

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590463

研究課題名（和文） タイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanism of tumorigenesis of cholangiocarcinoma induced by *Opisthorchis viverrini* infection

研究代表者

呉 志良 (Zhiliang Wu)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90313874

研究成果の概要（和文）：

本研究はタイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌に関与する遺伝子、シグナル経路及び胆管癌の病期、転移、生存率、予後と相関する腫瘍マーカーを同定した。結果は感染が起した慢性炎症、肝吸虫の物理的及び化学的な損害によって、DNAメチルなど遺伝的エピジェネシスが起し、腫瘍抑制因子、細胞の解毒酵素や酸化還元酵素の発現が低下になり、細胞増殖・分化因子及び癌遺伝子の発現が増加及び活性化になり、癌化に至る分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, by using animal model of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma (CCA) and the analysis of CCA tumor tissues of the patients from epidemic areas in Thailand, the genes and signaling pathways to involve in the tumorigenesis, and the biomarkers correlated with stage, metastasis and survival were identified. The study revealed the molecular mechanism that chronic inflammation caused by *Opisthorchis viverrini* infection decreases the ability of detoxination, leading to the accumulation of ROS and the toxin products from worm, which causes DNA damage, epigenesis and methylation, and expression change of the genes that promotes cell proliferation, differentiation, transformation and carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
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：基礎医学・寄生虫学

キーワード：タイ肝吸虫、胆管癌、発癌、分子機構、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

タイ肝吸虫(*Opisthorchis viverrini*)および肝吸虫(*Chlonorchis sinensis*)は東南アジアに広く分布しており、その感染者は3500万人と推測される。流行地での胆管癌の発生率は非流行地と比較して極めて高く、肝吸虫の感染が発癌原因の一つとして強く推測されている。また、動物実験においても感染が胆管癌を誘発することが明らかにされた。癌化機序はいまだ不明であるが、感染による成虫の化学的および物理的な刺激が炎症や胆汁鬱滞をおこさせ、胆管系上皮の剥離、杯細胞化生、腺腫様増生、肉芽腫、繊維化などの病理変化を惹起し、炎症細胞由来Nitric oxideまたは胆管上皮細胞内の窒素化蛋白がDNA、RNAなどに損傷を生じさせ、胆管上皮細胞の増生および化生は外因性・内因性の化学的発癌物質に影響されやすくなり、成虫の分泌因子が癌化を進行させるなどのような機構が推測されている。

タイ肝吸虫感染による癌化メカニズムの分子生物学的な研究は従来断片的であり、感染による癌化に関与する遺伝子やシグナル経路は同定されていない。その原因の一つは患者の病理サンプルの採集が困難で、また動物感染実験が流行地しかできないである。

本研究は当分野がタイ肝吸虫流行地であるKhon Kaen 大学寄生虫学教室と長年にわたって共同研究をしてきた基礎の上に、感染による胆管癌の発癌動物モデルを用いて、cDNA Microarrayの解析で、発癌に関与する候補遺伝子やシグナル経路をスクリーニングおよび同定すると考えた。そのような分子機構の解明は発癌の原因、早期診断及び遺伝子治療のBiomakerを検索・同定することに大きな意義がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌動物モデルを用いて、cDNAマイクロアレイで癌化に伴う遺伝子の発現プロファイルを解析し、癌化に関与する遺伝子・シグナルを検索・同定し、その発癌の分子メカニズムを解明する。また、流行地由来胆管癌患者における発現を検証するによって、早期

診断及び遺伝子治療に応用する腫瘍マーカーを同定する。

3. 研究の方法

1) 発癌動物モデルの設立：タイ肝吸虫感染による胆管癌誘発実験動物モデルはすでに確立されており、その応用例も多い。すなわち、ハムスターは少量dimethylnitrosamine (NDMA)のみ投与されても、胆管癌の発生が起らないが、タイ肝吸虫感染プラスNDMAの投入がハムスターに胆管癌を誘発する。よって、4グループ(ノーマル、感染の未、NDMA投与のみ、感染プラスNDMA投与)を設けて、経時的に(感染また投与後1, 2, 3, 6ヶ月)肝臓組織を採集して、マイクロアレイなど解析を行う。

