

機関番号：34519

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591617

研究課題名 (和文) 肝内胆管癌組織に発現する細胞外マトリックスの機能解析とその臨床応用

研究課題名 (英文) Expression and Function of Extracellular Matrix expressed in Cholangiocarcinoma.

研究代表者

宇山 直樹 (UYAMA NAOKI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70402873

研究成果の概要 (和文)：

肝内胆管癌組織の免疫染色では、癌細胞にコラーゲン V, IX, XII, XIV, XVI の発現を認め、間質にはコラーゲン I, III, V, XII の発現を認めた。また、肝内胆管癌細胞株および癌組織より分離した線維芽細胞の免疫染色においても同様の結果を得た。また、Fibril Collagen の受容体と考えられる DDR1 及び Integrin beta1 受容体の発現を癌細胞及び線維芽細胞に認め、Integrin 受容体の下流に存在する FAK も肝内胆管癌組織に認めた。FAK の阻害剤を用いた実験では肝内胆管癌細胞株および線維芽細胞の増殖能および浸潤能が有意に抑制された。以上より FAK は癌組織の機能制御に重要な molecule であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Immunohistochemical study revealed that collagens type I, III, V and XII were expressed by fibroblasts in cholangiocarcinoma and collagens type V, IX, XII, XIV and XVI were expressed by cancer cells of cholangiocarcinoma. In addition, Immunohistochemical study revealed that DDR1 and Integrin beta1 receptor, which are collagen receptor, and focal adhesion kinase (FAK), an integrin downstream molecule, were expressed by cancer cells as well as fibroblasts in cholangiocarcinoma tissues. They were also expressed by cholangiocarcinoma cell lines and fibroblasts isolated from cholangiocarcinoma tissues. In culture experiments, FAK specific inhibitor suppressed cell growth and cell invasion ability of RBE cells, SSP-25 cells, cell lines of cholangiocarcinoma, and fibroblasts. Taken together, FAK may be an important molecule to regulate matrix-FAK signaling dependant cancer behaviors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード：肝内胆管癌、間質、線維芽細胞、コラーゲン、相互作用、受容体

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌は肝細胞癌のようにハイリスク群の定義がなく、発見時進行症例が多く、未だ予後不良な疾患である。当科においても切除率は67%であり、切除例の5年生存率は20%以下である。肝内胆管癌の組織学的特徴は癌細胞のほかに豊富な間質が存在していることである。間質と癌組織の悪性度の関連が報告されており、癌組織内に発現する細胞外マトリックス（コラーゲンなど）の解明とその機能、メカニズムについて明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

肝内胆管癌組織に発現するコラーゲンファミリーを明らかにし、癌細胞及び間質に存在する線維芽細胞へのかかわりについて調べる。

3. 研究の方法

肝内胆管癌組織におけるコラーゲンタイプ1から18までの発現を免疫染色にて調べ、癌細胞株(RBE細胞、SSP25細胞)および分離線維芽細胞においても同様に発現を調べた。次に Fibril Collagen (タイプ1, 2, 3, 5, 11) の受容体と考えられている Discoidin domain receptor (DDR), Integrin receptor および integrin receptor 下流に存在する FAK (Focal adhesion Kinase) の発現を組織及び細胞で調べた。また、FAK のリン酸化阻害剤である Benzenetetraamine tetrahydrochloride (BTTTC) を用いて、癌細胞および線維芽細胞における FAK の働きを調べた。

4. 研究成果

肝内胆管癌組織の免疫染色では、癌細胞にコラーゲンタイプ 5, 9, 12, 14, 16 の発現を認め、間質にはコラーゲンタイプ 1, 3, 5, 12 の発現を認めた。また、肝内胆管癌細胞株 RBE、SSP25

細胞および癌組織より分離した線維芽細胞の免疫染色においても同様の結果を得た。また、Fibril Collagen の受容体と考えられる DDR1 及び Integrin beta1 受容体の発現を癌細胞及び線維芽細胞に認め、integrin 受容体の下流に存在する FAK も肝内胆管癌組織 6 例中 5 例に認めた。FAK 陰性一例には再発は認めず、FAK 陽性 5 例はみな再発死していた。そこで、RBE および SSP25 における DDR1 および integrin beta1 の遺伝子発現抑制を siRNA を用いて行なった。細胞培養はコラーゲンタイプ 1 コート上で培養したが、浸潤・増殖に影響はなかった。しかし、FAK の阻害剤を用いた実験では 5 microM の濃度で RBE 及び SSP25 細胞の増殖能および浸潤能は優位に抑制された。以上のことから、DDR1、integrin beta1 を介したシグナル以外で FAK を介するシグナルががん細胞の増殖浸潤に深くかかわっている可能性が考えられた。

また、線維芽細胞においても FAK 阻害剤 (1.5microM) にて増殖能および浸潤能が有意に抑制されており、FAK ががん細胞のみならず、間質の線維芽細胞の機能制御に重要な molecule であると考えられた。

