

## 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25年4月27日現在

機関番号：32653  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591530  
 研究課題名（和文） 肝内胆管癌の悪性挙動を制御する糖鎖分子の探索と新しい分子標的治療への応用  
 研究課題名（和文） Exploration of carbohydrate molecules that regulate malignant behaviors of intrahepatic cholangiocarcinoma, and application for the development of novel molecular-targeting therapy.  
 研究代表者  
 有泉 俊一（ARIIZUMI SYUNNICHI）  
 東京女子医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：40277158

研究成果の概要（和文）：癌細胞表面の糖鎖構造はその悪性挙動を始めとする腫瘍生物学に深く関与する。糖転移酵素である *N*-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) は癌の増殖・転移に必須の分子である。そこで、胆嚢癌および肝内胆管癌における GnT-V 発現を免疫組織学化学にて解析した。その結果、胆嚢癌では陽性例は陰性例と比較し有意に予後不良であり、術後に遠隔臓器転移再発をきたす傾向にあった。しかし、肝内胆管癌では臨床病理学的意義を見出すには至らなかった。GnT-V を標的とした胆道癌治療は有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It is a well-known fact that oligosaccharide structures are dramatically changed in carcinogenesis including malignant transformation. *N*-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) enhances the malignant behaviors of carcinoma cells such as proliferation, invasion and metastasis. In this study, the immunohistochemical expression of GnT-V was studied in the tissue sections of gallbladder carcinoma and those of intrahepatic cholangiocarcinoma. The results revealed that in gallbladder carcinoma, the post-surgical prognosis was significantly poorer in the cases of positive staining than in those of negative staining and, moreover, that the post-surgical recurrence rate tended to be higher in the former than in the latter. However, in cholangiocarcinoma, the immunohistochemical expression of GnT-V did not give any clinicopathological significance. A molecular-targeting therapy against GnT-V may be useful in the treatment of biliary tract cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科

キーワード：肝内胆管癌，胆嚢癌，糖鎖医学，糖転移酵素，分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

胆道癌および肝内胆管癌は膵癌と並び完全治癒の期待出来ない難治性の癌と位置付

けられており、その生命予後は未だ改善されていない。これら癌腫は、術後の肝内、リンパ節および腹膜への遠隔臓器転移の頻度は

高率であり重要な予後因子である。これら遠隔臓器転移に対して、本邦では新規抗癌化学療法剤が使用され延命効果が期待されるようになったものの、随伴する黄疸による肝機能の低下や血液系への高率な有害事象のため治療を断念せざるを得ない症例も多い。治療成績の向上には、早期診断のための鋭敏な分子マーカーの探索に加え、癌の悪性挙動にかかわる腫瘍生物分子を同定し、それらの分子を標的とした生体に低侵襲で効果的な治療法を開発することが急務である。

糖鎖は「細胞の顔」とも呼ばれており、上皮細胞の表面形質である粘液糖蛋白の糖鎖構造は癌化により変化することが知られている。糖蛋白に付加した糖鎖は、受容体機能を修飾することより、癌の発生や進展の生物機能と密接にリンクしている。最近の基礎研究の成果により、アスパラギン結合型糖鎖分岐鎖構造を決定する糖転移酵素 N-アセチルグルコサミン転移酵素-V (GnT-V) の発現が、**・1-6 鎖の糖鎖構造の増加により癌細胞の悪性挙動に関与すると報告されている。**

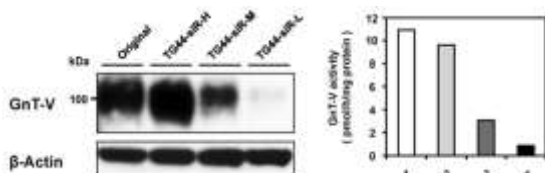
## 2. 研究の目的

胆嚢癌 147 例および肝内胆管癌の治癒切除 72 例を対象とし、GnT-V 発現を免疫組織学化学にて解析し、その結果を臨床病理学的因子および術後予後と比較検討した。また、胆嚢細胞に GnT-V siRNA を導入し、がん細胞の悪性挙動に関して GnT-V の果たす役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 胆嚢癌および肝内胆管癌の病理標本を対象に GnT-V の免疫染色を施行する。また、臨床病理学的データと比較検討する。  
 (2) 胆嚢癌および肝内胆管癌の症例より樹立された細胞株を用いて、野生細胞株、GnT-V siRNA 導入細胞株を作製する。さらに、遺伝子導入細胞株のそれぞれについてルシフェーゼ遺伝子を導入した細胞株を作製する。GnT-V の発現量と活性の観点より、活性低下なし、活性中等度低下、活性高度低下の細胞の 3 種類を選択した (図 1)。

