

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790779

研究課題名(和文)肝内胆管癌発癌過程におけるLI-カドヘリンの役割と早期診断への応用

研究課題名(英文) Analysis of roles of LI-cadherin during the process of intrahepatic cholangiocarcinoma development and its clinical application for early detection

研究代表者

高村 昌昭 (TAKAMURA, MASAOKI)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：20422602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌の前癌病変の一つとして考えられている、biliary intraepithelial neoplasia(BilIN)におけるLI-カドヘリンおよび胃腸型の粘液形質発現頻度は異型度が高くなるにつれ有意に高くなることが判明した($p<0.001$)。ロジスティック回帰分析により、LI-カドヘリン陽性病変群とBilIN高異型度病変群の間に有意な相関が認められた(オッズ比 25.9, $p=0.002$)。ELISA法による血清LI-カドヘリン値測定検出症例は、全例進行例であった。LI-カドヘリンは前癌病変からの関与が示唆された。一方、血清診断では進行症例のマーカーになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, immunohistochemical analysis demonstrated that stepwise increase in LI-cadherin expression and incidence of gastrointestinal phenotype (one of mucin phenotypes) was observed with increasing the grade of biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) ($p<0.001$). Logistic regression analysis revealed that the high grade BilIN (BilIN-2/3) was the only independently significant factor associated with LI-cadherin expression (odds ratio 25.9, $p=0.002$). The serum level of LI-cadherin was detected in 3 patients from patients with 14 intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). These 3 patients were TNM stage III in 1 case and TNM stage IVB in 2 cases. The results in this study suggest that the expression of LI-cadherin and gastrointestinal phenotype in high grade BilIN may be a serious lesion in the multistep process of ICC carcinogenesis, while the serum detection of LI-cadherin in ICC may be a marker for predicting late-stage disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：LI-カドヘリン 肝内胆管癌 BilIN

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌はわが国において年々増加しており、その予後は肝細胞癌と比べて不良である。肝内胆管癌の予後改善のためには、発癌過程を理解し、早期診断法の確立を目指すことが重要である。最近、胆管上皮内異型病変 biliary intraepithelial neoplasia (BillIN) という概念が提唱され、細胞異型の程度から、BillIN-1, 2, 3 の3段階に分類されている。BillIN は肝内胆管癌の先行病変の一つとして注目されているが、新しい概念であり詳細な解析は進んでいない。

一方、我々はカドヘリンスーパーファミリーに属する LI-カドヘリンの肝内胆管癌(進行癌)における重要性を報告してきた (Takamura et al. Int J Oncol, 2010)。関連分子を含めた LI-カドヘリンの BillIN における発現解析は、本疾患の発癌過程の理解をする上で重要であると考えられる。また、カドヘリンはその細胞外領域がプロテアーゼにより切断され周囲に放出されるシェディングという現象を起こすことが知られている。LI-カドヘリンも同様にシェディングされることを予備的検討で確認しており、その切断断片を検出することで、本疾患におけるバイオマーカーとしての可能性も検討することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、BillIN を用いて肝内胆管癌の発癌過程における LI-カドヘリンおよび関連分子の発現解析を行い、本分子の役割を解明する一方、ELISA 構築の前段階として、シェディング誘導剤による切断部位の同定を行う。最後に ELISA 法で血清 LI-カドヘリン値測定を行い、肝内胆管癌バイオマーカーとしての有用性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) BillIN における LI-カドヘリンおよび関連分子の発現解析

BillIN はもともと肝内結石症で見られる異型上皮を対象として提唱された概念であるが、我々は予備的検討で、肝内結石を伴わない肝内胆管癌でも同様な病変が存在することを確認した。対象は肝内結石非合併肝内胆管癌 16 症例で、168 病変の肝内胆管異型上皮 (reactive change 42 病変、BillIN-1 10 病変、BillIN-2 40 病変、BillIN-3 76 病変) である。BillIN 分類別に LI-カドヘリンおよびその関連分子 (発現制御分子として報告されている CDX2)、粘液形質関連分子、p53、Ki-67 の発現を免疫染色法により解析した。LI-カドヘリンは対象病変の 5%以上染色された病変を LI-カドヘリン陽性病変とした。他の分子は既報にならない評価した。

