

## 肝内胆管癌の増殖・繊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

著者	岡本 浩一, 田島 秀浩, 太田 哲生, 中沼 伸一, 林 泰寛, 中川原 寿俊, 大西 一朗, 高村 博之, 北川 裕久, 伏田 幸夫, 谷 卓, 藤村 隆, 萱原 正都
雑誌名	癌と化学療法 = Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy
巻号	37 12
ページ	2213-2233
発行年	2010-10-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/32484">http://hdl.handle.net/2297/32484</a>

## 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

岡本 浩一 田島 秀浩 太田 哲生 中沼 伸一 林 泰寛  
中川原寿俊 大西 一朗 高村 博之 北川 裕久 伏田 幸夫  
谷 卓 藤村 隆 萱原 正都\*

[*Jpn J Cancer Chemother* 37(12): 2231-2233, November, 2010]

The Role of Renin-Angiotensin System Independent Angiotensin II Production in Progression and Fibrosis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Koichi Okamoto, Hidehiro Tajima, Tetsuo Ohta, Shinichi Nakanuma, Hironori Hayashi, Hisatoshi Nakagawara, Ichiro Ohnishi, Hiroyuki Takamura, Hirohisa Kitagawa, Sachio Fushida, Takashi Tani, Takashi Fujimura and Masato Kayahara (Dept. of Gastroenterological Surgery, Kanazawa University)

### Summary

Angiotensin II (Ang II) plays an important role in stromal fibrosis and tumor progression in cancer tissues. Now we investigated the role of Ang II in the cross-interaction between intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) cells and hepatic stellate cells (HSCs). The concentrations of Ang II in ICC tissues were significantly higher than those of hepatocellular carcinoma and normal liver. The expression of Ang II type 1 receptor (AT-1) in ICC specimens, two ICC cell lines, and HSC cell line, LI-90 was demonstrated by immunostain and Western blot. The proliferative activity of ICC cells and HSCs added Ang II dose-dependently increased and telmisartan inhibited the proliferative effects in MTT assay. HSCs added Ang II showed a higher expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) compared with control cells. Telmisartan also inhibited the activation of HSCs added Ang II. Ang II in ICC tissues may play a pivotal role in tumor growth and stromal fibrosis and Ang II receptor blocker will be a potential therapy in cancer tissue expressing AT-1. **Key words:** Intrahepatic cholangiocarcinoma, Angiotensin II, Hepatic stellate cell

**要旨** 肝内胆管癌 (ICC) 組織においては、癌細胞と肝星細胞 (HSC) との相互作用が癌間質の線維化や細胞の増殖能亢進に関与していると考えられる。そこで今回、癌間質で産生されるアンギオテンシン II (Ang II) とその特異的受容体 AT-1 受容体の関与について検討した。ICC 組織中 Ang II 含量は正常肝や癌間質の少ない肝細胞癌と比較して有意に高値であった。ICC, HSC 細胞株に AT-1 発現を認め、Ang II 添加により ICC, HSC の増殖能, HSC の活性化の亢進を認め、Ang II 受容体拮抗薬 (angiotensin II receptor blocker: ARB) 添加によりそれらの反応は抑制された。ICC 組織において局所 Ang II 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。

### はじめに

われわれは、膵癌組織において癌間質の弱酸性環境下における腫瘍由来トリプシンを介したレニン・アンギオテンシン系 (RAS) 非依存性アンギオテンシン II (Ang II) 産生系と、特異的受容体である Ang II 1 型受容体 (AT-1) が腫瘍細胞の増殖や腫瘍の血行動態、微小環境に与える影響について報告してきた<sup>1,2)</sup>。

本研究では、膵癌やスキルス胃癌と並んで癌間質の豊富な肝内胆管癌 (ICC) 組織において、Ang II を介した

癌細胞と肝星細胞 (HSC) との相互作用が癌組織の線維化や細胞の増殖に与える影響について検討し、また同時に Ang II 受容体拮抗薬 (angiotensin II receptor blocker: ARB) によるそれらの抑制効果について検討した。