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)

- ① [雑誌論文] (計 3 件) Iimuro Y, Kashiwagi T, Yamanaka J, Hirano T, Saito S, Sugimoto T, Watanabe S, Kuroda N, Okada T, Asano Y, Uyama N, Fujimoto J. Preoperative estimation of asialoglycoprotein receptor expression in the remnant liver from CT/^{99m}Tc-GSA SPECT fusion images correlates well with postoperative liver function

parameters. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2010;17:673-81. 査読あり

- ② 鈴村和大, 森川司朗, 岡田敏弘, 王孔志, 黒田暢一, 平野公通, 宇山直樹, 佐竹 真, 藤元治朗 (2008) 腹腔鏡補助下にて幽門側胃切除術を施行した胃脂肪腫の1例. 日本外科系連合学会誌, 33, 880-883. 査読あり
- ③ 宇山直樹, 波多野悦朗, 前谷洋爾, 磯田裕義, 柴田登志也, 田浦康二郎, 大江正士郎, 内藤雅人, 安近健太郎, 藤井英明, 猪飼伊和夫, 上本伸二 (2008) 切除不能肝細胞癌に対する微粉末 Cisplatinを用いた肝動脈塞栓化学療法の効果および有害事象の検討. 癌と化学療法, 35, 775-780. 査読あり

[学会発表] (計 21 件)

- ① 宇山直樹, 飯室勇二, 中井紀博, 近藤祐一, 鈴村和大, 佐竹真, 吉田康彦, 杉本貴昭, 麻野泰包, 斉藤慎一, 王孔志, 岡田敏弘, 平野公通, 黒田暢一, 山中潤一, 藤元治朗. 肝細胞癌内線維化領域に存在する線維芽細胞の免疫組織学的検討. 第 14 回日本肝臓学会大会 2010.10.13 横浜
- ② 宇山直樹, 飯室勇二, 平野公通, 麻野泰包, 斉藤慎一, 岡田敏弘, 王孔志, 黒田暢一, 山中潤一, 藤元治朗. 小分子FAKリン酸化阻害剤による肝内胆管癌に対する分子標的治療の可能性について. (企画関連口演) 第 65 回日本消化器外科学会総会 2010.7.14 下関
- ③ 宇山直樹, 飯室勇二, 山中潤一, 黒田暢一, 平野公通, 岡田敏弘, 王孔志, 斉藤慎一, 麻野泰包, 杉本貴昭, 吉田康彦, 佐竹真, 鈴村和大, 近藤祐一, 中井紀博, 藤元治朗. 肝細胞癌内線維化領域に

存在する線維芽細胞における免疫組織学的検討. 第 46 回日本肝癌研究会 2010.7.8 大阪

- ④ 宇山直樹, 飯室勇二, 平野公通, 中井紀博, 近藤祐一, 鈴村和大, 佐竹真, 吉田康彦, 杉本貴昭, 麻野泰包, 斉藤慎一, 王孔志, 黒田暢一, 山中潤一, 藤元治朗. 肝内胆管癌組織におけるFAKの発現と小分子FAKリン酸化阻害剤による肝内胆管癌に対する分子標的治療の可能性について. (ミニシンポジウム) 第 22 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2010.5.27 仙台
- ⑤ 宇山直樹, 飯室勇二, 今村美智子, 近藤祐一, 鈴村和大, 佐竹真, 吉田康彦, 杉本貴昭, 麻野泰包, 斉藤慎一, 王孔志, 岡田敏弘, 平野公通, 黒田暢一, 山中潤一, 藤元治朗. 小分子FAK阻害剤による肝内胆管癌機能制御. 第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010.4.8 名古屋
- ⑥ Uyama N, Iimuro Y, Imamura M, Kondo Y, Suzumura K, Satake M, Yoshida Y, Sugimoto T, Asano Y, Saito S, Oh K, Okada T, Hirano T, Kuroda N, Yamanaka J, Fujimoto J. Fascin, an actin bundling protein, may regulate functions of hepatic stellate cells through FAK-PI3K-Akt pathway. 20th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL2010) 2010.3.26 Beijing
- ⑦ 宇山直樹, 岡田敏弘, 今村美智子, 近藤祐一, 鈴村和大, 吉田康彦, 杉本貴昭, 麻野泰包, 斉藤慎一, 王孔志, 平野公通, 黒田暢一, 山中潤一, 飯室勇二, 藤元治朗. 腹腔鏡下胆嚢摘出術を施行した粘液産生性胆嚢癌の一例. 第 22 回日本内視鏡外科学会総会 2009.12.4