2) cDNAマイクロアレイ解析：動物モデルから採集したサンプル、またLaser capture microdissectionで収集した特定組織からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行う。各サンプルにおける発現プロファイルの解析・比較により、感染急性期と慢性期における発癌に関連する遺伝子の発現量を検討する。DMN投与群とDMN投与+タイ肝吸虫感染群、またはタイ肝吸虫感染群とDMN投与+タイ肝吸虫感染群の解析・比較により、発癌に関連する遺伝子群をリストアップする。クラスター解析(階層型と非階層型解析)、特徴抽出、分類予測およびGO Term Finder解析によって各比較ペア間で発現変化パターンが類似した遺伝子同士をグルーピングし、発現に違いのある遺伝子を抽出し、遺伝子機能との関連性を検討する。これらの解析によって発癌に関連する遺伝子をリストアップし、そのシグナル経路について検討する。

3) 標的遺伝子の発現動態の検討：マイクロアレイ解析の結果を基づいて、発現変化がある候補遺伝子の発現をリアルタイムPCRで定量し、その発現動態と発癌過程の相関性を検討する。

4) 組織免疫染色で、標的遺伝子産物の腫瘍組織・細胞における局在を検討する。

5) タイ肝吸虫流行地由来の胆管癌患者の

組織におけるmRNA及び蛋白質発現、組織・細胞の局在を解析し、臨床病理との相関性を検討する。

4. 研究成果

1) cDNAマイクロアレイの解析でタイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌に伴う発現変化がある遺伝子をリストアップした。

タイ肝吸虫感染による発癌動物モデルを用いて、径時的な(1, 2, 3, 6ヶ月)発現プロファイルをcDNAマイクロアレイで解析した。ノーマル、感染のみ、NDMA投与のみ及び感染プラスNDMA投与その四つグループの発現のプロファイルを比較・解析した結果は、感染による発癌過程に、131の遺伝子の発現が高くなり、145の遺伝子の発現が低下になったことを示した。これらの遺伝子の多くは細胞分化、変異、増殖、周期制御、DNA修復、細胞骨格、アポトーシス、解毒及び酸化還元などに関連するものであり、感染による発癌に関与する候補遺伝子と考えられる。また、発現変化がみられる遺伝子の中に、既知癌遺伝子があるが、癌化に関連について不明である遺伝子も多くあり、これらの遺伝子の詳しい解析は感染による発癌に関わる特異的な遺伝子/シグナル経路の見解が期待される。

2) Rb (retinoblastoma) シグナル経路はタイ肝吸虫感染による発癌に関与する

Rbシグナル経路は細胞周期の制御によって癌化を抑制する経路として知られている。この経路に関与する遺伝子の発現異常が細胞増殖異常をおこさせ、癌化を促進させると考えられている。肝吸虫感染発癌動物モデルを用いて、RB経路に関与する遺伝子であるRB1、cyclin D1、p16^{INK4}およびCDK4の癌化に伴う発現変化を検討した結果は、Rb1およびP16^{INK4}の発現量が感染による発癌動物において低下になったが、cyclin D1およびCDK4の発現量が増加になったことを示した。それら遺伝子の発現動態はハムスターにおける発癌の病理進展と一致している。また、タイ肝吸虫流行地由来胆管癌患者の腫瘍組織における発現を同様に検討した結果は、RB1およびp16^{INK4}の発現量が、それぞれ50%および

82.7%に低下になり、半数の患者でcyclin D1およびCDK4の発現が高くなったことを認めた。さらに、胆管癌患者の臨床病理との相関性の解析はRb1の発現が胆管癌のタイプと有意義相関があり、cyclin D1の発現が生存率と相関することを示した。結果はタイ肝吸虫感染がRbシグナル経路の異常を起し、細胞増殖を促進することによって、癌化に関与することを明らかにした。