図 1



(3) *In vitro* の系における細胞増殖能について WST assay にて解析する。  
 (4) *In vivo* の系において皮下腫瘍モデルを作製し、皮下腫瘍の増殖能を解析する。また、CD31 の免疫染色を行い、組織標本における腫瘍周囲の微小血管数を計測して血管新生能

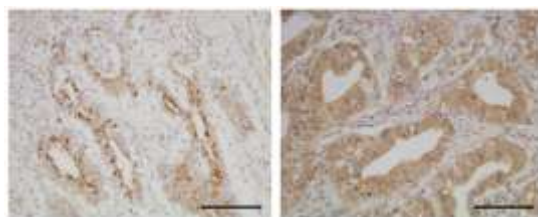
について評価する。

(5) 遺伝子導入細胞株のそれぞれにルシフェーゼ遺伝子を導入した細胞株を用いて、癌細胞をヌードマウスに経脾的に投与して、肝転移と腹膜播種転移巣の形成状況について超高感度カメラによるシグナル検出装置を用いて確認する。

## 4. 研究成果

(1) GnT-V の免疫組織学的発現は細胞核上に顆粒状に染色される発現型 (granular-type) と細胞質全体がびまん性に染色されるタイプ (diffuse-type) に分類された (図 2)。

図 2



胆嚢癌: Diffuse-type は非治癒切除例において有意に高率であった。GnT-V 発現の有無と発現型はいずれも、病理組織学的因子との間に有意な相関関係は認められなかった。治癒切除の 5 年生存率は GnT-V 陽性例で 66%、陰性例で 88% であり、陽性例で有意に予後不良であった ( $P = 0.028$ )。陽性例では術後に、遠隔臓器転移とリンパ節転移が有意に高率であった。また、陽性例のうち granular-type と diffuse-type の間については予後の差は認められなかったが、同時性または異時性に遠隔臓器転移を認めた症例では有意に diffuse-type の症例が多かった ( $P = 0.006$ )。肝内胆管癌: GnT-V 発現の有無と病理組織学的因子との間に有意な相関関係は認められなかった。GnT-V 陽性例は陰性例と比較し術後 5 年生存率は高い傾向にあったが有意差を認めなかった。 ( $P = 0.31$ ) また、GnT-V 発現の有無と術後再発率、再発様式との間に有意差は認めなかった。

(2) GnT-V siRNA を導入した胆嚢癌において、GnT-V の発現と活性が高値である細胞は、それらが低値である細胞に比較して、細胞増殖能、皮下腫瘍の増殖能 (図 3)、血管新生能、遠隔臓器転移能 (図 4) は有意に高値を示した。胆嚢癌における GnT-V の発現とその活性は、腫瘍の増殖能および進展能、血管新生能、転移能に関与している可能性が示唆された。

