

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590504

研究課題名(和文) タイ肝吸虫感染による胆管癌の新規腫瘍マーカーの同定及び検出系の確立

研究課題名(英文) Development of novel biomarker for diagnosis, prognosis and therapy of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma

研究代表者

呉 志良 (WU, ZHILIANG)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90313874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：タイ肝吸虫感染による胆管癌の新たな腫瘍マーカーの検索を行った。候補腫瘍マーカーの解析から、MFGE8およびS100Pを絞り込んだ。動物モデルの発癌過程に伴う発現の早期上昇、胆管癌細胞に局在した高い発現、癌患者の血清・胆汁の高い濃度などから、MFGE8およびS100Pは組織・血液検査による診断に応用ができる。また、高い発現は腫瘍の悪性度及び転移、患者の低生存率と相関しており、独立予後因子として認められた。さらに、発現のノックダウンは、胆管癌細胞の増殖を抑制、抗癌剤に対する感受性を増強した。MFGE8およびS100Pは胆管癌の診断、予後及び治療標的の新規バイオマーカー候補を確定した。

研究成果の概要(英文)：The present study identified novel cancer markers for opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma (CCA). After further study on the candidates listed up based on our previous cDNA microarray analysis, we focused on the two markers, MFGE8 and S100P. The early elevation of expression in Opisthorchis viverrini infection-induced cholangiocarcinoma (CCA) animal model, intensive expression in the precancerous lesion of hyperplasia and dysplasia in bile ducts and tumor cell, and high levels in serum and bile fluid indicated that both can be novel markers for CCA diagnosis. The high expression could be an independent prognostic factor. The shRNA-mediated knockdown of S100P expression inhibited the proliferation of CCA, arrested cell cycle, promoted apoptosis and increased the sensitivity to chemotherapeutic agents. This study indicates that MFGE8 and S100P are promising novel biomarker for diagnosis, prognosis and therapy of CCA.

研究分野：寄生虫学

キーワード：タイ肝吸虫 胆管癌 腫瘍マーカー MFGE8 S100P 癌診断 抗癌剤標的

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝吸虫 (*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*) は主にアジアに流行している。疫学調査及び動物実験は感染が胆管癌の発癌を誘発することをすでに明らかにした。流行地での胆管癌の発生率は非流行地より数十倍以上高い、大きな保健医療上の問題になっている。

(2) 胆管癌は悪性度が高い腫瘍であり、早期は無症状の症例が多い、早期発見は困難で、生存率は極めて低い難治性の癌と位置付けられている。現在使われているタイ肝吸虫感染による胆管癌の腫瘍マーカーは、診断の特異性及び感度が低くて、現状ではまだ理想的な腫瘍マーカーではない。

(3) 我々はタイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌を誘発することから、感染による胆管癌動物モデルを利用するというユニークな発想で、発癌メカニズム解明の研究を進めている。そのモデルを用いて、cDNA マイクロアレイ解析を行って、新たな候補腫瘍マーカーをリスクアップした。

(4) 今までの研究結果を踏まえて、本研究は、新たな候補腫瘍マーカーを選んで、それら候補マーカーの発癌動物モデルの発癌過程における発現動態、及び肝吸虫流行地由来胆管癌の患者、肝吸虫感染の患者及び正常人の血清・胆汁の検出を行い、さらに、臨床病理との相関性を解析する。それによって、新たな腫瘍マーカーを同定し、血清検査で、胆管癌、また他の癌に応用ができる早期診断技術を開発することを目標としたい。

2. 研究の目的

本研究は、タイ肝吸虫感染が胆管癌の新規また早期診断用腫瘍マーカーを開発する及び検出系を確立する目的である。

(1) 今までの研究結果を踏まえて、cDNA マイクロアレイなど解析よりリストアップした胆管癌候補腫瘍マーカーの発癌動物モデルにおける発現動態及び流行地由来胆管癌患者癌組織における発現を解析で、早期診断用新規腫瘍マーカー候補を絞り込む。

