

## 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 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591770

研究課題名（和文）ヒト正常胆嚢上皮と胆嚢癌におけるアクアポリンの役割解析

研究課題名（英文）The role of Aquaporins in normal gall bladder epithelium and gall bladder cancer

## 研究代表者

塚田 一博 (Tsukada Kazuhiro)

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・教授

研究者番号：90171967

## 研究成果の概要（和文）：

胆嚢癌の組織マイクロアレイにおいて AQP1 発現が 41%、AQP5 発現が 59%に認められた。特に AQP5 発現は腫瘍進達度や漿膜浸潤との逆相関を認め、さらにゲムシタビンに感受性があり、AQP-5 発現症例は予後良好であった。胆嚢癌細胞株 NOZ-1 において AQP-5 発現を認め、SiRNA による AQP-5 抑制にて細胞の増殖能、浸潤能、運動能が抑制された。NOZ-1 の miRNA のマイクロアレイ解析でゲムシタビン感受性に関係する miRNA を数種類同定し、そのターゲットであるタンパク質を同定した。これらの成果により AQP5 が胆嚢癌の発癌進展、薬剤感受性に関与し、胆嚢癌の分子標的になり得ることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We examined AQP expression of gall bladder cancer by tissue microarray. In gall bladder cancer, expression of AQP-1 and AQP-5 was observed in 41% and 59% respectively. AQP-5 expression had inverse association with depth of tumor and positive association with gemcitabine sensitivity. Thus, the patients with positive AQP-5 expression had favorable prognosis. SiRNA treatment for AQP-5 positive gall bladder cancer cell line (NOZ-1) inhibited the growth, invasion and mobility of the cells. We identified several miRNAs that can predict Gemcitabine sensitivity of NOZ-1 by microarray analysis. We also identified the target proteins of detected miRNA. Our results suggest that AQP-5 is promising target of gall bladder cancer treatment.

## 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	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 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・消化器外科学

キーワード：胆道外科学

## 1. 研究開始当初の背景

胆嚢癌はやや女性に多く、高齢化社会に向けて増加している癌の一つである。私たちは外科治療を積極的に行い、(Tsukada K et al *Br J Surg* 1992) 早期癌はほぼ 100%生存が可能で、進行癌切除例でも世界のトップの成績である。(Tsukada K et al *Surgery* 1996)。しかし、リンパ節転移 (Tsukada K et al *Cancer* 1997) や肝浸潤 (Shirai Y, Tsukada K et al. *Cancer* 1995) 等の検討を行ったが、その進展や病態には不明な点が多い。特に胆嚢癌においては胆石症などに比較して胆汁中胆汁酸濃度が低い。これは胆嚢管の閉塞も関与するが胆嚢壁における水やイオンチャンネルの変化が関与している可能性が示唆される。従って、癌との関連が注目される水チャンネル Aquaporin と胆嚢癌における検討が重要と考えられ、本研究を立案した。

### Aquaporin の機能と癌

- ① Aquaporin (AQP) は、細胞形質膜上に存在する約 30 kDa の 6 回膜貫通型タンパクであり、細胞内ループ B・細胞外ループ E にある一対の Asn-Pro-Ala (NPA) モチーフが水を通す孔を形成する水チャンネルである (Verkman et al., 2000)。AQP は、現在までに、AQP0~12 の少なくとも 13 アイソフォームが同定されていて (Magni et al., 2006)、水分子だけを通過させる AQP1,2,4,5,8 と、グリセリンや尿素等の低分子も通過させ aquaglyceroporin と称される AQP3,7,9,10 の二種類に大別される (Kozono et al., 2002)
- ② AQP family の中では AQP-1 が消化管全般に発現しているが組織アレイでは特に、肛門、胆嚢、肝に AQP1 の高発現が認められている。(Mobasher A 2004)。さらに胆嚢では AQP-1 のみならず AQP-8 の発現亢進が認められ、これらの発現が胆嚢における吸収と分泌に関与していることが示唆されている (Takata K et al. 2004)。また最近、leptin 欠損マウスの胆嚢で AQP-4 の発現低下が報告されて、leptin 分泌が胆嚢機能に関与していることが新たに報告された。(Swarts-Basile et al 2007)
- ③ しかしながら AQP の癌における役割についてはほとんど解析されていない。わずかに大腸癌、卵巣癌において、正常組織に発現しない AQP5 が卵巣癌では境界型腫瘍、大腸癌では腺腫の段階で発現が認められはじめ、癌組織で高発現していることが報告されているにすぎない (Moon et al., 2003, Yang et al., 2006)。また肺癌では高分化型に有意に AQP3 が発現すると報告されている (Liu et al., 2006)。
- ④ 癌の特性との関連では AQP1 が多くの癌

