

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：23791537

研究課題名（和文）：ラット膵・胆管合流異常モデルを用いた胆道癌の発癌機構に関する研究

研究課題名（英文）：mechanism of bile duct carcinogenesis using rat model of pancreaticobiliary maljunction

研究代表者：山田 眞一郎 (YAMADA SHINICHIRO)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：30579884

研究成果の概要（和文）：膵・胆管合流異常は、膵液の逆流により炎症を中心とした病態を引き起こし、癌化に関与するとされるが、詳しいメカニズムは分かっていない。今回、ラットに DBTC (dibutyltin dichloride) を投与し膵・胆管合流異常モデルを作成することで、膵・胆管合流異常症における発癌メカニズムにつき解明することとした。DBTC8mg/kg 単回投与により、胆汁うっ滞、胆管上皮の乳頭上増殖を認め、さらに胆管上皮の細胞増殖マーカーである Ki67 の高発現や COX2, HDAC の発現上昇を確認したが、4 週間後には乳頭状増殖は改善していた。DBTC 頻回投与によりほぼすべてのラットが死亡するため長期的観察に難渋したが、現在マウスを用いた外科的モデル作成を試みている。

研究成果の概要（英文）：In pancreaticobiliary maljunction, reflux of pancreatic juice causes many conditions including inflammation, and may be relate to carcinogenesis. However, mechanism is not well known. This time, we administered DBTC to rats and made the model of pancreaticobiliary maljunction. Single dose of 8mg/kg DBTC caused biliary stasis and papillary growth of epithelium, and we confirmed high expression of Ki-67, COX2 and HDAC by immunohistochemistry. However, papillary growth was recovered 4 weeks after administration. As Rats died by frequent dose of DBTC and we could not observe in long time, we try to make mouse model of pancreaticobiliary maljunction by surgical technique.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：膵・胆管合流異常・adenoma-carcinoma sequence・胆道癌・

## 1. 研究開始当初の背景

膵・胆管合流異常は膵管と胆管が十二指腸壁外で合流する先天性疾患で、特に膵液が胆管に逆流することにより炎症を中心とした様々な病態を引き起こし、特に胆道癌を高率に発症する。当科は膵・胆管合流異常研究会事務局で全国症例を集積しており胆管拡張

を伴う膵・胆管合流異常の 21.6%胆道癌が認められることを報告している。膵・胆管合流異常の癌化機序として、膵液胆道内逆流、膵液と胆汁の混和、胆汁のうっ滞による炎症性変化により、胆道上皮の細胞回転は亢進し、これに p53 や k-ras の遺伝子発現変異が加わって発癌に至るものと考えられるが、その詳

細なメカニズムは明らかになっていない。我々はエピジェネティックな遺伝子発現に関わる HDAC (histone deacetylase) に注目しており、Barrett 上皮や大腸腺腫において adenoma-carcinoma sequence の比較的早い段階で癌化プロセスに関わっていることを明らかにした。近年、ラットに DBTC (dibutyltin dichloride) を投与すると、胆管上皮の炎症により十二指腸開口部近傍での肝外胆管閉塞及び膵液の胆道内逆流が生じる胆道拡張症モデルとしての有用性が報告された (胆道 2009, 19: 16-22)。胆道拡張症モデルラットにおいても同様に HDAC の発現増強が認められれば adenoma-carcinoma sequence の初期段階と同様に発癌のポテンシャルを有すると考えられる。このモデルを経時的に観察することにより、膵・胆管合流異常症における発癌のメカニズムを解明できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

膵・胆管合流異常は胆道癌を高率に発症することが知られている。膵・胆管合流異常における発癌プロセスとして、これまで、胆汁中の胆汁酸分画の変化、胆道上皮の乳頭状変化や絨毛性変化、細胞回転の亢進、p53、MUC1 などの遺伝子発現変化、K-Ras 遺伝子変異などが研究され報告されている。しかしながら、その詳細についてはいまだ不明な点が多い。我々は、胆道拡張症と類似の病態を示す DBTC 投与ラットを用いて、胆道癌発癌モデルの確立および発癌プロセスを明確にすることとした。