(2) 肝吸虫流行地由来胆管癌の患者、肝吸虫感染の患者及び正常人の血清・胆汁の検出を行い、血液検査による診断の技術を設立し、診断の特異性、感度や実用性などを検討するによって、早期診断に応用可能な腫瘍マーカーを同定する。

(3) 腫瘍マーカーの発現強度と胆管癌患者の臨床病理との相関性の解析によって、肝吸虫感染による発癌との関連性及び予後因子としての役割を明らかにする。

(4) shRNA 干渉による発現のノックダウンで、候補腫瘍マーカーの発癌の関与及び治療標的を解析するによって、胆管癌のバイオマーカーとして確定する。

3. 研究の方法

(1) 感染による発癌動物モデルの設立：4

グループのハムスターを作製して、感染後 0, 1, 2, 3 及び 6 ヶ月に血清、肝臓組織を採集する：正常対照群、タイ肝吸虫感染群、NDMA 投与群、タイ肝吸虫感染+NDMA 投与群 (胆管癌動物モデル)。

(2) 胆管癌患者由来サンプルの収集：肝吸虫流行地 (タイ東北地方) 由来胆管癌患者の癌組織、血清及び胆汁、感染者及び正常者の血清を収集する。80 例胆管癌患者から、癌組織、血清、胆汁を収集した。また、対照血清 (タイ肝吸虫感染者血清 43 例、健康者血清 53 例) を収集した。患者のサンプル採集・使用は患者の承認、タイ王国の法令などに準拠して、タイ Khon Kaen 大学及び岐阜大学の倫理審査委員会の承認を受けて行った。

(3) タイ肝吸虫感染による胆管癌の発癌過程に伴う候補腫瘍マーカーの発現動態観察：従来の cDNA マイクロアレイの結果に基づいて、候補腫瘍マーカーを選定する。これらのマーカー (Pdgfa, Galectin-1, Mfge8, S100A2, S100A4, S100A6, S100B, S100P, Stmn1, Pdpk1, Spint2, Trimm55, Cyp, Hgd, Idh1, Idh2) の 4 グループ動物における発現動態を観察した。

(4) 組織免疫染色で候補腫瘍マーカーの組織・細胞における局在及び発現と臨床病理の相関性の解析：発癌動物モデルにおける発現動態に基づいて、MFGE8, S100P を絞り込み、それらの癌組織・細胞に局在及び発現レベルと臨床病理 (生存率、組織学的悪性度、ステージ、転移など) の相関性を検討した。

(5) 候補腫瘍マーカーの胆管癌患者の血清・胆汁における濃度の測定：ELISA で MFGE8, S100P のタイ肝吸虫流行地由来の胆管癌患者の血清・胆汁における濃度を測定した。対照群 (タイ肝吸虫感染者、健康者) の血清濃度の解析で、診断の特異性、感度を検討した。

(6) shRNA 干渉で候補遺伝子の発現をノックダウンするによる癌化の関与及び治療標的の解析：候補遺伝子の発現をノックダウンされた免疫不全マウス移植の成長、増殖、細胞周期、アポトーシス、抗癌剤に対する感受性を検討した。

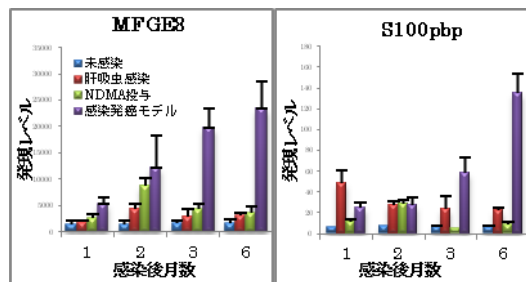
4. 研究成果

(1) タイ肝吸虫感染による胆管癌発癌動物モデルを生かして、候補腫瘍マーカーの発癌過程に伴う発現動態を明らかにした。

発癌動物モデルにおける腫瘍マーカーの発現動態の観察は早期診断用マーカーの開発や癌化機構の解明にとって、重要な意義である。患者の癌組織の解析で、胆管癌腫瘍マーカーの研究は進んでいるが、早期癌サンプルは乏しく、発癌過程に腫瘍マーカーの動態観察は困難である。タイ肝吸虫感染による胆管癌誘発実験動物モデルはすでに確立されている。我々はそのモデルの遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイで解析し、癌化に関与する候補遺伝子を選定した。その