### I. 材料ならびに方法

#### 1. Ang II 含量測定

外科的切除された 10 例の凍結 ICC 組織、対照として 11 例の肝細胞癌組織、5 例の正常肝組織をホモジネート後にフロリジル法で Ang II を吸着し、その後 RIA 法に

\* 金沢大学・消化器・乳腺・移植再生外科

て組織含量を測定した。

## 2. AT-1 蛋白発現の検討

外科的切除された ICC 組織ならびに 2 種類のヒト ICC 細胞株, HuCCT-1 と CCKS-1, ヒト HSC 細胞株 LI-90 を用いて, AT-1 蛋白の組織内・細胞内発現を免疫染色, Western blot 法にて評価した。

## 3. 細胞増殖試験

Ang II 刺激による ICC および HSC の増殖効果を MTT assay にて検討した。HuCCT-1, LI-90 を播種したプレートに 0.1~100 nM の濃度の Ang II 試薬, もしくは 10 ng/mL の transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 を加えて評価し, Ang II による増殖能亢進の抑制に ARB である telmisartan を 1,000 nM で使用した。

## 4. 蛍光細胞免疫染色

活性化 HSC, もしくは筋線維芽細胞の特異的マーカー

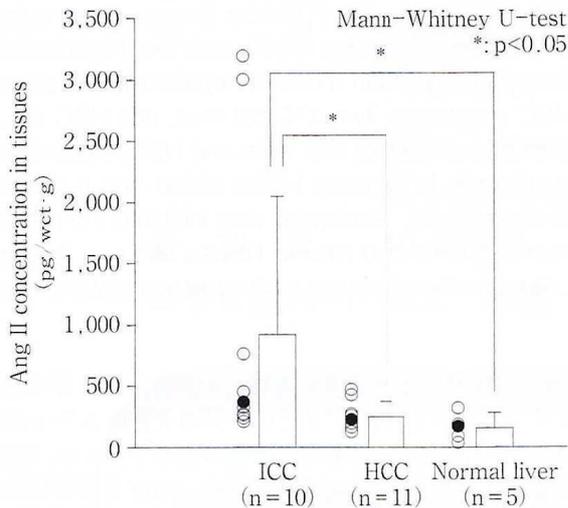


Fig. 1 Ang II concentrations in ICC tissues were significantly higher than those of HCC and normal liver.

である  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 抗体を用いて, LI-90 の Ang II, TGF- $\beta$ 1 添加による活性化を評価した。Ang II による活性化の抑制効果を 1,000 nM の telmisartan を使用して評価した。

## II. 結 果

ICC 組織中の Ang II 含量は, 正常肝や癌間質の少ない肝細胞癌と比べ, 有意に高値を示した (ICC  $908 \pm 1,167$  pg/wet·g tissue, 肝細胞癌  $244 \pm 111$  pg/wet·g tissue, 正常肝  $162 \pm 107$  pg/wet·g tissue, Fig. 1)。

ICC 切除標本中の AT-1 発現は癌細胞の細胞膜および細胞質で強く認め, それに加え, 腫瘍間質の血管内皮や平滑筋, 線維芽細胞にも陽性であった (Fig. 2a)。免疫細胞染色においては HuCCT-1, CCKS-1, LI-90 の 3 種の細胞膜および細胞質に AT-1 発現を認め (Fig. 2b~d), Western blot 法でも 3 種とも細胞に AT-1 蛋白の発現を認めた (Fig. 2e)。

HuCCT-1 に Ang II を添加した細胞増殖試験では, Ang II 濃度依存性の有意な増殖亢進を認め, この反応は telmisartan を添加しておくことで抑制された (Fig. 3a)。LI-90 に Ang II, 10 ng/mL の TGF- $\beta$ 1 を加えても同様に濃度依存性の細胞増殖亢進を認め, telmisartan 添加による抑制を認めた (Fig. 3b)。