図 3

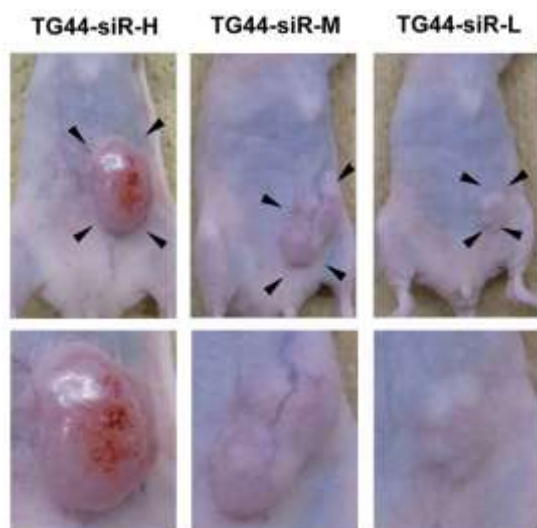
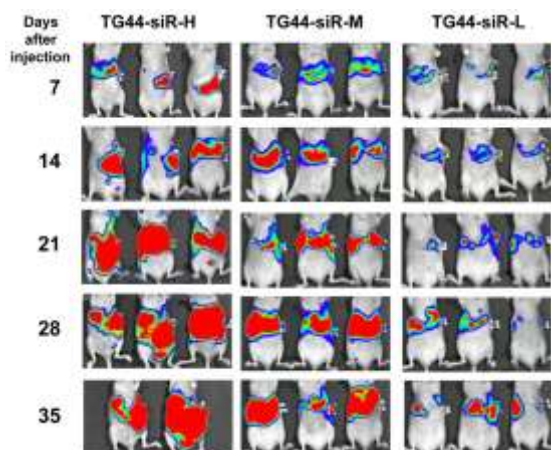


図 4



### 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 18 件)

- ① Ariizumi S, Kotera Y, Takahashi Y, Katagiri S, Yamamoto M: Impact of hepatectomy for huge solitary hepatocellular carcinoma. J Surg Oncol 2013, In press.
- ② Katagiri S, Ariizumi S, Kotera Y, Takahashi Y, Yamamoto M: Right hepatectomy using Glissonean pedicle transection method with anterior approach (with video). J Hepatobiliary Pancreat Sci 19:25-9, 2012.
- ③ Ohki T, Yamato M, Ota M, Takagi R, Murakami D, Kondo M, Sasaki R, Namiki H, Okano T, Yamamoto M: Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. Gastroenterology 143:582-588, 2012.
- ④ Yamamoto M, Katagiri S, Ariizumi S, Kotera Y, Takahashi Y: Glissonean pedicle transection method for liver surgery (with video). J Hepatobiliary Pancreat Sci 19:3-8, 2012.
- ⑤ Nakayama M, Yamada N, Kumashiro Y, Kanazawa H, Yamato M, Okano T: Thermoresponsive poly (N-isopropylacrylamide)- based block copolymer coating for optimizing cell sheet fabrication. Macromol Biosci 12:751-60, 2012.
- ⑥ Seto K, Shoda J, Horibe T, Warabi E, Ishige K, Yamagata K, Kohno M, Yanagawa T, Bukawa H, Kawakami K: Interleukin-4 receptor  $\alpha$ -based hybrid peptide effectively induces antitumor activity in head and neck squamous cell carcinoma. Oncology Report 2013, In press.
- ⑦ Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, Miyoshi E, Shoda J: Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. J Gastroenterol 2013, In press.
- ⑧ Shoda J, Ishige K, Sugiyama H, Kawamoto T: Biliary tract carcinoma: clinical perspective on molecular targeting strategies for therapeutic options. JHBPS 19:342-353, 2012.
- ⑨ Suzuki R, Ariizumi S, Araidai T, Hayashi K, Yamamoto M: Gastrectomy and chemotherapy with S-1 for gastric cancer in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Int J Clin Oncol 16:71-5, 2011.
- ⑩ Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J: Potent *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. J Gastroenterol 46:779-789, 2011.
- ⑪ Ariizumi S, Kotera Y, Takahashi Y, Katagiri S, Chen IP, Ota T, Yamamoto M: Mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma with marked enhancement on arterial-phase computed tomography reflects favorable surgical