結果に基づいて、(a) 発現は非常に高くまた低くなり、シグナルが強い、(b) 発現は発癌過程の早期に上昇する、(c) 胆管癌の腫瘍マーカーとして報告されていない基準で、Mfge8, S100 ファミリ(S100PBP, S100A2, S100A4, S100A6, S100A11, S100A11, S100B), PDGF, Galectin-1, Lass4, Rbp2, S100 ファミリ, Stmn1, Pdpk1, Spint2, Trimm55, Cyp, Hgd, Idh1, Idh2, を選んで、動物グループ(正常対照群、タイ肝吸虫感染群、NDMA 投与群、タイ肝吸虫感染+NDMA 投与群)における発現動態(感染後 1,2,3,6 カ月)を調べた。その結果、Mfge8, S100PBP, S100A4, S100A6 の発現は、感染後 1 カ月から増加し、6 カ月まで著しく上昇した。それらの発現動態は、病理学的な発癌過程に一致していることを示した(図 1 は発現動態の例)。結果はそれら遺伝子が胆管癌診断用有力候補腫瘍マーカーであることを示唆した。

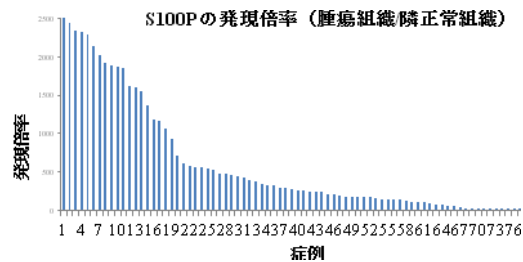
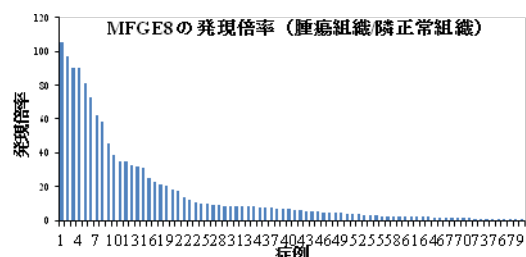
図 1: 肝吸虫感染による胆管癌発癌動物モデルにおける発現動態



(2) Mfge8, S100P, S100A4, S100A6 の肝吸虫流行地由来胆管癌患者の癌組織における発現は高いであった。

タイ東北地方のコーンケン県は肝吸虫の重度流行地で、世界一高い胆管癌発生率の地域である。本研究はその地域から、80 例胆管癌患者のペアーサンプル(癌組織及び隣正常組織)を収集して、絞り込んだ候補腫瘍マーカーの発現を調べた。Mfge8, S100P の癌組織における発現の増加を示した(図 2)。77.5%の症例の Mfge8 の及び 100%の症例の S100P の発現倍率は 3 倍以上であり、平均倍率はそれぞれ 20.9 と 615 倍であった。結果は、それらの遺伝子が感染による胆管癌の発癌に関与、また組織検査による新たな診断腫瘍マーカーとしての可能性を示した。

