様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ５ 月 ２８ 日現在

機関番号：１６１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１１５１０

研究課題名（和文）小児先天性胆道拡張症における胆道癌発癌機構解明に関する研究

研究課題名（英文）Clarification on mechanism of carcinogenesis for pediatric congenital biliary dilatation

研究代表者
森　大樹（MORI, Hiroki）

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：７０４４８３３０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：小児先天性胆道拡張症（膵・胆管合流異常）における胆道癌発癌機構を明らかにすることを目的とした。非担癌小児先天性胆道拡張症症例、胆道癌症例、非担癌胆嚢摘出術症例の胆嚢内胆汁中のメタボローム解析を行い、発癌関連候補物質として、アミノ酸ではロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン、チロシン、バリン、メチオニンの6候補物質、脂質ではリソフォスファチジルコリン、リソフォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルグリセロール、リソフォスファチジルグリセロール、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、セラミド、スフィンゴミエリン、脂肪酸、ハイパーフォリン、ビタミンDの11候補物質が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
メタボローム解析を用いた小児先天性胆道拡張症（膵・胆管合流異常）における胆道癌発癌機構の機序解明により、胆汁中の発癌関連候補物質が同定でき、胆道癌患者と同様に胆道がそれらに暴露されていることが分かった。さらに、発癌機序にROS依存的DNA損傷修復応答経路の関与も示唆された。以上のことから、小児期から胆道上皮は発癌ポテンシャルを有している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose was to investigate the mechanism of carcinogenesis for pediatric congenital biliary dilatation (pancreaticobiliary maljunction: PBM) patients using a metabolomics analysis of bile. In the amino acid profiles, 6 potential carcinogenic candidates for PBM were identified; such as leucine, phenylalanine, isoleucine, tyrosine, valine and methionine. In the lipidomic profiles, 11 candidates such as lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, lysophosphatidylglycerol, triacylglycerol, diacylglycerol, ceramide, sphyngomyeline, fatty acid, hyperforin and vitamin D were identified. The bile metabolites were proved to be extremely similar between PBM and extrahepatic bile duct cancer (EHBC) patients, furthermore, amino acid and lipid metabolism was dramatically altered compared with healthy controls. Therefore, the biliary tract in PBM patients was considered to be always exposed to carcinogenic environments just like that in EHBC patients.

研究分野：小児外科

キーワード：先天性胆道拡張症　小児　胆道癌　発癌　メタボローム解析

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９

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、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として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%に胆道癌が認められ、通常の胆道癌自然発生率（0.0146%）と比較して約 1500 倍とはるかに高い数字であることを報告している。

膵・胆管合流異常は前癌病変と考えられ、分子生物学的検討も散見される。まず、拡張胆管においては細胞回転が亢進していることや炎症性サイトカインや細胞分裂シグナルによって発現が促進され、異型上皮などで高率に見られる COX2 が膵・胆管合流異常例の非癌部でも高発現であることが報告されている。さらに膵・胆管合流異常における癌化に関連するとされる遺伝子がいくつか報告されている。K-Ras 点突然変異は合流異常例癌部において 80%に認められるが、非合流異常例非癌部では 0%であるのに対し、合流異常例非癌部には 40%以上の症例に認められる。また p53 の発現は、非合流異常例非癌部では 0%であるが、合流異常例非癌部では 20%に認められる（Langenbecks Arch Surg 2009）。すなわち、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、これにいくつか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、依然として膵・胆管合流異常の胆道上皮において、過形成から化生性変化、異型上皮化、上皮内癌、癌へと進展するプロセスの全容は明らかになっていない。さらに、小児先天性胆道拡張症における胆道癌発癌機構に関する検討はほとんどないのが現状である。しかし、最近の我々の研究結果では、成人非担癌膵・胆管合流異常の胆道上皮において、HDAC（histone deacetylase）の高発現、細胞回転の亢進、K-ras の高発現を認めており、発癌機構として epigenetic 修飾の関与が示唆されるといった結果が得られている。さらに、最近では炎症と発癌との関連が注目を集めているが、本症の病態も持続的な慢性炎症下での発癌であり、炎症下で発現が増強される遺伝子改変酵素である AID（activation-induced cystidine deaminase）（Nature 2007）の関与、つまり genetic 修飾の関与も示唆される。