(2) シェディングによる LI-カドヘリン切断部位の同定

シェディング誘導剤 TPA 添加後の LI-カ

ドヘリン高発現培養細胞株より、シェディング後に残った細胞内領域側を免疫沈降法で濃縮し、エドマン分解法によって N 末端アミノ酸配列解析を行った。

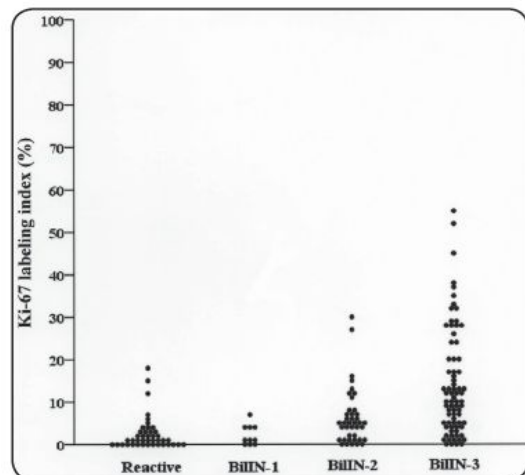
(3) LI-カドヘリン断片を検出するための ELISA の構築と測定の臨床的意義の検討

肝内胆管癌症例 (2011 年から 2014 年までの当院における 12 症例で、男性 8 名、女性 4 名、平均年齢 63.8 歳) の血清を用いて ELISA 法による測定を行った。測定値は症例の臨床病理学的データをもとに解析し、その臨床的意義を検討した。

4. 研究成果

(1) BillIN 分類別の LI-カドヘリンおよび関連分子の発現解析

LI-カドヘリン陽性病変の割合は、reactive change (1/42=2.4%)、BillIN-1 (0/10=0%)、BillIN-2 (9/40=22.5%)、BillIN-3 (35/76=46.1%) と、異型度が高くなるにつれ有意に上昇することが判明した ($p<0.001$)。粘液形質に関しては、胃型、胃型形質に MUC2 または CDX2 発現が加わる胃腸型、Null 型はみられたが、腸型はみられなかった。胃型は reactive change (21/42=50%)、BillIN-1 (4/10=40%)、BillIN-2 (28/40=70%)、BillIN-3 (44/76=57.9%) と全ての群で高頻度に見られたが、胃腸型は reactive change (0/42=0%)、BillIN-1 (0/10=0%)、BillIN-2 (5/40=12.5%)、BillIN-3 (20/76=26.3%) と異型度が高くなるにつれ頻度が高くなることが判明した ($p<0.001$)。逆に Null 型は胃腸型と逆の傾向を示した。一方、p53 蛋白過剰発現頻度や Ki-67 標識率は、低異型度病変群 (reactive change/BillIN-1) に比し高異型度病変群 (BillIN-2/3) で、有意に上昇していることが判明した ($p<0.001$) (図 1)。



(図 1) BillIN 分類別の Ki-67 標識率

単変量解析では、LI-カドヘリン陽性病変は陰性病変に比して、BillIN-2/3 (97.8 vs. 58.5%, $p<0.001$)、胃腸型 (28.9 vs. 9.8%, $p=0.006$)、CDX2 陽性病変 (26.7 vs. 7.3%, $p=0.002$) が有意に多かった。ロジスティック

ク回帰分析では、BiIIN-2/3 が LI-カドヘリン陽性病変との間に有意な相関が認められた (オッズ比 25.9, $p=0.002$)。

(2) シェディングによる LI-カドヘリン切断部位の同定

解析当初得られたサンプルでは、解析不能であった。原因として、サンプルの純度の問題、N 末端アミノ酸がブロックされていることなどが考えられた。については、ケラチン等の人為的なコンタミネーションをさけるために試薬や器具を配列解析専用とし、サンプルの高純度化をはかり、については、デブロッキング処理を行うことで再解析したが、配列の決定が困難であった。

(3) LI-カドヘリン断片を検出するための ELISA の構築と測定の臨床的意義の検討

血清 LI-カドヘリン値は 12 症例中 3 症例で検出された。3 症例の内訳は、男性 1 名、女性 2 名、平均年齢 62.3 歳、平均腫瘍径 3.0cm、TNM 分類 (UICC7th) III 期 1 例、IVB 期 2 例であった。血清 LI-カドヘリン値検出症例と非検出症例の生存率の 2 群比較 (Kaplan-Meier 法) では、2 群間に有意差はみられなかった (Log-rank 検定 0.594)。種々の臨床病理学的因子とのカイ 2 乗検定では、有意差のみられた因子はなかったが、検出例は全例進行例であった。

(4) 考察と今後の展望

本研究により、細胞増殖能が高い BiIIN 高異型度病変群 (BiIIN-2/3) は、p53 蛋白過剰発現・腸型形質への形質転換・LI-カドヘリン発現を経た病変が浸潤癌へ移行していくことが推定され、LI-カドヘリンの前癌病変からの関与が示唆された。

シェディングによる切断部位の同定が困難であった原因として、修飾アミノ酸の存在や蛋白質 N 末端の不均一化などがあげられた。今後、MALDI-TOFMS を用いた N 末端アミノ酸配列解析等新たな解析の検討が必要であろう。

血清診断に関しては、早期症例ではなく、進行症例を予知するマーカーになりうる可能性が示唆されたが、現段階では少数例での検討であり、今後多数例での検討を行う必要がある。

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 14 件)

Yamagiwa S, Tamura Y, Takamura M, Genda T, Ichida T, Ishikawa T, Kamimura T, Takahashi T, Suda T, Matsuda Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Increase of fucosylated

alpha-fetoprotein fraction at the onset of autoimmune hepatitis and acute liver failure. *Hepatol Res* 2014 (in press) (査読有).