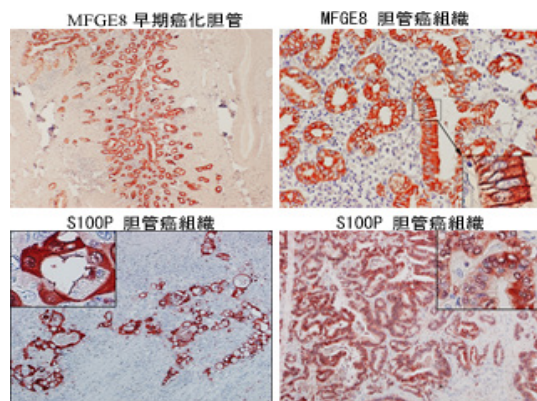
図 2: 80 例胆管癌症例の腫瘍組織における隣正常組織に対する発現倍率



(3) MFGE8 及び S100P の高くなった発現は、胆管癌細胞に局在してあり、癌化の関与及び診断に応用の可能である。

タンパクレベル発現が高くなるかどうか、またその高くなる発現の由来を調べるために、80 例胆管癌患者の癌組織の免疫染色を行った。MFGE8 と S100P の免疫染色の陽性率は、それぞれ 92.5%と 90.0%であった。陽性染色は、MFGE8 において胆管腫瘍細胞の膜及び細胞質に局在してあった。S100P の陽性染色は、細胞質及び核に局在してあった。さらに、早期癌化胆管に強い陽性反応が見られた(図 3)。結果は、MFGE8 及び S100P は胆管癌の新たな早期診断用腫瘍マーカーとして期待される。

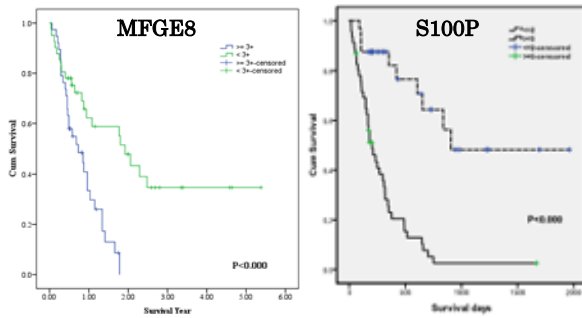
図 3: 80 例胆管癌患者由来癌組織の MFGE8 及び S100P の免疫染色。



(4) MFGE8 及び S100P の発現は、胆管癌患者の生存率と相関してあり、独立予後因子であることは明らかにした。

80 例胆管癌患者の癌組織における MFGE8 と S100P のタンパクレベルの発現量(免疫染色強度、1+~4+)は、胆管癌の臨床病理(年齢、性別、生存率、ステージ、悪性度、転移)と相関性、また、独立予後因子であるかどうかについて、Kaplan-Meier、univariate and multivariate Cox regression analysis などの解析を行った。高い MFGE8 及び S100P の発現(免疫染色強度 > 2+)は、生存率、組織学的悪性度及び転移と有意的な相関性があった。さらに、発現が高い患者の生存率が低く、この二つ因子はタイ肝吸虫感染による胆管癌の独立予後因子であることが認められた。