3) galectin-1はタイ肝吸虫感染による胆管癌の新たな腫瘍マーカーである

galectin蛋白は細胞の分化、接着、増殖、血管新生、アポトーシスなどを制御する因子であり、発癌の関与及び癌の浸潤・転移に深く関わる重要なキー蛋白として知られている。胆管癌において発現や癌化に関与についてはまた不明であるため、タイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌動物モデルにおけるgalectin-1, 3及び9の発現動態、及び流行地由来の胆管癌患者(78例)における発現を検討した。発癌動物モデルにおいては、galectin-1の発現が発癌早期に著しく上昇し、胆管癌形成に伴ってさらに増加した。78例胆管癌の患者においてもgalectin-1の発現は同様に上昇し、癌組織における発現を同一患者の正常実質部分をコントロールに比較してみると、発現が3倍以上になった患者は53例(68%)であった。galectin-3及びgalectin-9の発現は、発癌動物モデルでの発現動態はgalectin-1と若干異なったが、発癌過程に発現は増加と見られた。また患者の癌組織においては、galectin-3とgalectin-9発現が3倍以上に上昇した例は、それぞれ69例(88%)と56例(72%)であった。感染による動物モデル及び78例胆管癌患者由来癌組織の免疫染色解析は、発癌早期に高くなったgalectin-1の発現が増殖、新生、形成異常胆管に局在し、腫瘍形成過程に腫瘍stromaの線維芽細胞質・核及び胆管癌上皮細胞に局在することを示した。さらに、臨床病理性との相関性の解析結果は、発現が胆管癌の進行期、転移及び生存率と相関して、予後因子であることを明らかにした。結果はgalectin-1が肝吸虫感染による胆管癌の発癌に関与する新たな腫瘍因子として、診断、治療及び予後に

応用性があることを示唆した。

4) タイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌におけるPDGFRAシグナル経路の役割

PDGF (血小板由来増殖因子) は、細胞増殖因子また癌遺伝子であり、細胞の増殖や発生・分化、創傷治癒、さらには癌悪性などにおいて重要な役割を果たす。cDNAマイクロアレイの解析で、タイ肝吸虫感染による胆管癌発癌過程にPdgfaの発現は著しく上昇したことから、そのシグナル経路と発癌の関連性を検討した。感染による胆管癌動物モデルにおいて、Pdgfa及び受容体Pdgfraの発現は発癌過程に伴って増加した。タイ肝吸虫流行地由来78例胆管癌患者において検討した結果は、67例患者の癌組織においてPdgfaのmRNAレベルが高くなり (85.9% > 3 folds)、47例において免疫染色が陽性 (60.3%)、陽性反応は上皮腫瘍細胞質に局在していることを示した。また、それら増加した発現また免疫染色陽性は癌の病理分期、生存率及び転移と相関性があった。multivariate Cox regression 解析はPDGFRA免疫染色陽性が有意義の予後因子であることを示した。ミューテーションの解析した結果はPdgfra遺伝子において、三つのミューテーション (Exon18, 824 C>T; Exon13, 603 G>A; Exon10, 603 G>A) が発見し、それらのミューテーションは患者においてそれぞれ60%, 46%と23%があった。さらに、PDGFRAの抑制剤sunitinib malate及びimatinib mesylateは胆管癌患者由来胆管癌細胞株の増殖及び癌細胞のmigrationを抑制した。また、sunitinib malateの抑制によって、胆管癌細胞のPdgfraシグナル経路に関連する遺伝子Pdgfa, Pdgfb, Pdgfra, Akt, Pdpk1及びStat3の発現は低下になった。結果はPdgfraシグナル経路が感染による胆管癌の増殖や転移などに重要な役割を立つことを示唆した。また、診断・治療の標的遺伝子として期待される。

5) c-skiがTGF- β シグナル経路を抑制することによってタイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌に関与する

TGF- β シグナル経路はきわめて多様で細胞の分化・増殖さらに細胞機能の調節に深く

関与する。Smadファミリーの分子群やc-skiなどは制御因子として、このシグナル経路を制御する。強力な細胞増殖抑制作用を持つ癌抑制因子であり、シグナル経路の発現の異常により、癌細胞の増殖を促進し、運動性や浸潤能を亢進する。この経路はタイ肝吸虫感染による発癌に関与することを解明するために、TGF- β 、smad4及びc-skiの発現を検討した。シグナルの抑制制御因子であるc-skiの発現は感染による発癌の過程に著しく増加した。免疫染色はこの増加した発現が発癌動物及び胆管癌患者の腫瘍組織の胆管上皮細胞質に局在することを示した。また、同様にTGF- β 及びSmad4の発現も高くなり、発現動態は発癌過程に一致した。結果はc-skiがTGF- β シグナリを抑制することによって、TGF- β の細胞増殖抑制能力が低下になり、癌細胞の増殖を促進することを示唆した。