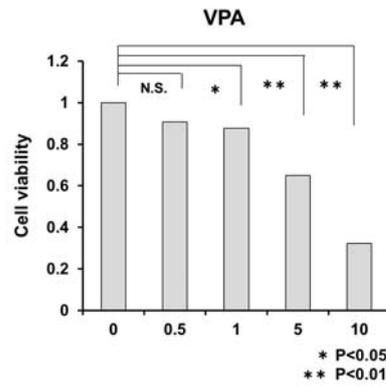
## 3. 研究の方法

(1) 胆管癌細胞株 HuCCT を使用。96well dish ( $5 \times 10^3$  個/well) に細胞株を播種し、24 時間培養の後、HDAC 阻害剤 (Valproic acid) を含んだ培地に変更する。96 時間後に MTT assay で癌細胞制御を検討し、HDAC の mRNA 発現を RT-PCR で測定した。

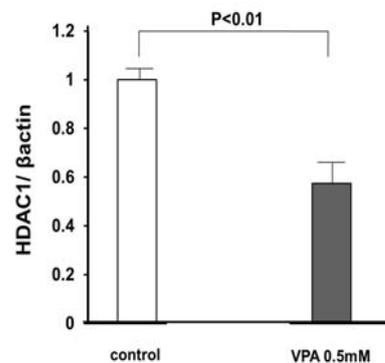
(2) 6 週齢雄性ラット (Lewis) を用い、DBTC8mg/kg を尾静脈または陰茎背静脈から 2 週間毎に反復投与し、長期観察を行う。1 ヶ月目から 2 週間毎に検体を採取し、血清ビリルビン値、ALP、胆汁中 AMY、リパーゼを測定。また、胆管を摘出し、HE 染色、各種免疫組織学的染色を行った。

## 4. 研究成果

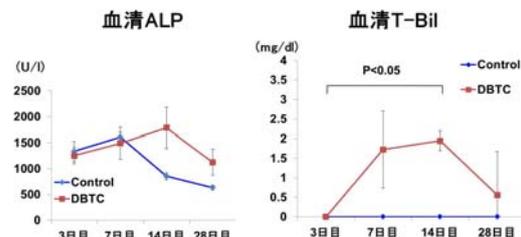
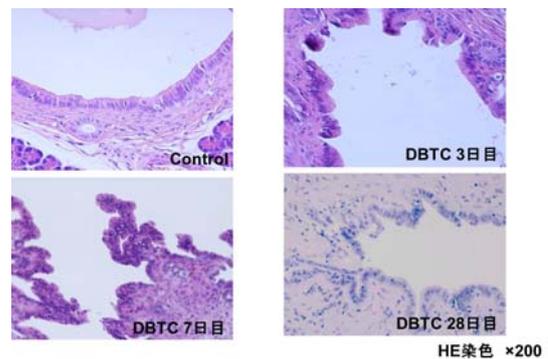
(1) VPA 投与により、胆管癌細胞株の viability は濃度依存性に低下した。

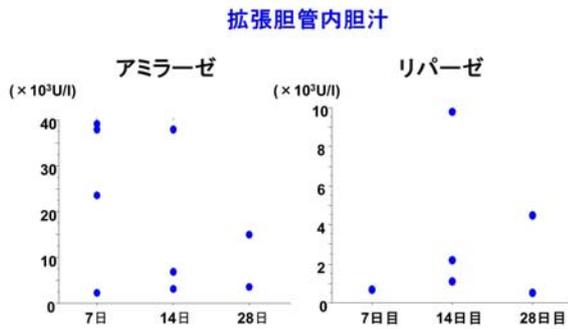


VPA 投与群では、HDAC の mRNA 発現低下を認め、HDAC が細胞増殖抑制の関与していることが示唆された。

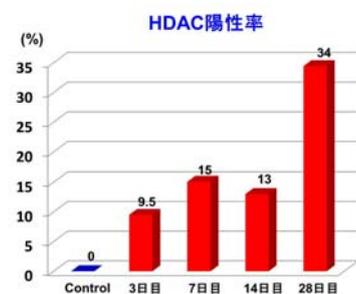
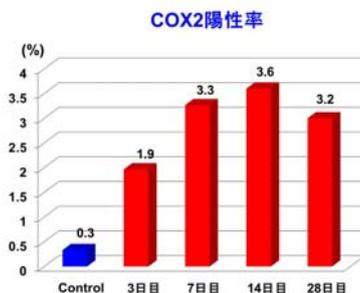
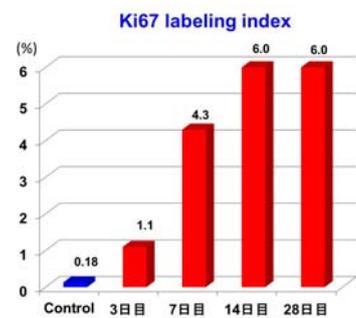


