

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：24405
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2023
課題番号：19K10604
研究課題名(和文) 地元大阪の印刷所労働者胆管がん組織を使ったがん遺伝子の探索：創薬基盤の構築

研究課題名(英文) Searching for cancer genes using cholangiocarcinoma tissue from Osaka printing company workers: building a foundation for drug discovery.

研究代表者
川村 悦史 (Kawamura, Etsushi)
大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60419710
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：2015年、我々は印刷所労働者胆管がんを含む肝胆道腫瘍24症例の臨床検体を用いてRNA発現異常の探索を開始し、抽出されたSKI遺伝子(米国Sloan Kettering Instituteが命名)の機能を解析した(科研費No. 15K08716)。2019年以降、我々はSKI-p21シグナル(SKIが細胞周期のブレーキ役p21の発現を亢進して胆管がんの増殖を抑制する)を発見した(同No. 19K10604=本課題。2022年、欧州生化学会の速報誌掲載。同年、国際学会であるアジア太平洋肝臓学会APASL oncologyでinvestigator award受賞)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、地元大阪市の印刷会社で使われた1,2-ジクロロプロパン(労災認定=高い社会的意義)による胆管がん発症の事例(2012年)をきっかけに同疾患の後天的な遺伝子発現に注目した。現在も我々は、unmet medical needsである胆管がんの新たな創薬を念頭にがん抑制遺伝子の機能解析を続けている：(1)最適化SKIの合成(p21転写とSKIの安定性を高めたアミノ酸配列)、(2)p21転写因子の探索、(3)胆管がんモデルマウスにおける抗がん作用の検証。本成果が欧州生化学会の機関誌へ掲載されたり、胆管がんが多いアジア太平洋地域最大の国際学会で受賞したことは学術的に意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：In 2015, we initiated a search for abnormal RNA expression using clinical specimens from 24 cases of hepatobiliary tumors, including cholangiocarcinoma of printing company workers, and analysed the function of the extracted SKI gene (named by the Sloan Kettering Institute, USA) (JSPS KAKEN Grant No. 15K08716). 2019 onwards, we found a signal that SKI suppresses cholangiocarcinoma growth by increasing the expression of the cell cycle inhibitor p21 (ibid. No. 19K10604, published in 2022 in a rapid communication journal of the Federation of European Biochemical Society, and in the same year, received an investigator award from the Asian Pacific Association for the Study of the Liver's oncology conference).

研究分野：胆管癌

キーワード：肝内胆管癌 胆管細胞癌 職業性胆管癌 印刷所 ジクロロプロパン

1. 研究開始当初の背景

- (1) 胆管がんは、世界的に増加しており難治性である。世界で年間約 20 万人(日本で約 2 万人)が罹患し、5 年生存率 31%と最も予後不良な腫瘍性疾患の 1 つである[1]。
- (2) 本研究は、研究代表者が地元大阪で印刷所労働者に多発した塩素系溶剤による胆管がんの事例に関わったことが背景にある(図 1)。2013 年 3 月、1,2-ジクロロプロパンはこの疾患の最大のリスク因子とされ、労災認定された。この物質は、大気中や公共水域にも含まれ、発がんリスクの高い集団は想定以上である。本研究の代表者は、厚生労働省科学特別研究事業[印刷労働者にみられる胆管細胞がん発症に関する疫学的解明と原因追究(2010-2012 年度)および職業性胆管がんに対する総合的診断法の確立(2013-2014 年度)]のメンバーを務めた。同省の地方支分部局である大阪労働局の依頼を受け、2013 年以降、本学附属病院胆管がん特別外来において胆管がんハイリスク者の専門診療に従事し(現在も本学附属病院・胆管がん特別外来で診療継続中)、1,2-ジクロロプロパン曝露ハムスターモデルの細胆管増生(同事業報告書、2012 年 5 月)や胆管がんの新たな腫瘍マーカーを示した[2]。
- (3) 同じ労働環境でも未発症例があった為、我々は遺伝子発現の個人差に注目した。2015 年、地元大阪にとって疫学的に重要な印刷所労働者胆管がんの臨床検体を入手し基礎的解析を始めた。我々の事前研究により胆管がんの増殖抑制に関連する遺伝子 SKI (Sloan-Kettering Institute が発見したタンパク)が見いだされた。我々は、シークエンス頼みの大規模研究では成し得ない“臨床検体から得たがん関連遺伝子の分子病理学的解析”を行うこととした[3]。



