

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590399

研究課題名(和文)胆管癌における胆管レベルによる発癌・進展機構の違い：胆汁酸受容体と糖代謝に関して

研究課題名(英文) Different mechanism of carcinogenesis and development in intrahepatic cholangiocarcinoma according to the level of bile ducts

研究代表者

相島 慎一 (Aishima, Shinichi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70346774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌は発生する胆管レベル(胆管の大きさ)によって、病理像とともにその母細胞、発癌経路、進展過程などが異なることが予想される。当初予定していた胆汁酸の代謝と受容体に関する検討は遂行が困難で断念し、本研究では、発癌に関わる酸化ストレス、Slit-ROB01経路による増殖シグナル、さらに糖代謝などが肝内胆管癌の発癌・転移に如何に関わるかについて、病理学的に検討した。その結果COX2発現はVEGF-C発現とリンパ節転移と相関しており、またROB01発現減弱が胆管癌細胞の増殖・移動能亢進に関わり、リンパ節転移を促し、Glucose transporter1は胆管癌の悪性度と正の相関を示した。

研究成果の概要(英文)：Intrahepatic cholangiocarcinomas (ICCs) consist of heterogenous carcinoma arising from different anatomical sites of the liver. This heterogeneity depends on that the origin of ICCs is different level of biliary tree based on the gross and histologic examination. We examined oxidative stress marker related with carcinogenesis, Slit-ROB01 signal pathway, and glucose metabolism in carcinogenesis and progression of ICCs, except we did not perform the investigation of bile acid and its receptor in ICC. As a results, 1) cyclooxygenase-2 (COX2) expression is associated with VEGF-C expression and presence of lymph node metastasis, 2) decreased expression of ROB01 by SiRNA in RBE cells is associated with proliferation and migration, and promote lymph node metastasis, and 3) Glucose transporter-1 (GLUT1) expression is related with aggressive phenotype of ICCs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：胆管癌 発がん 酸化ストレス 糖代謝 浸潤 増殖

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究概要としては、大型胆管に生じる胆管癌では、胆管内結石症、寄生虫感染、原発性硬化性胆管炎などによる慢性胆管炎を背景として、胆管上皮内異型病変が生じ、上皮内癌、浸潤癌へと進展していく多段階発癌が想定されている。一方で、肝内胆管癌の20-25%は肝炎ウイルス陽性であり、特に末梢型肝内胆管癌の発癌には肝炎ウイルスによる慢性肝炎、肝硬変が深く関わると考えられている。しかしながら、現在のところ慢性肝炎・肝硬変における胆管癌前駆病変は不明である。

2. 研究の目的

胆汁酸受容体と糖代謝に関して胆管癌は発生する胆管レベル(胆管の大きさ)によって、病理像とともにその母細胞、発癌経路、進展過程などが異なり、さらに癌治療の標的分子も異なることが予想される。したがって本研究では、1)胆管癌切除検体を肝内末梢型、肝内傍肝門型に分類し発癌・進展過程の相違を明らかにすること、2)胆道発癌に酸化ストレスと胆汁酸受容体が関わっているかどうかを明らかにすること、3)胆管癌細胞における糖代謝メカニズムを明らかにすること、4)上記の因子について胆管癌細胞株を用いた増殖・浸潤などの機能解析を行うことを具体的な研究課題とした。

3. 研究の方法

3-1)慢性胆管炎や慢性肝炎などでは酸化ストレス発現が高いことが知られており、これらの慢性炎症を背景として発癌する胆管癌およびその前駆病変であるBiliary intraepithelial neoplasia (BilIN)や Intraductal papillary neoplasm of the bile duct (IPNB)にも酸化ストレスが関わる可能性が考えられる。そこで酸化ストレスに関わるinducible nitric oxide(iNOS)と cyclooxygenase (COX2)発現について検討した。肝内胆管癌137例とIPNB 20例、胆管癌前駆病変のBilIN 40例、胆管癌リンパ節転移巢