一方、現在でも発癌の新規遺伝要因探索が世界中で展開されているが、ゲノミクス、トランスクリプトミクスは発癌リスクを予測するのに対し、メタボロミクスは Genome 情報に依存せず、リアルタイムに発癌イベントの要因を評価可能である（Sci Rep. 2015）。実際、DNA 配列の網羅的解析（ゲノミクス）や蛋白質の網羅的解析（プロテオミクス）では、実際の細胞内ではホメオスタシスによりゲノムレベルでの変動が表現型に一致しないことも多い。これまで細胞内代謝物の研究は技術的に困難であったが、代謝産物は表現型に最も近く、表現型での変化が観察しやすいという特徴があり、代謝産物の網羅的解析（メタボロミクス）が注目されている。

２．研究の目的

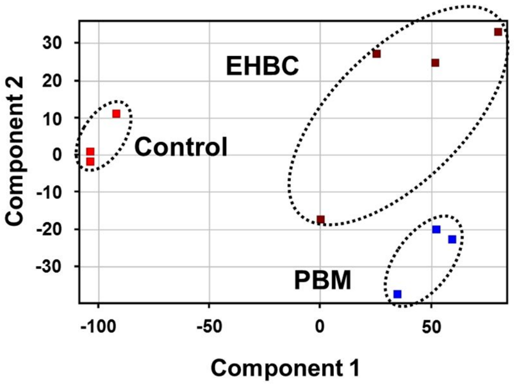
本研究では、まだほとんど検討されていない小児先天性胆道拡張症における胆汁・胆道上皮細胞に対して網羅的メタボローム解析を行うことで、胆道癌発癌機構の解明、ひいては胆道癌の予防法、新規診断・治療法を開発することを目的とする。

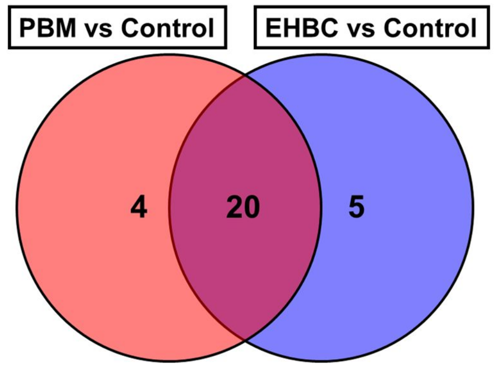
３．研究の方法

ヒト摘出検体における正常部と前癌病変部と癌部での検討：非担癌小児先天性胆道拡張症例、非担癌合流異常症例、胆道癌症例、非担癌胆嚢摘出術症例のヒト摘出検体を用いて、胆嚢内胆汁中のメタボローム解析（代謝産物の網羅的解析）を行う。

４．研究成果

アミノ酸解析での主成分分析では、膵・胆管合流異常（PBM）と胆管癌（EHBC）はコントロール（Control）と比べて分離を認めた。統計学的有意差があり（$p<0.05$）、fold change が 2.0 以上であるものは 30 候補物質であった。そのうち、コントロールと比較して膵・胆管合流異常と胆管癌に共通して同定できたものは 20 候補物質であり、さらに fold change が 20.0 以上であるものは、leucine、phenylalanine、isoleucine、tyrosine、valine、methionine の 6 候補物質であった。