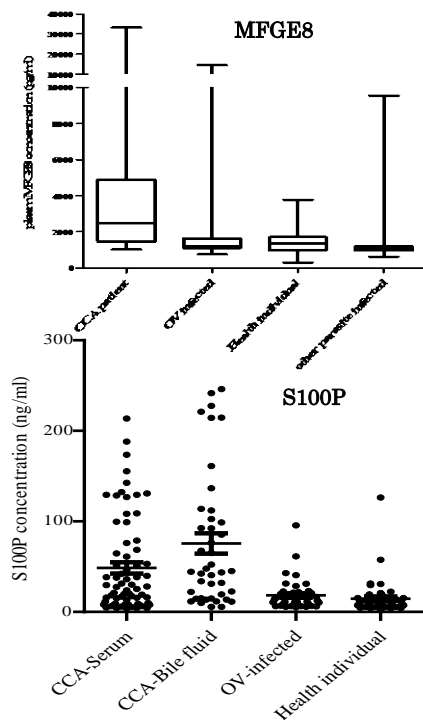
図4：MFGE8及びS100Pの高い発現は肝胆癌患者の生存率と相関した。



(5) MFGE8及びS100Pの胆管癌患者の血清・胆汁の濃度は、肝吸虫感染者及び健康者より高い、診断用血清腫瘍マーカーとして期待される。

血清腫瘍マーカーは、癌の診断にとって最も期待されている。しかし、現在、タイ肝吸虫感染による胆管癌の腫瘍マーカーは主にCA19-9、CEA、DUPAN-2、SPan-1などが用いられているが、早期診断の特異性及び感度は低くて、現状ではまだ理想的な腫瘍マーカーではない。本研究は、73例胆管癌患者、49例肝吸虫感染者、43例健康者、17例他の寄生虫感染者の血清MFGE8濃度を測定した。その結果、胆管癌患者の血清濃度は、他のものより高いであった(図4)。S100Pの胆管癌血清及び胆汁の濃度は、肝吸虫感染者、健康者の濃度よりも高いであり、胆管癌の診断特異性及び感度は、それぞれ71.4%と71.9%であった(図5)。今後更なる検証によって、MFGE8及びS100Pは胆管癌患者診断用血清腫瘍マーカーとして期待される。

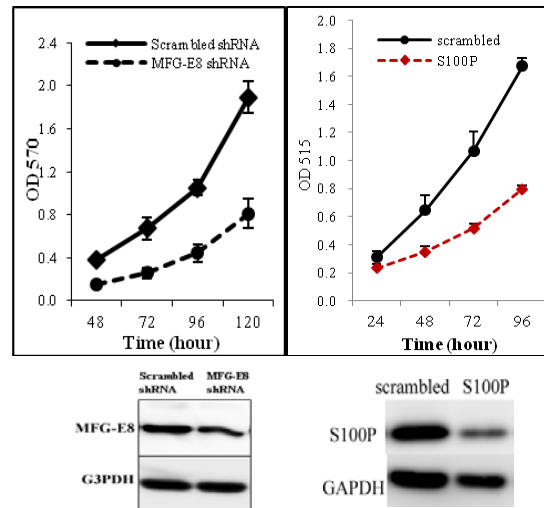
図5：ELISA法で、胆管癌患者の血清・胆汁におけるMFGE8及びS100Pの濃度。



(6) shRNA干渉でMFGE8及びS100Pの発現をノックダウンするによって、胆管癌細胞の増殖を抑制した。この二つ因子は肝吸虫感染による胆管癌の発癌に関与、また治療標的である。

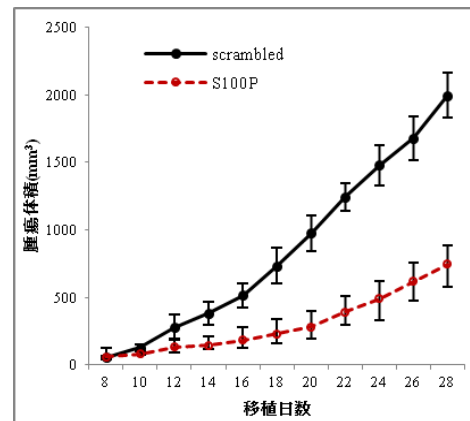
肝吸虫流行地由来の胆管癌細胞株を用いて、shRNA干渉でMFGE8及びS100Pの発現をノックダウンした。ノックダウンされた細胞のMFGE8及びS100Pの発現低下になり、細胞の増殖が遅くなった(図6)。

図6：MFGE8、S100P及びコントロールのshRNAベクターでトランスフェクションした胆管癌細胞の増殖。



また、免疫不全ヌードマウスに移植したS100Pノックダウン胆管癌腫瘍の成長は、著しく遅くなった(図7)