図 1.大阪市の印刷所で発生した職業性胆管がんの報道(2013 年 3 月、南日本新聞)。

2. 研究の目的

印刷所労働者を含む胆管がん症例の外科的切除腫瘍組織及び血清から抽出した RNA 検体を使って胆管がん関連遺伝子を探索する。本研究の目的は、新たな創薬の基盤になる基礎データを蓄積して胆管がん抑制遺伝子 SKI の役割を解明することである。次の 2 点を研究の目標とした。

- (1) SKI による抗胆管がん作用の機序の解明
- (2) 生体での検証

3. 研究の方法

- (1) 我々は、当院の外科的切除肝胆道腫瘍 24 例(63.8 歳)[胆管がん 10(50 歳未満 4)/肝細胞がん 10/良性腫瘍 4]の血清中 exosome および腫瘍組織より micro RNA(miR)を、腫瘍組織より messenger RNA(mRNA)を抽出した。これらを対象に高感度 microarray 及び in silico 探索を行ない、がん関連遺伝子と細胞増殖の関連を解析した。得られたがん抑制遺伝子(シグナル)の機能を解析した(ヒト胆管がん細胞株)。
- (2) 生体での検証: 化学曝露による胆管がんマウスの作成(ジエチルニトロサミン腹腔注、3,5-ジエトキシカルボニル-1,4-ジヒドロコリジン含有飼料の併用)。同マウスにおける Ski の発がんへの影響の解析。

4. 研究成果

(1) 腫瘍群間で差次的に制御される miR20 種とその標的 mRNA (target database で高順位) が選別された。我々は膵臓(胆管と共に前腸から発生)の腫瘍病態との関連が報告される miR-3648 とその標的 mRNA(LPL, SKI, APC2)に着目した。miR-3648 を過剰発現させたヒト高分化型胆管がん細胞株(OZ)における標的 mRNA の発現を評価し、SKI mRNA、同タンパクの発現が低下した(vs.陰性対照)。SKI を過剰発現させた OZ において、細胞周期制御因子 p21 の発現(mRNA/タンパク/promoter luciferase)の上昇、細胞増殖および DNA 複製因子 CDT1 のタンパク発現の抑制が認められた(vs.陰性対照)(**図 2**)。SKI は、ヒト低分化型胆管がん細胞株 KKU100 において mRNA 発現が低く(vs.高分化型株 OZ)、ヒト胆管がん腫瘍組織における免疫染色でタンパク発現が低かった(vs.非腫瘍部)。これらにより我々は次の学術的成果に至った：原著論文 [4]、総説 [5]、国際学会 APASL oncology 2022 での受賞(investigator award)、SKI を胆管がん治療剤とする特許出願。

(2) 化学曝露によるマウスの胆管前がん病変の作成に成功し、予備的解析で SKI の抗がん作用が認められた(**図 3**: 蛍光免疫染色)。

以上、我々は塩素系溶剤の代謝酵素(CYP2E1 および GSTT1)の発がんへの関与は解明できなかったが SKI-p21 シグナルを発見した。SKI タンパクが p21 遺伝子の転写と細胞周期の制御(vitro)を介して胆管がんの増殖抑制に関わる(vitro/vivo)ことが示唆された。

<引用文献>

- [1] H. Iijima *et al.*, "Report of the 23rd nationwide follow-up survey of primary liver cancer in Japan (2014-2015)," (in eng), *Hepatol Res*, vol. 53, no. 10, pp. 895-959, Oct 2023, doi: 10.1111/hepr.13953.
- [2] Y. Murakami *et al.*, "Comprehensive analysis of transcriptome and metabolome analysis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma," *Scientific Reports*, vol. 5, Nov 2015, Art no. 16294, doi: 10.1038/srep16294.
- [3] A. Jusakul *et al.*, "Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma," (in eng), *Cancer Discov*, vol. 7, no. 10, pp. 1116-1135, 10 2017, doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0368.
- [4] E. Kawamura *et al.*, "Suppression of intrahepatic cholangiocarcinoma cell growth by SKI via upregulation of the CDK inhibitor p21," (in eng), *FEBS Open Bio*, vol. 12, no. 12, pp. 2122-2135, Dec 2022, doi: 10.1002/2211-5463.13489.