6) タイ肝吸虫感染が起した慢性炎症による肝臓の解毒能力の低下、DNA損傷、DNAメチル化は癌化の起因である

タイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌の一つ原因は感染が起した慢性炎症による肝臓の解毒能力の低下、フリーラジカルや肝吸虫分泌物及び代謝産物の分解能力の低下、DNA損害やDNAメチル化発生と考えられている。NOS代謝に関わる酸化還元酵素 (Idh1, Idh2, Hgd)、肝臓に解毒を行う酵素CYP3A4, 1A2, 2B6, 2D6, 2C18及びそれら酵素の発現の転写を制御する因子 (Ahr, Pxr, Car) の発現は感染発癌動物モデル及び胆管癌患者の腫瘍組織において低下になり、肝吸虫感染が起した慢性炎症によるNOSなど有害物質の解毒代謝の低下が癌化の起因になると考えられる。さらに、5-aza-dcの脱メチル処理は胆管癌細胞の増殖を抑制し (50-80%)、細胞のmigration及びinvasionを抑制した。脱メチル処理された癌細胞には細胞増殖因子 (Vegfa, Pdpk1, galectin-1, galectin-3)、細胞周期因子 (cyclin D1, Cdk4)、癌化因子 (Pten, catenin, S100A2, S100P, Tif1a, Tif1g) 及び抗アポトーシス因子 (Bcl2, Flip, Trail) の発現が抑制され、Rbシグナル因子 (Rb1, p16)、CYP酵素の制御因子 (Pxr, Car) の発現が増加した。これらの結果は肝吸虫

感染によるDNAメチル化が発癌の一つ原因であることを示唆した。

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 12 件)

- 1) Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Boonjaraspinyo S, Pinlaor S, Pairojkul C, Chamgramol Y, Takahashi Y. Alteration of galectin-1 during tumorigenesis of *Opisthorchis viverrini* infection-induced cholangiocarcinoma and its correlation with clinicopathology. *Tumour Biol.* 2012 Feb 29.
- 2) Wonkchalee O, Boonmars T, Aromdee C, Laummaunwai P, Khunkitti W, Vaeteewoottacharn K, Sriraj P, Aukkanimart R, Loilome W, Chamgramol Y, Pairojkul C, Wu Z, Juasook A, Sudsarn P. Anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective effects of *Thunbergia laurifolia* Linn. on experimental opisthorchiasis. *Parasitol Res.* 2012 Feb 11.
- 3) Boonjaraspinyo S, Wu Z, Boonmars T, Kaewkes S, Loilome W, Sithithaworn P, Nagano I, Takahashi Y, Yongvanit P, Bhudhisawasdi V. Overexpression of PDGFA and its receptor during carcinogenesis of *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma. *Parasitol Int.* 61:145-50, 2012
- 4) Wonkchalee O, Boonmars T, Kaewkes S, Chamgramol Y, Aromdee C, Wu Z, Juasook A, Sudsarn P, Boonjaraspinyo S, Pairojkul C. Comparative studies on animal models for *Opisthorchis viverrini* infection: host interaction through susceptibility and pathology. *Parasitol Res.* 110:1213-23, 2012
- 5) Juasook A, Boonmars T, Kaewkes S, Loilome W, Veteewuthacharn K, Wu Z, Yongvanit P. Anti-inflammatory effect of prednisolone on the growth of human liver fluke in experimental opisthorchiasis. *Parasitol Res.* 2011, Dec 21.
- 6) Wu Z, Boonmars T, Boonjaraspinyo S, Nagano I, Pinlaor S, Puapairoj A, Yongvanit P, Takahashi Y. Candidate genes involving in tumorigenesis of cholangiocarcinoma induced by *Opisthorchis viverrini* infection. *Parasitol Res* 109:657-73, 2011
- 7) Tantrawatpan C, Intapan PM, Thanchomnang T, Lulitanond V, Boonmars T, Wu Z, Morakote N, Maleewong W. Differential detection of *Trichinella papuae*, *T. spiralis* and *T. pseudospiralis* by real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis. *Vet Parasitol.* 185:210-5, 2011
- 8) Boonjaraspinyo S, Boonmars T, Aromdee C, Puapairoj A, Wu Z. Indirect effect of a turmeric diet: enhanced bile duct proliferation in Syrian hamsters with a combination of partial obstruction by *Opisthorchis viverrini* infection and inflammation by N-nitrosodimethylamine administration. *Parasitol Res* 108:7-14, 2011
- 9) Wonkchalee O, Boonmars T, Kaewkes S, Chamgramol Y, Pairojkul C, Wu Z, Juasook A, Sudsarn P, Boonjaraspinyo S. *Opisthorchis viverrini* infection causes liver and biliary cirrhosis in gerbils. *Parasitol Res* 109:545-51, 2011
- 10) Boonmars T, Wu Z, Boonjaraspinyo S, Puapairoj A, Kaewsamut B, Nagano I, Pinlaor S, Yongvanit P, Wonkchalee O, Juasook A, Sudsarn P, Srisawangwong T. Involvement of c-Ski Oncoprotein in Carcinogenesis of Cholangiocarcinoma Induced by *Opisthorchis viverrini* and N-nitrosodimethylamine. *Pathol Oncol Res* 17:219-27, 2011
- 11) Sriraj P, Boonmars T, Boonjaraspinyo S, Kaewsamut B, Srisawangwong T, Sithithaworn P, Wu Z. Effect of curcumin on pathogenesis of hamster-opisthorchiasis through apoptosis-related gene expression. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 40:1208-15, 2009.
- 12) Boonmars T, Wu Z, Boonjaraspinyo S, Pinlaor S, Nagano I, Takahashi Y, Kaewsamut B, Yongvanit P. Alterations of