蛍光細胞免疫染色にて, Ang II, TGF- $\beta$ 1 添加による LI-90 の活性化亢進に伴い,  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の増加を認め, telmisartan 添加により,  $\alpha$ -SMA 陽性細胞数はコントロールレベルにまで抑制された (Fig. 4)。

## III. 考 察

Ang II は, 腫瘍血管を収縮させて癌間質を低酸素環

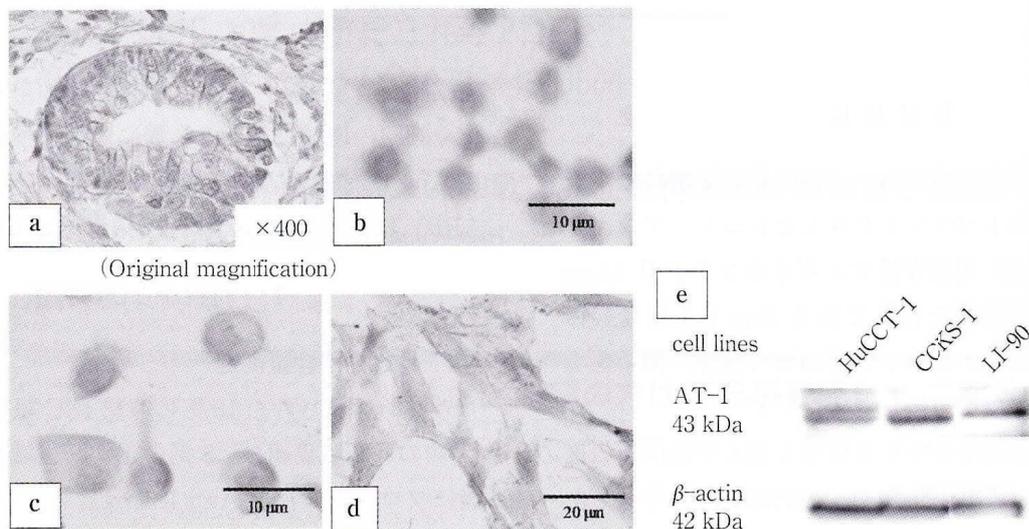
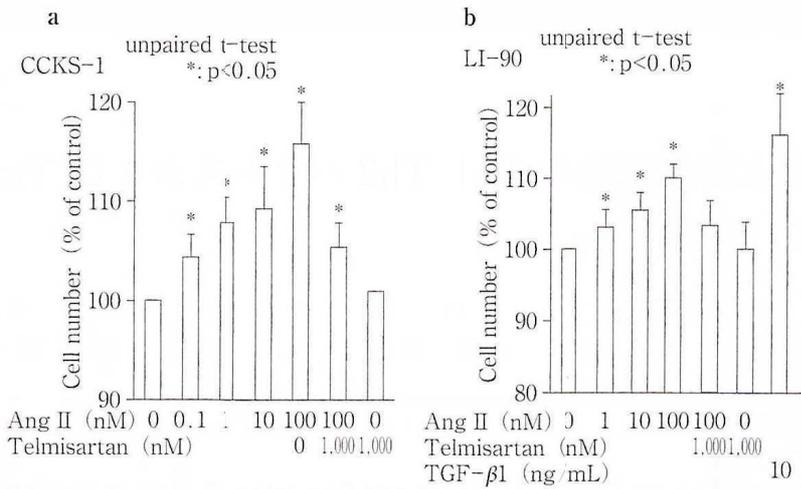
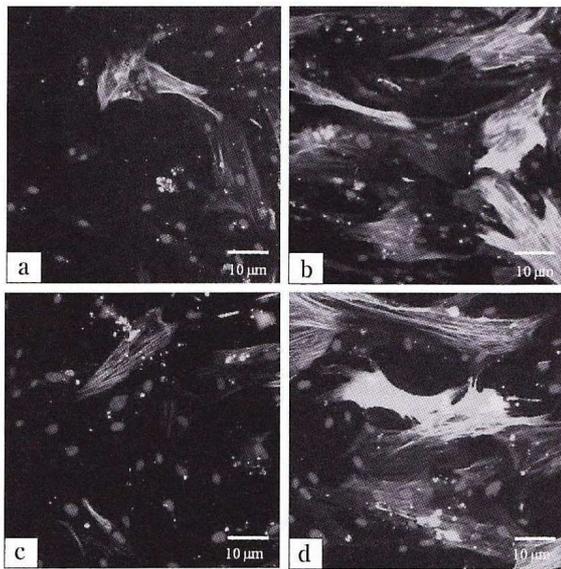