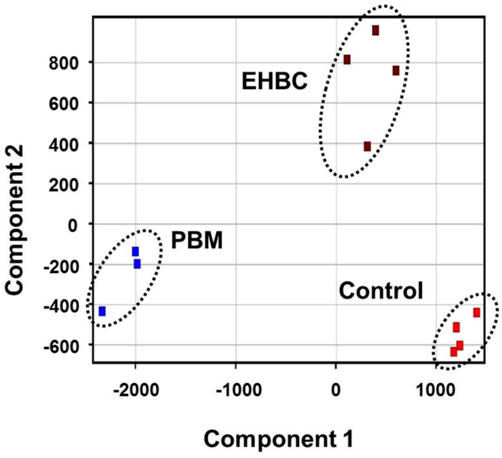




アミノ酸解析結果

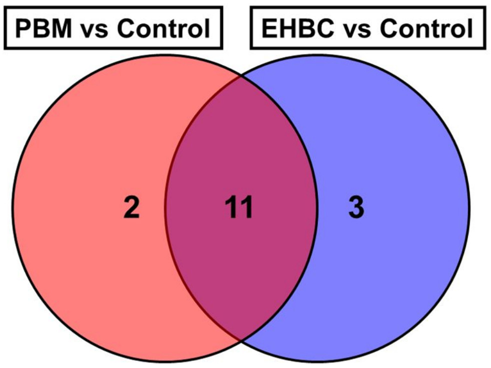
PBM vs Control		EHBC vs Control	
Compound	Fold	Compound	Fold
Isoleucine	73.1	Leucine	39.6
Phenylalanine	66.6	Phenylalanine	38.6
Tyrosine	60.6	Isoleucine	29.6
Leucine	55.3	Tyrosine	25.4
Tryptophan	43.0	Valine	23.8
Arginine	39.9	Methionine	22.7
Lysine	37.1	Citrulline	19.1
Valine	35.0	Lysine	17.1
Asparagine	33.7	Aspartic acid	15.4
Methionine	26.0	Tryptophan	13.1
Aspartic acid	19.7	Alanine	12.6
Serine	18.3	Threonine	12.2
Threonine	17.8	Asparagine	11.9
Histidine	14.7	Serine	11.3
Glutamine	12.0	Lactic acid	11.3
Alanine	11.8	Arginine	10.7
Cysteine	7.9	Proline	8.9
Proline	4.9	Ornithine	8.2
Glutamic acid	4.3	Histidine	8.0
pyruvic acid	3.2	glutamic acid	7.4
Glycerol	-2.3	Glutamine	5.2
3-phosphate Gluconic acid	-2.5	Pyruvic acid	4.6
Creatine	-3.6	2-hydroxybutyric acid	3.7
Creatinine	-4.3	Creatine	-2.4
		Cytidine	-2.7

脂質解析での主成分分析では、膵・胆管合流異常と胆管癌はコントロールと比べて分離を認めた。統計学的有意差があり（$p<0.05$）、fold change が 2.0 以上であるものは 225 候補物質であった。そのうち、コントロールと比較して膵・胆管合流異常と胆管癌に共通して同定できたものは 18 候補物質であり、さらに fold change が 200.0 以上であるものは、lysophosphatidylcholine、lysophosphatidylethanolamine、phosphatidylglycerol、lysophosphatidylglycerol、triacylglycerol、diacylglycerol、ceramide、sphyngomyeline、fatty acid、hyperforin、vitamin D の 11 候補物質であった。



脂質解析結果

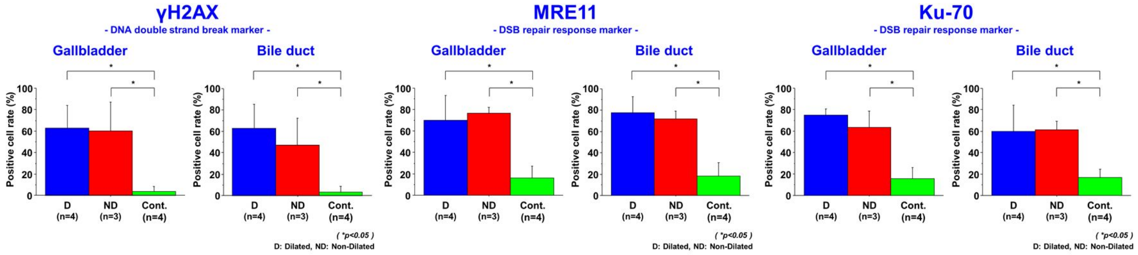
PBM vs Control		EHBC vs Control	
Compound	Fold	Compound	Fold
Lysophosphatidylcholine	422482	Sphyngomyeline	57450
Triacylglycerol	141506	Lysophosphatidylethanolamine	23071
Sphyngomyeline	82070	Triacylglycerol	18734
Lysophosphatidylinositol	53590	Ceramide	18506
Ceramide	53330	Phosphatidylglycerol	15623
Hyperforin	46983	Phosphatidylethanolamine	15498
Vitamin D	40977	Lysophosphatidylcholine	12302
Phosphatidylglycerol	22298	Phosphatidylcholine	12216
Lysophosphatidylglycerol	10858	Lysophosphatidylglycerol	7453
Diacylglycerol	8969	Diacylglycerol	5054
Lysophosphatidylethanolamine	7839	Vitamin D	3636
Fatty acid	6468	Fatty acid	1140
Phosphatidyl acid	5732	Hyperforin	884
Phosphatidyl Serine	-44546	Phosphatidyl acid	-614
Phosphatidylethanolamine	-130200	Phosphatidyl Serine	-2504
Phosphatidylcholine	-148601	Lysophosphatidylinositol	-29297