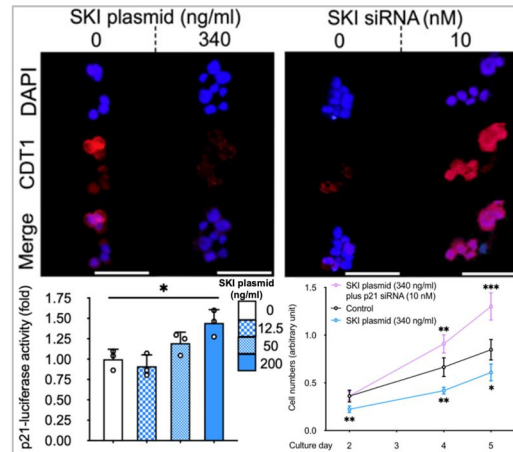


図 2. SKI は細胞周期を止めて胆管がん増殖を抑制.

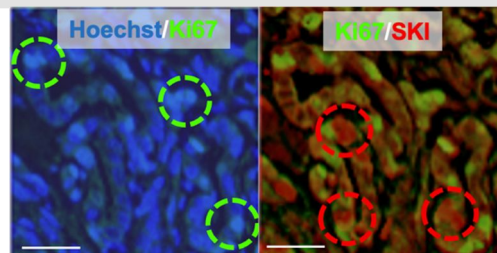


図 3. SKI の抗がん作用の生体での検証 (マウス胆管がん上皮の SKI 陽性部は Ki67 陰性. bar は 10 μ m).