gene expression of RB pathway in
Opisthorchis viverrini
infection-induced cholangiocarcinoma.
Parasitol Res. 105:1273-81, 2009.

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Sirintip Boonjaraspinyo, Zhiliang Wu, Thidarut Boonmars, Isao Nagano, Sasithorn Kaewkes, Watchalin Loilome, Puangrat Yongvanit, Vajarabhongsa Bhudhisawasdi, Yuzo Takahashi: Involvement of platelet-derived growth factor alpha in tumorigenesis of cholangiocarcinoma induced by Opisthorchis viverrini infection. 第 80 回日本寄生虫学会大会、2011 年 7 月 18 日
- 2) 呉 志良、Sirintip Boonjaraspinyo、Thidarut Boonmars、長野 功、Anucha Puapairoj、Butsara Kaewsamut、Puangrat Yongvani、浅野一信、高橋優三：タイ肝吸虫 (Opisthorchis viverrini) 感染による胆管癌の発癌の分子機序の研究、第 80 回日本寄生虫学会大会、2011 年 7 月 18 日
- 3) Boonmars T, Boonjaraspinyo S, Wu Z, Nagano I, Kaewkes S, Takahashi Y, Loilome W, Yongvanit P, Bhudhisawasdi V: Expression of Platelet-derived growth factor alpha in Cholangiocarcinoma and its Clinicopathological Significance. The Latest Advances in Liver Cancer Research, 2011 年 3 月 1 日
- 4) 呉 志良、Sirintip Boonjaraspinyo、Thidarut Boonmars、長野 功、浅野一信、高橋優三：タイ肝吸虫の感染による胆管癌における galectin 遺伝子の発現、第 66 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2010 年 11 月 6 日
- 5) 呉 志良、Thidurat Boonmars、長野 功、浅野一信、Sirintip Boonjaraspinyo、Somchai Pinlaor、Butsara Kaewsamut、Puangrat Yongvanit、高橋優三：RB シグナル経路はタイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌に関与する、第 65 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2009 年 11 月 8 日

[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

呉 志良 (WU ZHILIANG)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90313874

(2) 研究分担者

長野 功 (NAGANO ISAO)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40283296

(3) 研究協力者

Thidarut Boonmars
タイコンケン大学・医学部・准教授
研究者番号：