それらの候補物質のうち、発癌関連候補物質として、lysophosphatidylcholine、triacylglycerol、leucine、phenylalanine、isoleucine、tyrosine、valine、methionine が同定された。

さらに免疫染色で、胆道上皮において DNA 損傷マーカーであるγH2AX と、DNA 損傷修復応答マーカーである MRE11 と Ku-70 は、コントロールと比較して小児先天性胆道拡張症において有意に陽性率が高

く（胆嚢；γH2AX；胆管拡張症：コントロール＝62.5±20.6%：3.8±4.8%，P<0.01、MRE11；胆管拡張症：コントロール＝70.0±23.1%：16.3±11.1%，P<0.01、Ku-70；胆管拡張症：コントロール＝75.0±5.8%：15.5±10.5%，P<0.01、胆管；γH2AX；胆管拡張症：コントロール＝62.5±22.2%：3.3±5.8%， P<0.05、MRE11；胆管拡張症：コントロール＝77.5±15.0%：18.3±12.6%，P<0.01、Ku-70；胆管拡張症：コントロール＝60.0±24.5%：16.7±7.6%，P<0.01)、さらにK-rasの高発現も認めた。以上から、慢性炎症下にある小児先天性胆道拡張症においては、それらの発癌関連候補物質が ROS 依存的 DNA 損傷修復応答経路を介して胆道癌発癌に関与している可能性が示唆された。



本研究で、小児先天性胆道拡張症（膵・胆管合流異常）における胆道癌発癌機構の機序解明を進め、胆汁中の発癌関連候補物質を同定し、それらが胆道癌患者と同様に胆道を暴露していることが示唆された。さらに、それらの物質がROS依存的DNA損傷修復応答経路を介して発癌機構に関与している可能性も示唆された。

今後の研究計画としては、発癌関連候補物質を胆管細胞株に添加する in vitroでの検討を行い、胆管細胞内での経時的な発現変化を検討し、胆道癌発癌機構の解明、ひいては胆道癌の予防法、新規診断・治療法を開発することを進めていく予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計9件（うち査読付論文　9件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　5件）