- 東京
- ⑧ 宇山直樹, 飯室勇二, 藤元治朗. Fascinによる星細胞機能制御。(ワークショップ) 第13回日本肝臓学会大会 2009.10.14 京都
- ⑨ 宇山直樹, 飯室勇二, 近藤祐一, 鈴木和夫, 佐竹真, 吉田康彦, 杉本貴昭, 麻野泰包, 斉藤慎一, 王孔志, 岡田敏弘, 平野公通, 黒田暢一, 山中潤一, 藤元治朗. 肝内胆管癌細胞における discoidin domain 1受容体 (DDR1受容体) の役割. 第45回日本肝癌研究会 2009.7.3 福岡
- ⑩ 宇山直樹, 飯室勇二, 杉本貴昭, 斉藤慎一, 王孔志, 岡田敏弘, 平野公通, 黒田暢一, 山中潤一, 藤元治朗. 肝内胆管癌細胞においてDDR1受容体はErk依存的に細胞増殖及び浸潤能を制御している. 第64回日本消化器外科学会総会 2009.7.16 大阪
- ⑪ 宇山直樹, 黒田暢一, 鈴木和夫, 佐竹真, 吉田康彦, 杉本貴昭, 麻野泰包, 斉藤慎一, 王孔志, 岡田敏弘, 平野公通, 山中潤一, 飯室勇二, 藤元治朗. 膵癌細胞におけるHeat Shock Protein(HSP)47の役割. 第21回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2009.6.10 名古屋
- ⑫ 宇山直樹, 飯室勇二, 鈴木和夫, 佐竹真, 吉田康彦, 杉本貴昭, 麻野泰包, 斉藤慎一, 王孔志, 岡田敏弘, 平野公通, 山中潤一, 藤元治朗. 肝内胆管癌組織及び非癌部におけるFibril collagen及びFACIT collagen発現の免疫組織学的検討. 第45回日本肝臓学会総会 2009.6.4 神戸
- ⑬ 宇山直樹, 飯室勇二, 鈴木和夫, 佐竹真, 吉田康彦, 杉本貴昭, 麻野泰包, 斉藤慎一, 王孔志, 岡田敏弘, 平野公通, 山中潤一, 藤元治朗. 肝内胆管癌組織及び非癌部におけるFibril collagen及びFACIT collagen発現の免疫組織学的検討. 第109回日本外科学会定期学術集会 2009.4.2 福岡
- ⑭ Uyama N, Iimuro Y, Suzumura K, Satake M, Yoshida Y, Sugimoto T, Asano Y, Saito S, Oh K, Okada T, Hirano T, Kuroda N, Yamanaka J, Fujimoto J. Expression of fibril-forming collagens and FACIT collagens in intrahepatic cholangiocarcinoma. 19th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2009.2.13 Hong Kong
- ⑮ Uyama, N., Iimuro, Y., Yanagida, A., Suzumura, K., Satake, M., Hirano, T., Kuroda, N., Yamanaka, J. and Fujimoto, J. Expression and function of fascin, an actin bundling protein, in human hepatic stellate cells. 14th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, 2008.8.31, Tromso, Norway.
- ⑯ 楠山一樹, 山中潤一, 宇山直樹, 杉本貴昭, 斉藤慎一, 岡田敏弘, 平野公通, 黒田暢一, 飯室勇二, 藤元治朗. 肝炎症性偽腫瘍を合併したMirrizi症候群の一例. 第63回日本消化器外科学会総会, 2008.7.16, 札幌.
- ⑰ 宇山直樹, 飯室勇二, 山中潤一, 平野公通, 斉藤慎一, 杉本貴昭, 藤元治朗. 肝内胆管癌組織におけるコラーゲンファミリーの発現とコラーゲン受容体発現の解析. 第63回日本消化器外科学会総会, 2008.7.16, 札幌.
- ⑱ 宇山直樹, 黒田暢一, 麻野泰包, 佐竹真, 藤元治朗. 膵頭部膵管内乳頭粘液性

腺腫に対して幽門輪温存膵頭十二指腸
切除術施行後6年目に膵胃吻合部に膵癌
が生じ、残膵全摘を行った1例。第20
回日本肝胆膵外科学会・学術集会，
2008.5.28，山形。

- ⑱ 宇山直樹，飯室勇二，杉本貴昭，齊藤慎
一，岡田敏弘，平野公通，山中潤一，藤
元治朗 肝内胆管癌組織におけるコラー
ゲンファミリーの発現とコラーゲン受
容体発現の解析。第44回日本肝癌研究
会，2008.5.22，大阪。
- ⑳ 宇山直樹，黒田暢一，鈴木和夫，吉田康
彦，佐竹 真，杉本貴昭，麻野泰包，齊
藤慎一，岡田敏弘，平野公通，嶋田 裕，
山中潤一，飯室勇二，藤元治朗 膵癌組
織におけるHeat Shock Protein(HSP)47
の発現とその役割。第108回日本外科学
会定期学術集会，2008.5.15，長崎。

〔図書〕(計1件)

- ① 宇山直樹，藤元治朗。原発性肝がん。消
化器外科NURSING 2010;15:1026-31。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇山 直樹 (UYAMA NAOKI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：70402873

(2) 研究分担者

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：90199373

飯室 勇二 (IIMURO YUJI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30252018

平野 公通 (TADAMICHI HIRANO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：90340968