(LN)27例を抽出し、ポリマー法による免疫組織化学染色にてそれぞれの病変における蛋白発現を陰性;<10%、陽性>=10%と評価し、臨床病理学的に解析した。

3-2)ROBO1は免疫グロブリンファミリーに属し、Slitシグナルを受け、腫瘍の血管新生や増殖に関わるといわれている。また近年さまざまな悪性腫瘍(乳癌、肺癌、大腸癌、子宮頸癌、グリオーマなど)において細胞膜受容体であるROBO1発現の低下が確認されている。ROBO1発現は肝細胞では発現がなく、正常胆管細胞には強発現していた。一方、Slit2は肝細胞と胆管細胞いずれも発現していた。肝内胆管癌においてROBO1とSlit2の発現を免疫組織化学的に検討した。

3-3)Glucose transporter (GLUT)は、糖の膜輸送に関わる膜タンパクで、臓器によってその発現しているタイプが異なり、多数の癌腫(食道癌、胃癌、大腸癌、乳癌、肝細胞癌、膵癌、腎癌、卵巣癌、子宮癌など)においてその発現が亢進しており、悪性度や予後と相関に関するといわれている。特にGLUT1は多くの癌腫で発現亢進が知られ、GLUT2は膵臓のランゲルハンス島や肝細胞での発現が報告されている。またGLUTは低酸素状態で誘導されるHIF-1の下流で発現が調節されている。肝内胆管癌切除例(n=149)およびBilIN病変(n=39)におけるGLUT-1、GLUT-2、HIF-1の発現評価および臨床病理学的因子や予後の相関について検討した。また胆管癌細胞株を用いたmigrationとinvasionに関する検討を行った。

4. 研究成果

4-1)慢性胆管炎に生じた反応性胆管上皮(n=16)とBilINでは、iNOS、COX2いずれも60%以上の症例で陽性であったが、BilINを異型度別に検討したところ、BilIN2の陽性率が低め

であった。IPNBでは非浸潤癌(n=12)においてiNOSは5例、COX2は6例が陽性であったが、浸潤癌(n=5)ではiNOSは1例、COX2は3例で陽性であり、症例数が少ないことから明らかな意義は見いだせなかった。肝内胆管癌においては、iNOSは29%に陽性、COX2は42%に陽性であり、iNOS陰性群とCOX2陽性群ではリンパ管侵襲例とリンパ節転移例が高率に見られ、さらにCOX2発現は癌細胞のVFGF-C発現と正の相関を示した。またリンパ節転移巣において、iNOSは22%が陽性であったのに対し、COX2は93%が陽性を示し、COX2陽性群は予後不良であった。以上よりiNOS、COX2のいずれの分子も発癌初期には発現増加がみられ、iNOSは悪性度の増加とともに発現が減弱するのに対し、COX2はリンパ節転移などの悪性度とともに発現が増加する、相反する動きを示すことが観察された。

4 - 2) ROBO1は59例(45%)で発現低下をきたし、Slit2は61例(46%)で発現低下をきたしていた。ROBO1発現低下例では腫瘍径大(p=0.015)、Ki67増殖活性高値(p=0.021)、Slit2発現低下(p=0.0005)と相関していた。Slit2発現低下例では神経周囲浸潤が高く(p=0.036)、リンパ節転移例が多かった(p=0.013)。また、ROBO1陰性群は予後不良であり(p=0.0207)、ROBO1発現は原発巣よりもリンパ節転移巣で低下していた。さらに、肝内胆管癌細胞株RBEにROBO1を強制発現させたところ、Cell growth assayによる増殖能と、Wound healing assayによる遊走能が顕著に抑制された、また、Huh28においてはSiRNAによるROBO1発現抑制によって、わずかに増殖能と遊走能が促進された。以上よりROBO1発現減弱によるSlit2/ROBO1経路の抑制によって、胆管癌の増殖能が上昇し、予後不良となる可能性が示唆された。