図7：免疫不全マウスに移植したS100P及びコントロールのshRNAベクターでトランスフェクションした胆管癌腫瘍の成長

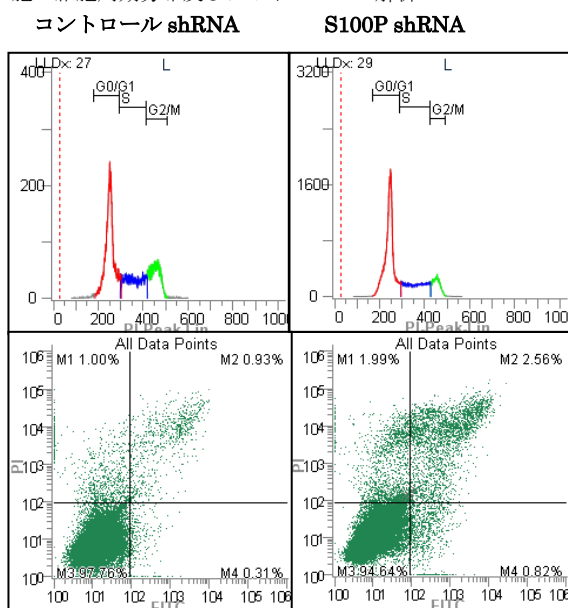


(7) S100Pの発現をノックダウンするによって、胆管癌細胞の細胞周期停止をさせ、アポトーシスを促進した。

S100Pの発現をノックダウンするによって、胆管癌細胞の増殖抑制の機構を解明するために、細胞周期分布、細胞周期制御する因子の発現、アポトーシス及び関連因子の発現を調べた。S100Pの発現のノックダウンは細

胞周期 G1 ステージに停止させた (図 8)。さらに、細胞周期停止を制御する因子 (p21, p27, 14-3-3 zeta, GADD45A) の発現は増加し、細胞周期を促進する因子 (cyclinD1, cyclinB, CDC25, CDC2) の発現は低下になった。さらに、ノックダウンされた胆管癌細胞のアポトーシスの発生率は高くなって、アポトーシス因子 (BAX, DR5, TRADD, caspase 3) の発現が増加になった。結果は、S100P が細胞周期及びアポトーシスを制御するによって、癌化に関与することを示して、治療の標的バイオマーカーとして期待される。

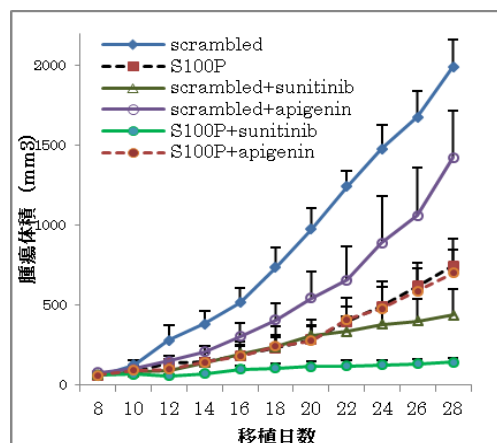
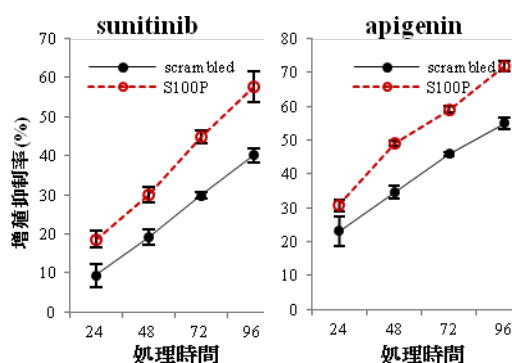
図 8 : S100P の shRNA でノックダウンされた胆管癌細胞の細胞周期分布及びアポトーシスの解析



(8) S100P の発現をノックダウンするによって、胆管癌細胞の抗癌剤 Sunitinib と Apigenin に対する感受性は高くなった。

S100P のノックダウンによる胆管癌細胞の抗癌剤に対する感受性の影響を調べた。調べた 11 種抗癌剤 (sunitinib, apigenin, gemcitabine, 5-Fluorouracil, cycloheximide, paclitaxel, etoposide, vinblastine, oxaliplatin, camptothecin and 5-Aza-2'-deoxycytidine) 中に、Sunitinib 及び Apigenin の S100P の発現がノックダウンされた胆管癌細胞に対する増殖抑制は、コントロール shRNA よりたかくなった。さらに、sunitinib 及び apigenin は、免疫不全マウスに移植した胆管癌腫瘍の成長を著しく抑制した (図 9) 結果は、S100P が胆管癌の治療標的であることを示した (図 9)。