- [5] E. Kawamura, T. Matsubara, and N. Kawada, "New Era of Immune-Based Therapy in Intrahepatic Cholangiocarcinoma," (in eng), *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 15, Aug 06 2023, doi: 10.3390/cancers15153993.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawamura E, Matsubara T, Daikoku A, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Suppression of intrahepatic cholangiocarcinoma cell growth by SKI via upregulation of the CDK inhibitor p21	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2122 ~ 2135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura E, Matsubara T, Kawada N.	4. 巻 15
2. 論文標題 New Era of Immune-Based Therapy in Intrahepatic Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 3993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15153993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 川村悦史、松原勤、出口早苗、樋口萌、高田さゆり、大黒敦子、伊藤得路、木下正彦、松原三佐子、小田桐直志、田中肖吾、竹村茂一、村上善基、榎本大、田守昭博、久保正二、祝迫恵子、池田一雄、河田則文
2. 発表標題 若年胆管癌組織を使った癌抑制遺伝子の探索
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会西部会、一般口演、下関
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawamura E, Matsubara T, Higuchi M, Daikoku A, Takada S, Deguchi S, Odagiri N, Ito T, Kinoshita M, Yuasa H, Urushima H, Sato-Matsubara M, Tanaka S, Takemura S, Iwaisako K, Enomoto M, Murakami Y, Taguchi YH, Tamori A, Kubo S, Ikeda K and Kawada N
2. 発表標題 Genetic search started from resected samples of juvenile-onset human cholangiocarcinoma: SKI interacts with microRNA-3648 resulting in cell cycle regulation
3. 学会等名 アジア太平洋肝臓学会（29th APASL annual meeting）、一般口演、インドネシア（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川村悦史、松原勤、伊藤得路、湯浅秀人、宇留島隼人、松原三佐子、萩原淳司、藤井英樹、木下正彦、打田佐和子、田中肖吾、竹村茂一、榎本大、田守昭博、久保正二、祝迫恵子、村上善基、田口善弘、池田一雄、河田則文
2. 発表標題 職業性肝内胆管癌組織を使った癌遺伝子の探索
3. 学会等名 第56回日本肝癌研究会、一般口演、大阪
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川村悦史、松原勤、河田則文
2. 発表標題 胆管癌の臨床検体から抽出した癌抑制遺伝子による細胞増殖抑制: SKI-p21waf/cip1シグナルについて
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会、主題口演、札幌
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawamura E, Matsubara T, Daikoku A, Deguchi S, Muto Y, Takada S, Ito T, Kinoshita M, Odagiri N, Kotani K, Motoyama H, Kozuka R, Yuasa H, Urushima H, Sato-Matsubara M1, Hagihara A, Fujii H, Kobayashi-Uchida S, Tanaka S, Takemura S, Iwaisako K, Enomoto M1, Taguchi YH, Tamori A, Kubo S, Ikeda K and Kawada N
2. 発表標題 Role of SKI in the suppression of cholangiocarcinoma cell proliferation by inducing G1-phase arrest: validation of results from clinical specimens
3. 学会等名 アジア太平洋肝臓学会(APASL single topic conference)、ポスター、大阪(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川村悦史、松原勤、大黒敦子、武藤芳美、高田さゆり、新川寛二、木下正彦、小田桐直志、小谷晃平、元山宏行、小塚立蔵、松原三佐子、萩原淳司、藤井英樹、打田佐和子、田中肖吾、竹村茂一、榎本大、田守昭博、久保正二、池田一雄、河田則文
2. 発表標題 臨床検体から抽出した癌抑制遺伝子SKIによる胆管癌細胞周期の抑制
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会西部、一般口演、岡山
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawamura E, Matsubara T, Yuasa H, Urushima H, Tanaka S, Takemura S, Uchida-Kobayashi S, Enomoto M, Taguchi YH, Ikeda K, Nishiguchi S and Kawada N
2. 発表標題 In vitro study on the function of Sloan Kettering Institute gene in suppression of intrahepatic cholangiocarcinoma growth
3. 学会等名 アジア太平洋肝臓学会 (APASL oncology)、主題口演、高松 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川村悦史、松原勤、大黒敦子、武藤芳美、小田桐直志、元山宏行、小谷晃平、小塚立蔵、萩原淳司、藤井英樹、打田佐和子、榎本大、池田一雄、河田則文
2. 発表標題 胆管癌患者血清から抽出したmicroRNA-3648と癌抑制遺伝子SKI mRNAの関係
3. 学会等名 第45回日本肝臓学会西部会、一般口演、京都
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kawamura E, Matsubara T, Odagiri N, Kotani K, Daikoku A, Kadono C, Yuasa H, Kozuka R, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Izawa T, Enomoto M, Ikeda K, and Kawada N
2. 発表標題 Search for genes involved in proliferation of intrahepatic cholangiocarcinoma using clinical samples
3. 学会等名 アジア太平洋肝臓学会 (33rd APASL annual meeting)、一般口演、京都 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川村悦史、松原勤、河田則文
2. 発表標題 50歳未満の臨床検体を使った肝内胆管癌の増殖に関わる遺伝子の探索と分子病態の解析
3. 学会等名 第60回肝臓学会総会、主題口演、熊本
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 胆道癌又は肝癌治療剤	発明者 川村 悦史、松原 勤、河田 則文、池 田 一雄	権利者 公立大学法人大 阪
産業財産権の種類、番号 特許、特開2021-080186	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	村上 善基 (Murakami Yoshiki) (00397556)	朝日大学・歯学部・教授 (32645)	
研究 分担者	松原 勤 (Matsubara Tsutomu) (20628698)	大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授 (24405)	
研究 分担者	河田 則文 (Kawada Norifumi) (30271191)	大阪公立大学・大学院医学研究科・教授 (24405)	
研究 分担者	池田 一雄 (Ikeda Kazuo) (80275247)	大阪公立大学・大学院医学研究科・教授 (24405)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	宇留島 隼人 (Urushima Hayato) (90755745)	大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授 (24405)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	湯浅 秀人 (Yuasa Hideto) (50825297)	大阪公立大学・大学院医学研究科・助教 (24405)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関