１．著者名 MORI HIROKI、SAITO YU、IWAHASHI SHUICHI、IKEMOTO TETSUYA、IMURA SATORU、MORINE YUJI、SHIMADA MITSUO	４．巻 33
２．論文標題 Impact of Bevacizumab on Liver Damage After Massive Hepatectomy in Rats	５．発行年 2019年
３．雑誌名 In Vivo	６．最初と最後の頁 1469～1476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.11626	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 森大樹	４．巻 52
２．論文標題 手術用手袋の種類と役割	５．発行年 2020年
３．雑誌名 小児外科	６．最初と最後の頁 31-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 石橋広樹、森大樹、横田典子、島田光生	４．巻 52
２．論文標題 PSARP(中間位直腸肛門奇形)	５．発行年 2020年
３．雑誌名 小児外科	６．最初と最後の頁 158-162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 石橋広樹、森大樹、横田典子、島田光生	４．巻 51
２．論文標題 外科的疾患　先天性胆道拡張症と膵・胆管合流異常	５．発行年 2019年
３．雑誌名 小児外科	６．最初と最後の頁 1516-1520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 石橋広樹、森大樹	4．巻 120
2．論文標題 手術のtips and pitfalls　腹腔鏡下手術(LPEC法)	5．発行年 2019年
3．雑誌名 日本外科学会雑誌	6．最初と最後の頁 696-699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1．著者名 Sugimoto Mayumi、Ono Akemi、Yada Keigo、Mori Hiroki、Ishibashi Hiroki、Niki Noriko、Kagami Shoji	4．巻 65
2．論文標題 Manifestation of intraoperative anaphylactic shock along with latex allergy:a pediatric case report	5．発行年 2018年
3．雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6．最初と最後の頁 292～295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2152/jmi.65.292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1．著者名 Yada Keigo、Morine Yuji、Ishibashi Hiroki、Mori Hiroki、Shimada Mitsuo	4．巻 65
2．論文標題 Treatment strategy for successful hepatic resection of icteric liver	5．発行年 2018年
3．雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6．最初と最後の頁 37～42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2152/jmi.65.37	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1．著者名 森大樹，石橋広樹，矢田圭吾，島田光生	4．巻 38
2．論文標題 先天性胆道拡張症における胆道癌の発癌機序	5．発行年 2017年
3．雑誌名 胆と膵	6．最初と最後の頁 351-355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1．著者名 石橋広樹，島田光生，森根裕二，矢田圭吾，森大樹	4．巻 38
2．論文標題 先天性胆道拡張症の診療ガイドライン(簡易版)	5．発行年 2017年
3．雑誌名 胆と膵	6．最初と最後の頁 329-337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計8件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 森大樹、森根裕二、横田典子、石橋広樹、島田光生
2．発表標題 膵・胆管合流異常におけるDNA損傷修復経路を介した胆道癌発癌機構に関する検討
3．学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4．発表年 2019年

1．発表者名 森大樹、森根裕二、横田典子、石橋広樹、島田光生
2．発表標題 膵・胆管合流異常の胆道癌発癌機構にDNA損傷修復経路が関与する
3．学会等名 第42回日本膵・胆管合流異常研究会
4．発表年 2019年

1．発表者名 森大樹、森根裕二、矢田圭吾、石橋広樹、馬渡一諭、高橋章、島田光生
2．発表標題 メタボローム解析を用いた膵・胆管合流異常の胆汁中発癌物質の同定
3．学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4．発表年 2018年

１．発表者名
Hiroki Mori, Yuji Morine, Keigo Yada, Hiroki Ishibashi, Kazuaki Mawatari, Akira Takahashi, Mitsuo Shimada

２．発表標題
Identification of bile carcinogens in patient with pancreaticobiliary maljunction using metabolome analysis

３．学会等名
Pacific Association of Pediatric Surgeons

４．発表年
2018年

１．発表者名
森大樹、森根裕二、横田典子、石橋広樹、馬渡一諭、高橋章、島田光生

２．発表標題
膵・胆管合流異常における発がんメカニズムに関する検討

３．学会等名
第80回日本臨床外科学会総会

４．発表年
2018年

１．発表者名
森大樹、石橋広樹、矢田圭吾、島田光生

２．発表標題
慢性炎症下の小児先天性胆道拡張症の胆道上皮における発癌関連遺伝子発現の検討

３．学会等名
第117回日本外科学会定期学術集会

４．発表年
2017年

１．発表者名
森大樹、石橋広樹、矢田圭吾、島田光生

２．発表標題
重症心身障害児のGERDに対する腹腔鏡下Nissen-Rossetti噴門形成術の検討

３．学会等名
第54回日本小児外科学会総会

４．発表年
2017年

１．発表者名 森大樹、森根裕二、矢田圭吾、石橋広樹、島田光生
２．発表標題 膵・胆管合流異常の胆汁中発癌物質におけるメタボローム解析の検討
３．学会等名 第40回日本膵・胆管合流異常研究会
４．発表年 2017年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	矢田　圭吾 (YADA Keigo) (00633893)	徳島大学・病院・特任助教 (16101)	
研究分担者	石橋　広樹 (ISHIBASHI Hiroki) (20314867)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学系）・講師 (16101)	
研究分担者	臼井　規朗 (USUI Yoshiro) (30273626)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター（研究所）・小児外科・主任部長 (84408)	
研究分担者	森根　裕二 (MORINE Yuji) (60398021)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学系）・准教授 (16101)	
研究分担者	高橋　章 (TAKAHASHI Akira) (90304047)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学系）・教授 (16101)	