemotherapeutics in melanoma cells. *Exp Dermatol.* 2013 Aug;22(8):518-23. doi: 10.1111/exd.12185.
6. Nakayama I, Shibazaki M, Yashima-Abo A, Miura F, Sugiyama T, Masuda T, Maesawa C. Loss of H0XD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells. *Int J Oncol.* 2013 Jul;43(1):63-71. doi: 10.3892/ijo.2013.1935.
7. Kanno K, Kanno S, Nitta H, Uesugi N, Sugai T, Masuda T, Wakabayashi G, Maesawa C. Overexpression of histone deacetylase 6 contributes to accelerated migration and invasion activity of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2012 Sep;28(3):867-73. doi: 10.3892/or.2012.1898.

8. Ishikawa Y, Tsunoda K, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. Downregulation of cylindromatosis gene, CYLD, confers a growth advantage on malignant melanoma cells while negatively regulating their migration activity. *Int J Oncol.* 2012 Jul;41(1):53-60. doi: 10.3892/ijo.2012.1424.

〔学会発表〕(計0件)

〔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
増田友之(岩手医科大学・医学部・教授)

研究者番号：10199698

(2)研究分担者
柴崎 晶彦(岩手医科大学・医学部・助教)

研究者番号：20445109

前沢 千早(岩手医科大学・医学部・教授)

研究者番号：10326647

(3)連携研究者
()

研究者番号：