の新生血管で発現が確認されている

(Mobasher et al., 2005)。AQP1 は、悪性黒色腫細胞株と乳癌細胞株において細胞移動時にその細胞の先端に高発現し、水の透過性を増して形態変化を容易にすることで仮足の形成を助け、細胞の転移能を亢進させる機能を持つ可能性があるとされている (Hu and Verkman, 2006)。しかし一般に、癌組織における AQP の機能は、この AQP1 以外には解明されていない。

これまでの解析結果 (胃癌・食道癌・培養上皮)

- ① 胃癌で胃底腺領域 (胃上・中部) の正常粘膜に発現しない AQP5 が、同領域の分化型癌組織に特異的に発現 (癌腺管内腔 apical 側を覆う様に強く発現) していたが、未分化型癌組織では AQP5 の発現が誘導されていなかった。このことから AQP5 が胃癌の分化度に関連することが示唆された。AQP5 の遺伝子導入により、低分化胃癌細胞株において、laminin5 の発現量増加と細胞の分化マーカーである alkaline phosphatase 活性値の上昇を来し、細胞増殖、転移浸潤能が抑制されることが判明している。
- ② 食道癌では我々が開発した高感度・高精度の 3D gene chip によりマイクロアレイ解析を行い、AQP1 と AQP3 の発現低下または消失を認め、AQP3 がリンパ節転移を予測するマーカーであることを見いだした。(NEDO プロジェクト)。これらのことから、癌組織においては、AQP は細胞骨格系と機能関連し、細胞を一定の容積・形態に維持することで、癌の異常増殖に抑制的に働いている可能性が考えられた。
- ③ 胆嚢癌細胞株の樹立。現在まで TK-1, TK-2 のヌードマウス可移植胆嚢癌細胞株を樹立している。これまでに食道癌 4 5 株 (Shimada Y et al. *Cancer* 1992)、膵癌 8 株 (Kato M, Shimada Y et al. *Cancer* 1999) を樹立し種々の研究に応用してきたが、この技術を応用し、胆嚢癌培養細胞株の樹立を開始している。
- ④ 癌の発癌および悪性度解析、分子標的解析では癌細胞のみならず、対象となる正常細胞培養技術が不可欠であるが、消化管上皮の培養はほとんど成功してこなかった。我々は以前からヒト正常食道上皮の培養に取り組み継代可能なヒト食道上皮細胞株を樹立し (Oncogene 2003, Life Science 2004,) 培養手技を確立してきた。この技術を応用し、胆嚢上皮細胞の培養にも取り組み、短期培養を成功させた。
- ⑤ mRNA のみならず microRNA のマイクロアレイの解析技術を確立している。(基盤研究 B 2007-2008)

## 2. 研究の目的

消化器癌の中でも悪性度の高い胆嚢癌に焦点を絞り、AQPの胆嚢癌における発現解析と転移浸潤に対する役割解析を行うことを計画した。

- ①AQP familyの胆嚢上皮における発現とその機能を明らかとしたい。特に胆汁濃縮機能との関係を明らかとする。
- ②AQP familyの胆嚢癌、胆嚢炎、腺腫での機能を解析し、発癌への関与を明らかとする。
- ③AQP familyの胆嚢癌の転移浸潤における関与を明らかとし、分子標的となりうるかどうかを解明する。
- ④AQP familyが胆嚢癌の補助療法感受性に関係するかどうかを明らかとする。
- ⑤マイクロアレイ解析により、胆嚢上皮および胆嚢癌におけるAQPに関連するカスケードを通じて分子標的を明らかとし、AQPに関連するmicroRNAを明らかとする。