(2) DBTC8mg/kg 単回投与により DBTC 投与後 1 週間目から胆管上皮の乳頭状増殖を観察するとともに血清 ALP や T-Bil の上昇を確認。胆汁中 amy、リパーゼはばらつきがあるが、amy は 7、14 日目で 40000、リパーゼは 14 日目で 9800 と高値のものを認めた。





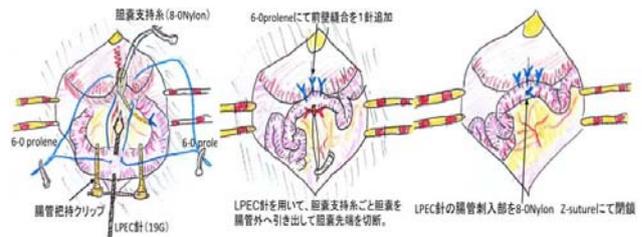
さらに、細胞増殖マーカーである Ki67 の高発現や COX2, HDAC の発現上昇を確認したが、4 週間後には乳頭状増殖は改善しており、単回投与のみでは発癌モデルとしては不適と考えられた。



しかしながら、2 回投与することでほとんどのラットが死亡し、投与量を半量に減量すると乳頭上増殖は確認されないなど、投与量の設定に苦慮した。さらには一度投与した静脈は壊死することにより頻回投与モ

デルの作成に難渋している。

今後の研究計画としては、bulb/c マウスを用い、外科的に乳頭結紮、胆嚢十二指腸瘻を作成することで、膵・胆管合流異常症モデルの作成する予定である。乳頭結紮により胆管への膵液逆流は確認できたが、マウスの胆嚢壁が非常に薄いため胆嚢十二指腸瘻の作成に難渋し、現在は葛西の手術にヒントを得て LPEC 針を用いた術式を習熟させている。



## 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 1 件)

1. Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Kanamoto M, Hanaoka J, Iwahashi S, Saitoh Y. Surgical results of pancreatoduodenectomy in elderly patients. Surg Today. 2012; 42(9): 857-862(査読有)

〔学会発表〕 (計 5 件)

1. 森 大樹. 他 14 名. 12 番目. 山田 眞一郎. 膵胆管合流異常症における epigenetic/genetic 修飾を介した胆道癌発癌機構に関する検討. 第 50 回 日本癌治療学会学術集会. 2012 年 10 月 25 日-27 日 パシフィコ横浜(神奈川県)
2. 森 大樹. 他 13 名. 10 番目. 山田 眞一郎. Risk of carcinogenesis in patients with pancreaticobiliary maljunction through both epigenetic and genetic regulation. 第 71 回 日

本癌学会学術総会. 2012年9月19日-21日 ロ  
イトン札幌(北海道)

3. 山田 眞一郎. 他 10 名. 胆嚢摘出後に胆管癌を発症した胆管非拡張型膵・胆管合流異常の2症例についての検討. 第35回 日本膵・胆管合流異常研究会. 2012年9月8日 東京海運クラブ(東京都)
4. 山田 眞一郎. 他 15 名. 膵・胆管合流異常症における胆道癌発癌機構の解明. 第97回 日本消化器病学会四国支部例会 2012年6月30日 あわぎんホール(徳島県)
5. 森大 樹, 他 14 名, 13 番目. 山田 眞一郎. 膵・胆管合流異常症の胆道上皮は発癌ポテンシャルを有する. 第112回日本外科学会定期学術集会 2012年4月12日-14日 幕張メッセ(千葉県)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山田 眞一郎 (YAMADA SHINICHIRO)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：30579884

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：