

平成30年 5月22日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09043

研究課題名(和文) 肝内胆管癌におけるIDH変異の生物学的意義の統合的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of IDH mutation in intrahepatic cholangio carcinoma

研究代表者

木暮 宏史 (Kogure, Hirofumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60568921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌の約20%に見出されるIDH1変異について、その生物学的意義を解析することを目的とした。変異型IDH1の発現コンストラクトをmutagenesis法にて作成した。マウス肝内胆管細胞に野生型IDHあるいは変異型を導入し、安定発現株を樹立した。変異IDH1の発現は変異型特異的抗体で、また質量分析計で変異特異的に産生される代謝産物2-HGの増加を確認した。グローバルレベルのゲノムDNAメチル化および各種ヒストンメチル化修飾の違いをドットプロット半定量系とImmunoblotにて評価した。変異型発現細胞ではヒストン修飾に影響がみられた。また増殖能や薬物感受性の違いについて解析した。

研究成果の概要(英文)：Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) is a type of bile duct cancers. The mutations of Isocitrate dehydrogenase (IDH) 1 or 2 gene were identified. IDH is a metabolic enzyme converting isocitrate to alpha-ketoglutarate. The mutations in the catalytic sites of them produce a specific metabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG) from alpha-ketoglutarate. We aimed to address how IDH mutation affects the feature of biliary cells. We transduced the lentiviral vectors expressing human wild-type IDH1 or mutant IDH1 (R132C) into the mouse biliary cells. In the transduced biliary cells, the global levels of histone modification were altered by IDH mutation. In addition, we found that IDH mutation affect the sensitivity of ICC cells to certain anti-cancer drugs.

研究分野：消化器病学

キーワード：胆道癌

## 1. 研究開始当初の背景

胆管癌は5年生存率10%と予後不良な疾患である。根治的切除後の再発例も多く、切除不能例に対する化学療法の効果も乏しい。しかしながらその病態にはまだまだ明らかにすべき点が多い。

近年、次世代シーケンスによって、胆管癌、特に肝内胆管癌において、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) 遺伝子が高頻度に変異していることが明らかとなった。IDHは細胞内 (IDH1) 或はミトコンドリア内 (IDH2) のイソクエン酸を還元しケトグルタル酸 (-KG) を産生する酵素である。細胞内には様々なKG依存性脱水素酵素が存在し、その中にはDNAやヒストンの脱メチル化に働く酵素 (TET, JMJ family) 低酸素下での血管新生・腫瘍増殖に働くHIF1の分解に関係する酵素 (EGLN) などがある。IDH遺伝子に変異が起ると、-KGから新たに2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) が産生され、2-HGにより前述の酵素活性が阻害される。その結果、細胞内のエネルギー代謝に影響するだけでなく、エピジェネティックな遺伝子発現制御や血管新生シグナリングにも影響を及ぼすと考えられている。一方、癌との関連も示唆されることから、2-HGをoncometaboliteと称する論文もある (Cancer Cell. 2011 Jan 18;19(1):17-30)。

既にグリオーマや急性骨髄性白血病 (AML) では、IDH変異が腫瘍形成におけるdriver mutationとして注目されている。グリオーマではIDH1変異 (R132H) がWHO grade 1、2に多くみられ (50~80%)、TP53変異や1p/19q欠失よりも早期に出現する (Am J Pathol. 2009;174(4):1149-53)。またAMLの前癌病変としてのMDSでは、病期が進行するほどIDH変異を有する割合が上昇すると報告されている (Haematologica. 2010;95(10):1668-74)。

このようにIDH変異の腫瘍形成への関与が明らかにされる一方、IDH変異を有するグリオーマでは野生型に比して予後が良好であるとの報告もなされている (J Clin Oncol. 2009;27(25):4150-4)。同様に *In vitro* では、グリオーマの細胞株にIDH1変異 (R132H) を強制発現させると野生型IDHの場合と比較して増殖が抑制されることが報告された。 *In vivo* でも、同様の細胞株をマウスの脳内に注入したところ、野生型と比較して生存期間の延長を認めている (Ann Neurol. 2011;69(3):455-63)。一方で胆管癌におけるIDH変異については臨床・基礎的研究とも未だ報告は少ないが、グリオーマやAML同様、腫瘍形成に関与する可能性が示唆されている。肝前駆細胞にIDH1変異 (R132C) を強制発現させると、HNF-4発現が低下し、肝臓への分化が抑制され、胆管系への分化が促進される。さらにはKRAS変異との共存で肝内胆管癌を発生する (Nature. 2014;513(7516):110-4)。一方、臨床データからはIDH変異を有する肝内胆管癌の予後は良好であるとする報告もある (Oncogene. 2013;32(25):3091-100) が、実際の肝内胆管癌の生物学的特性におけるIDH変異の役割については未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

IDH1変異について、肝内胆管癌における生物学的意義と臨床的意義について解析する。分子メカニズムについても変異特有の代謝産物2-HGの産生によるエネルギー調節への影響、エピジェネティックな遺伝子発現制御や血管新生シグナリングを介した影響など複数の要因が考えられるため、それらを統合的に検討する。IDH変異陽性の肝内胆管癌の表現型に関わる分子群も探索し、最終的にはIDH変異の有無による肝内胆管癌の層別化、特異的な治療選択法確立への手掛かりを追及する。