## 3. 研究の方法

- ①正常胆嚢切除粘膜、切除胆嚢炎粘膜、切除胆嚢腺腫粘膜、切除胆管壁粘膜、切除胆嚢癌、培養胆嚢上皮、培養胆嚢癌細胞株、ヌードマウス可移植胆嚢癌細胞株における網羅的遺伝子発現解析を行い、各段階に於けるAQPの発現を動的に解析する。
- ②当科における切除胆嚢癌、胆管癌、膵癌のパラフィンブロックより網羅的解析が行える組織アレイを構築し、①にて絞り込んだAQPについて発現解析を行う。
- ③組織アレイにおける各AQP発現と患者予後、リンパ節転移、腹膜播種、血行性転移などとの臨床病理学的所見との関連を解析する。
- ④AQPと関連するカスケード及びターゲット遺伝子を同定する。
- ⑤マイクロアレイと同時にmicroRNAのマイクロアレイを行いAQP発現と関連するmicroRNAを同定する。
- ⑥Gemcitabine, に対する感受性をin vitroおよびin vivoにて解析し、AQPとの関連を解析する。
- ⑦同定されたAQPについて転移浸潤との関係をトランスウェル、マトリゲルにて確認する
- ⑧ヌードマウス移植腫瘍をさらに追加作成する。培養細胞株も順次作成する。
- ⑨胆嚢上皮の継代培養の培養条件を確立する。

## 4. 研究成果

①まず、絞り込みのために胆膵領域の上皮において発現が報告されているAQP1, AQP4, AQP8と、胃癌・大腸癌等で発現が報告されているAQP5に関して24例の組織アレイ(TMA1150)にてパイロット解析を行ったところ胆嚢癌にてAQP1(22.2%)、AQP4

(31.5%)、AQP5(82.4%)、AQP8(0%)の発現を認めた。

②正常胆嚢粘膜ではAQP5発現は一部の化生性変化部分に認めるのみであることから胆嚢発癌への関与が示唆された。一方AQP1, AQP4, AQP8発現はAQP5に比して低発現であり、胆嚢癌における関与は少ないものと考えられた。

③またAQP5は肝癌24/27例(88.9%)、胆管癌(24/32例:75%)、乳頭部癌(7/8例:87.5%)、膵癌(14/23例:60.9%)と、いずれも高率に発現しており、肝・胆・膵癌系に普遍的に作用していることが示唆された。

④次いで臨床データが整っている最近の症例(1997~2010年)51例に対し、新規に組織マイクロアレイを作成し、免疫染色にて網羅的にAQP1, 4, 5, 8を解析した。発現の割合は、AQP1(41%)、AQP4(22%)、AQP5(59%)、AQP8(6%)であった。臨床病理学的所見との関連では特にAQP5発現と腫瘍浸潤度や漿膜浸潤との逆相関を認め、AQP-5発現症例は予後良好であった。

⑤当科にて初代培養を行った胆嚢癌細胞株(TYGBK-1)を用い、AQP1~10の発現を解析したところ、RT-PCRにおいてもAQP5の発現が顕著であった。

⑥胆嚢癌細胞株NOZ-1においてもAQP-5発現を認め、siRNAによるAQP-5抑制にて細胞の増殖能、浸潤能、運動能が抑制された。

⑦さらにAQP-5発現症例はゲムシタビン、5FUに感受性があり予後良好であった。

⑧NOZ-1のmiRNAのマイクロアレイ解析でゲムシタビン感受性に関係するmiRNAを数種類同定した。この中でmiR-21のターゲットであるPTENが患者予後に寄与することが判明し、特にAQP-5発現とPTEN同時発現症例で予後が良好であることが判明し、胆嚢癌のバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

⑨またAQP-5発現症例は黄疸時の減黄率が良好であり、AQPが胆汁濃縮に関与している事が示唆された。これらの結果から、胆汁濃縮機構の破綻が胆嚢発癌に関与する事が示唆された。

## 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)

[雑誌論文] (計4件)