4 - 3) GLUT1は胆管癌の壊死周囲にみられや

すく、GLUT2は傍肝門型の胆管癌で発現が高く、GLUT1陽性群では腫瘍系が大きく(p=0.0031)、低分化で(p<0.0001)、リンパ管浸潤が高度で(p=0.0031)、リンパ節転移をきたしやすく(p<0.0001)、HIF-1 発現率が高い(p=0.0297)ことが明らかとなった。さらにGLUT1陽性例は予後不良であった。またGLUT1をSiRNAでノックダウンした胆管癌細胞株(RBE, Huh28)ではmigration、invasionともに減少した。GLUT-1はBilINの異型度と関係なく発現していたが、GLUT2発現はBilIN-2/3のhigh grade病変で高いことが示された。以上より、GLUT1発現は胆管癌の悪性度と相関するのに対し、GLUT2は大型胆管におけるBilIN経路の発癌に関与することが考えられる。

また、肝細胞癌においては鉄代謝および酸化ストレスがその発癌に深くかかわるといわれているが、胆管癌においてその発癌における役割は不明である。胆管上皮は常に胆汁酸に暴露されており、胆汁酸の腸管循環を制御している代表的な胆汁酸受容体Farnesoid X Receptor (FXR)は肝胆道系の炎症で菌体に対する防御機構を担うことや、脂肪や糖などのエネルギー代謝にも重要な役割を果たしていること、また胆汁酸が胃癌や大腸癌のプロモーターの役割があることが知られていることから、胆道発癌との関与について切除検体についてFXR発現を検討したが、ほとんどすべての胆管癌症例について発現が確認できなかったため、当初予定していた胆汁酸の代謝と受容体に関する検討は断念した。

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 8件)

Aishima S, Mano Y, Tanaka Y, Kubo Y, Shirabe K, Maehara Y, Oda Y. Different roles of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in carcinogenesis and

metastasis of intrahepatic
cholangiocarcinoma. Hum Pathol.
2013;44:1031-7.

Mano Y, Aishima S, Fukuhara T, Tanaka Y,
Kubo Y, Motomura T, Toshima T, Iguchi T,
Shirabe K, Maehara Y, Oda Y. Decreased
roundabout 1 expression promotes
development of intrahepatic
cholangiocarcinoma. Hum Pathol.
2013;44:2419-26.

Kubo Y, Aishima S, Tanaka Y, Shindo K,
Mizuuchi Y, Abe K, Shirabe K, Maehara Y,
Honda H, Oda Y. Different expression of
glucose transporters in the progression of
intrahepatic cholangiocarcinoma. Hum
Pathol. 2014 Apr 4. pii:
S0046-8177(14)00137-3.

〔学会発表〕(計 5 件)

相島慎一、久保雄一郎、田中ゆき、間野
洋平、小田義直.肝内胆管癌の発癌・転移
における iNOS、COX2 発現の役割.第 101
回日本病理学会総会. 2012.4.26-28, 東
京
久保雄一郎、相島慎一、半田瑞樹、田中
ゆき、間野洋平、小田義直.肝内胆管癌に
おける Glucose transporter(GLUT)の役割.
第 101 回日本病理学会総会 .
2012.4.26-28, 東京
間野洋平、相島慎一、田中ゆき、久保雄
一郎、藤田展宏、武富紹信、前原喜彦、
小田義直.腫瘍関連マクロファージによ
る肝細胞癌における STAT3 シグナル活性
化に関する研究 .Tumor Associated
Macrophage Promotes Tumor Progression
via STAT3 signaling in Hepatocellular
Carcinoma. 第 70 回日本癌学会総会
2011.10.3-5. 名古屋

〔図書〕(計 1 件)

相島慎一、小田義直.発生部位からみた
胆管癌の特徴.胆道腫瘍 update. 病理と
臨床 2013.230-236.

〔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
<http://www.surgpath.med.kyushu-u.ac.jp/ap/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

相島 慎一 (AISHIMA SHINICHI)

研究者番号：70346774