### 3. 研究の方法

ヒト肝内胆管癌でみられる IDH1 遺伝子変異 R132 S の発現コンストラクトを mutagenesis 法にて作成した。

マウス肝内胆管細胞に野生型 IDH あるいは各々の変異型をそれぞれ遺伝子導入し、安定発現株を樹立した。

### 4. 研究成果

変異IDH1の発現は変異型特異的抗体で確認、また質量分析計で2-HGの増加を確認した。グローバルレベルでのゲノムDNA メチル化および各種ヒストンメチル化修飾の違いを野生型および変異型導入細胞についてそれぞれドットプロット半定量系およびH3K4、H3K9、H3K27、H3K36、H3pan-ac、H4pan-acなどの各種抗体を用いたImmunoblotにて評価した。変異型発現細胞では予想通りH3K4、H3K9などのヒストンメチル化修飾のグローバルな増加に影響がみられた。さらにIDH野生型と変異型の胆管細胞癌にていくつかの薬剤感受性について検討したところ、変異型IDH1発現胆管細胞が対照にくらべて感受性の増加を示す薬剤を認めた。これらはIDH変異の胆管細胞癌における生物学的意義のみならず臨床学的意義も示唆している。

#### <変異IDH1遺伝子の導入>



### 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10件)

- 1: Hakuta R, Kogure H, Nakai Y, Takahara N, Mizuno S, Tada M, Koike K. Successful guidewire placement across hilar malignant biliary stricture after deceased donor liver transplantation using new digital cholangioscopy. *Endoscopy*. 2018 Mar;50(3):E54-E56.
- 2: Kogure H, Ryozaawa S, Maetani I, Nakai Y, Kawakami H, Yasuda I, Mochizuki H, Iwano H, Maguchi H, Kida M, Kubota K, Mukai T, Hasebe O, Igarashi Y, Hanada K, Irisawa A, Ito K, Itoi T, Isayama H. A Prospective Multicenter Study of a Fully Covered Metal Stent in Patients with Distal Malignant Biliary Obstruction: WATCH-2 Study. *Dig Dis Sci*. 2017 Dec 7.
- 3: Takahara N, Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Saito K, Noguchi K, Suzuki T, Nakamura T, Sato T, Ishigaki K, Hakuta R, Takeda T, Uchino R, Mizuno S, Kogure H, Tada M, Koike K. CA19-9 kinetics during systemic chemotherapy in patients with advanced or recurrent biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017 Dec;80(6):1105-1112.
- 4: Takahara N, Isayama H, Nakai Y, Yoshida S, Saito T, Mizuno S, Yagioka H, Kogure H, Togawa O, Matsubara S, Ito Y, Yamamoto N, Tada M, Koike K. A Novel Partially Covered Self-Expandable Metallic Stent with Proximal Flare in Patients with Malignant Gastric Outlet Obstruction. *Gut Liver*. 2017 Jul 15;11(4):481-488.
- 5: Takahara N, Isayama H, Nakai Y, Sasaki T, Ishigaki K, Saito K, Akiyama D, Uchino R, Mizuno S, Yagioka H, Kogure H, Togawa O, Matsubara S, Ito Y, Toda N, Tada M, Koike K. Gemcitabine and S-1

versus gemcitabine and cisplatin treatment in patients with advanced biliary tract cancer: a multicenter retrospective study. Invest New Drugs. 2017 Jun;35(3):269-276.

6: Mizuno S, Isayama H, Hirano K, Watanabe T, Takahara N, Kogure H, Matsubara S, Nakai Y, Tada M, Koike K. Factors predictive of the efficacy of bezafibrate therapy in patients with primary sclerosing cholangitis. Hepatol Res. 2017 Oct;47(11):1102-1107.

7: Uemune G, Kogure H, Hamada T, Isayama H, Ishigaki K, Takagi K, Akiyama D, Watanabe T, Takahara N, Mizuno S, Matsubara S, Yamamoto N, Nakai Y, Tada M, Koike K. Procalcitonin is a useful biomarker to predict severe acute cholangitis: a single-center prospective study. J Gastroenterol. 2017 Jun;52(6):734-745.

8: Isayama H, Nakai Y, Hamada T, Matsubara S, Kogure H, Koike K. Understanding the Mechanical forces of Self-Expandable Metal Stents in the Biliary Ducts. Curr Gastroenterol Rep. 2016 Dec;18(12):64.

9: Hamada T, Isayama H, Nakai Y, Togawa O, Takahara N, Uchino R, Mizuno S, Mohri D, Yagioka H, Kogure H, Matsubara S, Yamamoto N, Ito Y, Tada M, Koike K. Antireflux Metal Stent as a First-Line Metal Stent for Distal Malignant Biliary Obstruction: A Pilot Study. Gut Liver. 2017 Jan 15;11(1):142-148.

10: Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Takahara N, Saito K, Takeda T, Uemune G, Saito T, Takagi K, Watanabe T, Hamada T, Uchino R, Mizuno S, Yamamoto K, Kogure H, Matsubara S, Yamamoto N, Ijichi H,

Tateishi K, Tada M, Koike K. No Survival Benefit from the Inhibition of Renin-Angiotensin System in Biliary Tract Cancer. Anticancer Res. 2016 Sep;36(9):4965-70.

〔学会発表〕(計1件)

藤原弘明, 立石敬介, 小池和彦  
肝内胆管癌における IDH 変異の生物学的意義と治療層別化因子としての可能性  
第 104 回日本消化器病学会総会シンポジウム 2 消化器癌における個別化医療の進展

〔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) 研究代表者

木暮宏史 (KOGURE HIROFUMI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 60568921

### (2) 研究分担者

立石敬介 (TATEISHI KEISUKE)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 20396948

### (2) 研究分担者

浜田毅 (HAMADA TSUYOSHI)  
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医  
研究者番号: 20396948

### (3) 連携研究者

( )

### (4) 研究協力者

( )