1、Sekine S, Shimada Y, Nagata T, Moriyama M, Omura T, Watanabe T, Hori R, Yoshioka I, Okumura T, Sawada S, Fukuoka J, Tsukada K. Prognostic significance of aquaporins in human biliary tract carcinoma  
Oncology Reports. (査読あり) 2012 In

press doi: 10.3892/or.2012.1747

2、Watanabe T, Fujii T, Oya T, Horikawa N, Tabuchi Y, Takahashi Y, Mori M, Takeguchi N, Tsukada K, Sakai H. Involvement of aquaporin-5 in differentiation of human gastric cancer Cells. (査読あり) J Physiol Sci 59, 2009, 113-122)

3、塚田一博 嶋田 裕, 坂東 正. 手術の王道Ⅱ-肝・胆・膵・脾の手術 胆嚢癌手術—必要最小限手術の選択 消化器外科 (査読なし) 31, 2009, 1985-1991.

4、塚田一博、嶋田 裕, 長田拓哉, 澤田成朗, 森田誠市, 奥村知之, 吉岡伊作, 松井恒志, 大澤宗士, 関根慎一 消化器癌の診断・治療 胆嚢癌 診断と外科治療の選択 消化器外科 (査読なし) 32, 2009, 869-873

[学会発表] (計 7 件)

1、 関根慎一、澤田成朗、森山亮仁、大村哲也、大澤宗士、橋本伊佐也、北條莊三、渡邊智子、吉岡伊作、松井恒志、堀 亮太、吉田 徹、長田拓哉、魚谷英之、嶋田 裕、福岡順也、塚田一博 胆嚢癌における Aquaporin 発現と腫瘍進展について 第 9 回日本消化器外科学会大会 2011, 10, 20~23 福岡

2、Sekine S, Sawada S, Moriyama M, Omura T, Yoshioka I, Matsui K, Okumura T, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K The effects of gemcitabine in human gallbladder carcinoma cell lines Asian Pacific HPBA Congress 2011 2011, 9, 27-30 メルボルン

3、関根慎一、嶋田 裕, 森山亮仁, 小島博文, 大澤宗士, 北條莊三, 渡邊智子, 吉岡伊作, 松井恒志, 堀 亮太, 奥村知之, 澤田成朗, 吉田 徹, 長田拓哉, 魚谷英之, 塚田一博 胆嚢疾患における Aquaporin5 の発現について. 第 8 回日本消化器外科学会大会 2010. 10. 15 横浜

4、 関根慎一、嶋田 裕, 大澤宗士, 北條莊三, 奥村知之, 澤田成朗, 長田拓哉, 塚田一博 ヒト胆嚢癌における Aquaporin の発現解析第 69 回日本癌学会学術総会 2010. 9 大阪

5、嶋田 裕、奥村知之, 大澤宗士, 関根慎

一、森山亮仁, 小島博文, 北條莊三, 山口哲也, 渡邊智子, 松井恒志, 吉岡伊作, 澤田成朗, 吉田 徹, 長田拓哉, 魚谷英之, 塚田一博 組織アレイによる消化器癌における網羅的 Aquaporin 発現解析 第 96 回日本消化器病学会 2010. 4. 22 新潟

6、 Osawa S, Shimada Y., Sekine S., Sawada S., Kashima S., Fukuoka J., Okumura T., Tsukada K. Prognostic significance of Aquaporin (AQP) expression in gastric and colorectal cancer. American Association of Cancer Research 2010.4.19 Washington

7、渡邊智子、酒井秀紀、塚田一博、嶋田 裕、廣川慎一郎、魚谷英之、長田拓哉、田澤賢一、吉田 徹、澤田成朗、森田誠市。ヒト胃癌における Aquaporin-5 の発現及び臨床経過についての検討 第 109 回日本外科学会定期学術集会 2009 年 4 月 3 日 福岡

[図書] (計 1 件)

塚田一博、奥村知之、吉岡伊作 メディカルビュー社 2010 48-64 胆嚢癌：胆嚢床切除～S4a・S5 切除, 胆管切除. 「Digestive Surgery 胆・膵外科手術」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚田 一博 (Tsukada Kazuhiro)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授  
研究者番号：90171967

(2) 研究分担者

嶋田 裕 (Shimada Yutaka)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授  
研究者番号：30216072

奥村 知之 (Okumura Tomoyuki)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教  
研究者番号：10533523

吉岡 伊作 (Yoshioka Isaku)  
富山大学・大学病院・助教  
研究者番号：30436430