図 8 : S100P のノックダウンにより高くなった sunitinib 及び apigenin の胆管癌細胞の増殖の抑制 in vitro、及び免疫不全マウスに移植した胆管癌腫瘍の成長の抑制



本研究課題より、MFG8 及び S100P は、タイ肝吸虫感染による胆管癌の新たな腫瘍マーカーとして、同定された。今後の、胆管癌の診断、予後及び治療標的への応用は期待される。

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 11 件)

- ① Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Boonjaraspinyo S, Srinontong P, Ratasuwan P, Narong K, Nielsen P, Maekawa Y. Significance of S100P as a biomarker in diagnosis, prognosis and therapy of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. Int J Cancer, 2015 in press
- ② Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Loilome W, Yongvanit P, Khuntikeo N, Nielsen PS, Paorokul C, Takahashi Y, Maekawa Y. Milk fat globule epidermal growth factor 8 serves a novel biomarker of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. Tumour Biol. 査読有, 35 巻, 2014, pp1985-95. DOI: 10.1007/s13277-013-1264-3
- ③ Juasook A, Boonmars T, Wu Z, Loilome W, Veteewuthacharn K, Namwat N, Sudsarn P, Wonkchalee O, Sriraj P, Aukkanimart R. Immunosuppressive Prednisolone Enhances Early Cholangiocarcinoma in Syrian Hamsters with Liver Fluke Infection and Administration of N-nitrosodimethylamine. Pathol Oncol Res. 査読有, 19 巻, 2013, pp55-62. DOI:

- 10.1007/s12253-012-9557-1.
- ④ Wonkchalee N, Boonmars T, Laummaunwai P, Aromdee C, Hahnvajawanong C, Wu Z, Sriraj P, Aukkanimart R, Chamgramol Y, Pairojkul C, Juasook A, Sudsarn P. A combination of praziquantel and the traditional medicinal plant *Thunbergia laurifolia* on *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma in a hamster model. *Parasitol Res.* 査読有, 112 巻, 2013, pp4211-9. DOI: 10.1007/s00436-013-3613-y.
- ⑤ Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Boonjaraspinyo S, Pinlaor S, Pairojkul C, Chamgramol Y, Takahashi Y. Alteration of galectin-1 during tumorigenesis of *Opisthorchis viverrini* infection-induced cholangiocarcinoma and its correlation with clinicopathology. *Tumour Biol.* 査読有, 33 巻, 2012, pp1169-78. DOI: 10.1007/s13277-012-0360-0
- ⑥ Boonjaraspinyo S, Boonmars T, Wu Z, Loilome W, Sithithaworn P, Nagano I, Pinlaor S, Yongvanit P, Nielsen PS, Pairojkul C, Khuntikeo N. Platelet-derived growth factor may be a potential diagnostic and prognostic marker for cholangiocarcinoma. *Tumour Biol.* 査読有, 33 巻, 2012, pp1785-802. doi: 10.1007/s13277-012-0438-8.
- ⑦ Wonkchalee O, Boonmars T, Aromdee C, Laummaunwai P, Khunkitti W, Vaeteewoottacharn K, Sriraj P, Aukkanimart R, Loilome W, Chamgramol Y, Pairojkul C, Wu Z, Juasook A, Sudsarn P. Anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective effects of *Thunbergia laurifolia* Linn. on experimental opisthorchiasis. *Parasitol Res.* 査読有, 111 巻, 2012, pp353-9. DOI: 10.1007/s00436-012-2846-5
- ⑧ Boonjaraspinyo S, Wu Z, Boonmars T, Kaewkes S, Loilome W, Sithithaworn P, Nagano I, Takahashi Y, Yongvanit P, Bhudhisawasdi V. Overexpression of PDGFA and its receptor during carcinogenesis of *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma. *Parasitol Int.* 査読有, 61 巻, 2012, pp145-50. DOI: 10.1016/j.parint.2011.07.008
- ⑨ Wonkchalee O, Boonmars T, Kaewkes S, Chamgramol Y, Aromdee C, Wu Z, Juasook A, Sudsarn P, Boonjaraspinyo S, Pairojkul C. Comparative studies on animal models for *Opisthorchis viverrini* infection: host interaction through susceptibility and pathology. *Parasitol Res.* 査読有, 110 巻, 2012, pp1213-23. DOI: 10.1007/s00436-011-2616-9
- ⑩ Juasook A, Boonmars T, Kaewkes S, Loilome W, Veteewuthacharn K, Wu Z, Yongvanit P. Anti-inflammatory effect of prednisolone on the growth of human liver fluke in experimental opisthorchiasis. *Parasitol Res.* 査読有, 110 巻, 2012, pp2271-9. DOI: 10.1007/s00436-011-2759-8
- ⑪ Boonjaraspinyo S, Boonmars T, Kaewkes S, Laummaunwai P, Pinlaor S, Loilome W, Yongvanit P, Wu Z, Puapairoj A, Bhudhisawasdi V. Down-regulated expression of HSP70 in