- outcomes. *J Surg Oncol* 104:130-9, 2011.
- ⑫ Furukawa T, Hatori T, Fujita I, Yamamoto M, Kobayashi M, Ohike N, Morohoshi T, Egawa S, Unno M, Takao S, Osako M, Yonezawa S, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Yamaguchi H, Ban S, Shimizu M.: Prognostic relevance of morphological types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gut* 60:509-16, 2011.
- ⑬ Takahashi H, Nakayama M, Itoga K, Yamato M, Okano T.: Micropatterned thermoresponsive polymer brush surfaces for fabricating cell sheets with well-controlled orientational structures. *Biomacromolecules* 12:1414-8, 2011.
- ⑭ Imai K, Yamamoto M, Ariizumi S.: Surgery for periductal infiltrating type intrahepatic cholangiocarcinoma without hilar invasion provides a better outcome than for mass-forming type intrahepatic cholangiocarcinoma without hilar invasion. *Hepatogastroenterology* 57:1333-6, 2010.
- ⑮ Ariizumi S, Kotera Y, Yamamoto M.: Favorable long-term surgical outcomes of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B envelope antibody. *J Surg Oncol* 101:471-5, 2010.
- ⑯ Akimoto J, Nakayama M, Sakai K, Okano T.: Thermally controlled intracellular uptake system of polymeric micelles possessing poly (N-isopropylacrylamide)-based outer coronas. *Mol Pharm* 7:926-35, 2010.
- ⑰ Higuchi R, Ota T, Araida T, Kobayashi M, Furukawa T, Yamamoto M.: Prognostic relevance of ductal margins in operative resection of bile duct cancer. *Surgery* 148:7-14, 2010.
- ⑱ Matsuda A, Kuno A, Kawamoto K, Matsuzaki H, Irimura T, Ikehara Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yamamoto M, Ohkohchi N, Shoda J, Hirabayashi J, Narimatsu H.: WFA-positive sialylated MUC1 is a high-sensitivity biliary marker for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 52:174-182, 2010.

[学会発表] (計5件)

- ① 樋口亮太, 梶山英樹, 谷澤武久, 小貫建一郎, 植村修一郎, 濱野美枝, 竹下信啓, 古川 徹, 太田岳洋, 新井田達雄, 山本雅一: 左三区切除兼肝外胆道切除にて切除し得た Binf 陽性胆嚢癌の1例. 第48

- 回日本胆道学会学術集会 (東京), 2012.
- ② 岡田浩介, 蕨 栄治, 正田純一. 疾病モデルより解明された肝病態に対する転写因子 Nrf2 の演じる生体防御機構. 第98回日本消化器病学会総会 (東京), 2012.
- ③ 岡田浩介, 蕨 栄治, 徳重克年, 石井哲郎, 橋本悦子, 正田純一. Nrf2/p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し, 肝腫瘍を発生する. 第48回日本肝臓学会総会 (東京), 2012.
- ④ 正田純一. 胆石の種類と成因. 日本胆道学会認定指導医養成講座3. 第48回日本胆道学会学術集会 (東京), 2012.
- ⑤ 正田純一: 胆管がんに対するハイブリッドペプチドの新しいバイオ療法 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」(東京), 2012.

[図書] (計6件)

- ① 正田純一: 胆道癌発生の分子機序 Annual Review 消化器 2011 中外医学社 (東京) pp.293-299, 2010.
- ② 正田純一: 胆道感染症 南江堂 (東京), pp.366-369, 2010.
- ③ 正田純一: 胆石症・胆道炎・胆道がん 胆石症 概念・定義と疫学 最新医学社 (大阪), pp.13-25 2011.
- ④ 正田純一: 漢方薬の有効性と医療科学 インチンコウ湯 漢方薬の薬効と薬理 日本伝統医学テキスト 漢方編 平成22・23年度厚生労働科学研究費補助金 地域医療基盤開発推進研究事業「統合医療を推進するための日本伝統医学の標準化」研究班 pp.295-297, 2012.
- ⑤ Shoda J: Inchinkoto, Clinical efficacy and pharmacology, Textbook of Traditional Japanese Medicine, Health and Labour Sciences Research Grant, Research on the standardization of traditional Japanese Medicine promoting integrated medicine. pp.230-232, 2012.
- ⑥ Shoda J & Yamamoto M: Gallbladder Cancer Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options. Horizons in Cancer Research. Volume 48. pp.1-24. NOVA Science, 2012.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有泉 俊一 (ARIIZUMI SYUNNICHI)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40277158

(2)研究分担者

山本 雅一 (YAMAMOTO MASAKAZU)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60220498

中山 正道 (NAKAYAMA MASAMITI)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00338980

正田 純一 (SHODA JUNICHI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：90241827

竹内 薫 (TAKEUCHI KAORU)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：00192162