Fig. 2 Expression of AT-1 receptor. Immunostaining was intense in HuCCT-1 (b), CCKS-1 (c), and LI-90 cells (d) cells and was present predominantly in the plasma membrane. In cancer cells, AT-1 immunoreactivity was evident in membranous and granular cytoplasmic patterns (a). Expression of AT-1 protein in HuCCT-1, CCKS-1, and LI-90 cells was evident by Western blot (e).



**Fig. 3** HuCCT-1 cells added Ang II demonstrated significantly dose-dependent increase in proliferative activity. Ang II-induced proliferative response was significantly inhibited by 1,000 nM telmisartan (a). LI-90 cells treated with each concentration of Ang II (1 nM to 100 nM) dose-dependently increased. Telmisartan completely inhibited the 100 nM Ang II-induced proliferative response at a concentration of 1,000 nM (b).



**Fig. 4** Fluorescent immunocytochemistry of Ang II-induced activation and transformation of LI-90 cells (green: α-SMA, blue: nuclei).

When LI-90 cells were added Ang I, the number of α-SMA-positive cells increased (a: control cells, b: 100 nM Ang II treated cells). Telmisartan inhibited the activation of cells (c: Ang II 100 nM + telmisartan 1,000 nM). Addition of 10 ng/mL TGF-β1 also increased the number of α-SMA-positive cells (d).

境として組織の線維化に関与している可能性が示唆され、結果的に抗腫剤の腫瘍への到達を困難にしている。また、癌細胞やHSCに存在するAT-1受容体を介してシグナルを伝達し、癌細胞の浸潤・増殖能の亢進や、HSCの形質転換などを惹起するとともにTGF-β, vascular endothelial growth factor (VEGF)産生を促すことで癌組織の炎症や線維化、免疫寛容などに関与する可能性が示唆される<sup>3,4)</sup>。

実臨床においてもMarfan症候群でARB投与により全身的に亢進したTGF-β産生が抑制され、心血管イベントの発生を予防できることが報告されている<sup>5)</sup>。ARBは種々の増殖因子やサイトカインを抑制することで癌の進行・線維化に対しても抑制的に働く可能性があり、癌間質の微小環境を正常に近づけることで、抗腫瘍効果を発揮する可能性のある治療薬であると期待される。

結 語

ICC組織ではAng II産生が亢進しており、癌細胞とHSC間に腫瘍の進行と癌間質の線維化における相乗効果をもたらすと考えられ、ARBが抗腫瘍および抗線維化に有効な治療手段の一つとなる可能性が示唆された。

本論文の要旨は第31回癌免疫外科研究会において発表した。

文 献

- Ohta T, Amaya K, Yi S, *et al*: Angiotensin converting enzyme-independent, local angiotensin II-generation in human pancreatic ductal cancer tissues. *Int J Oncol* **23**(3):593-598, 2003.
- Amaya K, Ohta T, Kitagawa H, *et al*: Angiotensin II activates MAP kinase and NF-κB through angiotensin II type I receptor in human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* **25**(4): 849-856, 2004.
- Gressner AM and Weiskirchen R: Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-β as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* **10**(1): 76-99, 2006.
- Wynn TA: Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **214**(2): 199-210, 2008.
- Matt P, Schoenhoff F, Habashi J, *et al*: Circulating transforming growth factor-β in Marfan syndrome. *Circulation* **120**(6): 526-532, 2009.