correlation with clinicopathology of cholangiocarcinoma. *Pathol Oncol Res.* 査読有, 110 巻, 2012, pp227-37. DOI: 10.1007/s12253-011-9432-5

[学会発表] (計 7 件)

- ① Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Maekawa Y, Takahashi Y. Significance of S100P as a biomarker in opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. The 13th Asian-Pacific Congress for Parasite Zoonoses, 2014 年 11 月 29-30 日、台北 (台湾)
- ② Wongchalee N, Boonmars B, Aromdee C, Wu Z. *Thunbergia laurifolia*, a medical plant on opisthorchiasis model. The 13th Asian-Pacific Congress for Parasite Zoonoses, 2014 年 11 月 29-30 日、台北 (台湾)
- ③ Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Boonjaraspinyo S, Pinlaor S, Pairojkul C, Chamgramol Y, Takahashi Y, Maekawa Y. Biomarkers of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. The 12th Asian-Pacific Congress for Parasite Zoonoses, 2014 年 10 月 6-7 日、神戸大学 (兵庫・神戸市)
- ④ Wu Z, Boonmars T. Molecular mechanism of tumorigenesis and biomarkers of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. RGJ-PhD Congress XV, 招待講演, 2014 年 5 月 20-30 日、Pattaya (タイ)
- ⑤ 呉 志良, 長野 功, 前川洋一. タイ肝吸虫感染における S100 ファミリータンパク発現の意義. 第 83 回日本寄生虫学会大会, 2014 年 3 月 27-27 日、愛媛大学 (愛媛・松山市)
- ⑥ Wongchalee N, 呉 志良, 長野 功, 前川洋一. Effect of *Thunbergia laurifolia* on experimental opisthorchiasis and cholangiocarcinoma. 第 69 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2013 年 10 月 19-20 日、アルファアナブキホール (香川・高松市)
- ⑦ 呉 志良, 長野 功, 前川洋一. MFG8: タイ肝吸虫の感染による胆管癌の新たな腫瘍マーカー. 第 82 回日本寄生虫学会大会, 2013 年 3 月 29-31 日、東京医科歯科大学 (東京都)

[図書] (計 2 件)

- ① Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Boonjaraspinyo S, Pinlaor S, Pairojkul C, Chamgramol Y, Takahashi Y, Maekawa Y. 三恵社、Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions, 2013 年、p68-74
- ② 呉 志良, 長野 功, 高橋優三: 「寄生虫学研究材料と方法」2012 年版、三恵社、2012, 154.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呉 志良 (WU ZHILIANG)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 90313874

(2) 研究分担者

長野 功 (NAGANO ISAO)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 40283296