Takamura M, Kanefuji T, Suda T, Yokoo T, Kamimura H, Tsuchiya A, Kamimura K, Tamura Y, Igarashi M, Kawai H, Yamagiwa S, Nomoto M, Aoyagi Y. Value of shear wave velocity measurements for the risk assessment of hepatocellular carcinoma development in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int* 8(2):240-9, 2014 (査読有). Yamagiwa S, Kamimura H, Takamura M, Aoyagi Y. Autoantibodies in primary biliary cirrhosis: Recent progress in research on the pathogenetic and clinical significance. *World J Gastroenterol* 20(10):2606-12, 2014 (査読有).

Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y, Osawa M, Fujimaki S, Sanpei A, Genda T, Ichida T. Clinical significance of cell cycle inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* 46(4):185-92, 2013 (査読有).

Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Ohsawa M, Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y, Sanpei A, Fujimaki S. DNA damage sensor -H2AX is increased in pre-neoplastic lesions of hepatocellular carcinoma. *The Scientific World Journal* 597095, 2013 (査読有).

Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Aoyagi Y. Involvement of liver-intestine cadherin in cancer progression. *Med Mol Morphol* 46(1):1-7, 2013 (査読有).

Tsuchiya A, Imai M, Kamimura H,

Takamura M, Yamagiwa S, Sugiyama T, Nomoto M, Heike T, Nagasawa T, Nakahata T, Aoyagi Y. Increased susceptibility to severe chronic liver damage in CXCR4 conditional knock-out mice.

Dig Dis Sci 57(11):2892-2900, 2012 (査読有).

Kamimura K, Suda T, Tamura Y, Takamura M, Yokoo T, Igarashi M, Kawai H, Yamagiwa S, Nomoto M, Aoyagi Y. Phase I study of miriplatin combined with transarterial chemotherapy using CDDP powder in patients with hepatocellular carcinoma. BMC Gastroenterol 20;12:127, 2012 (査読有).

Kamimura H, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S, Inoue M, Wakai T, Shirai Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. J Hepatol 56(2):381-388, 2012(査読有).

Inoue M, Ajioka Y, Wakai T, Takamura M, Korita PV, Shirai Y, Hatakeyama K. Liver-intestine cadherin in intraepithelial neoplasia of intrahepatic cholangiocarcinoma.

HepatoGastroenterology 58(112):2045-2051, 2011 (査読有).

Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Takamura M, Matsuda Y, Korita PV, Muneoka K, Sasaki M, Ajioka Y, Hatakeyama K.

Ribonucleotide Reductase M1 Expression in Intrahepatic Cholangiocarcinoma.

HepatoGastroenterology 58(110-111):1659-1663, 2011 (査読有).

Tsuchiya A, Kamimura H, Tamura Y, Takamura M, Yamagiwa S, Suda T, Nomoto M, Aoyagi Y. Hepatocellular carcinoma

with progenitor cell features distinguishable by the hepatic stem/progenitor cell marker NCAM. Cancer Lett 309(1):95-103, 2011 (査読有).

Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Korita PV, Matsuda Y, Takamura M, Ohashi R, Nagahashi M, Ajioka Y, Hatakeyama K. Alteration of p53-binding protein 1 expression as a risk factor for local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma. Int J Oncol 38(5):1227-1236, 2011 (査読有).

Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Matsuda Y, Korita PV, Takamura M, Ajioka Y, Hatakeyama K. Prognostic significance of NQO1 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. Int J Clin Exp Pathol 4(4):363-370, 2011 (査読有).

〔学会発表〕(計1件)

1. 高村昌昭、山際訓、若井俊文、上村博輝、土屋淳紀、松田康伸、白井良夫、青柳豊。肝細胞癌における Liver-intestine (LI)-cadherin の発現と臨床病理学的意義。第47回日本肝臓学会総会。2011年6月2日。ホテル グランパシフィック LE DAIBA (東京都)

〔その他〕

ホームページ等
新潟大学医学部医学科ホームページ
教育・研究活動紹介、消化器内科学
消化器癌バイオマーカーの探索と有用性に関する研究
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/research/rinsyou/naika03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高村 昌昭 (TAKAMURA MASA AKI)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：20422602