

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08659

研究課題名（和文）胆汁中の酸化コレステロールによる胆道がん増殖メカニズムと治療に関する研究

研究課題名（英文）Effects of biliary oxysterols on the growth of bile duct cancer

研究代表者

鈴木 修司（Suzuki, Shuji）

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：30246566

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：27-ヒドロキシコレステロール（27HC）は胆汁中に存在する酸化ステロールであり、エストロゲン受容体（ERs）の活性化作用を持つ。27HCによるERsの活性化は乳癌の増殖を促進し、胆管癌の半数にもERs発現があることから、胆管癌での27HCの作用を検討した。ER発現ヒト肝外胆管癌由来株（TFK-1）に27HCを添加すると、10nM以上の濃度で有意に増殖が促進し、ER阻害剤PHTPPの同時添加でその促進効果は消失した。一方、胆管癌患者の胆汁中27HC濃度は50-1000 nMであった。以上より、胆汁の27HCは、ERsを発現する胆管癌の増殖に影響を与えうる因子と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆管癌は5年生存率が膵癌に次いで低い予後不良の癌である。本研究成果によって、病理組織学的にエストロゲン受容体を発現している胆管癌では、患者の性別にかかわらず、術後にエストロゲン受容体の阻害剤を用いることによって、再発のスピードを抑制できる可能性が示唆された。新たな治療方法の開発や、27-ヒドロキシコレステロールが多く存在する他臓器癌での検討など、応用範囲が広い研究成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：27-Hydroxycholesterol (27HC) is one of the biliary oxysterols that activates estrogen receptors (ERs). Since 27HC stimulates breast cancer growth through the activation of ERs and about half of bile duct cancer also expresses ERs, we hypothesized that biliary 27HC modulates ER-positive bile duct cancer growth. A cell line (TFK-1) derived from human bile duct cancer expressing ER was cultured and incubated with 27HC. The cell growth was significantly promoted by adding more than 10 nM of 27HC. Besides, the addition of PHTPP, an antagonist of ER, canceled the growth promotion due to 27HC. Biliary concentrations of 27HC in bile duct cancer patients were 50-1000 nM, which was much higher than the levels added in cell culture media. These results suggest that biliary 27HC can stimulate the growth of ER-positive bile duct cancer in vivo. Therefore, the inhibition of ER activity may be a new strategy to inhibit the postoperative recurrence of ER-positive bile duct cancer in both genders.

研究分野：消化器外科

キーワード：胆道がん 27-ヒドロキシコレステロール エストロゲン受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 胆道がんは全がんの中で、5年生存率が膵臓がんに次いで低く、予後の悪いがんである。乳がんにおいて、コレステロールの代謝物であるオキシステロールのひとつ、27-ヒドロキシコレステロール(27HC)が、エストロゲン受容体(ERs)のリグンドになり(Umetani et al. Nat Med 2007;13:1185-92) 乳がんの増殖・進展を促進していることが報告された(Nelson et al. Science 2013;342:1094-8; Warner et al. N Engl J Med 2014;370:572-3)。

(2) 27HCは胆汁中にも多く存在すること、胆嚢癌、肝内肝外胆管癌を含めた胆道がんの約半数でERsが発現しているとの過去の報告があることから、胆道がんの増殖や進展にも27HCが重要な役割を演じている可能性が示唆された。

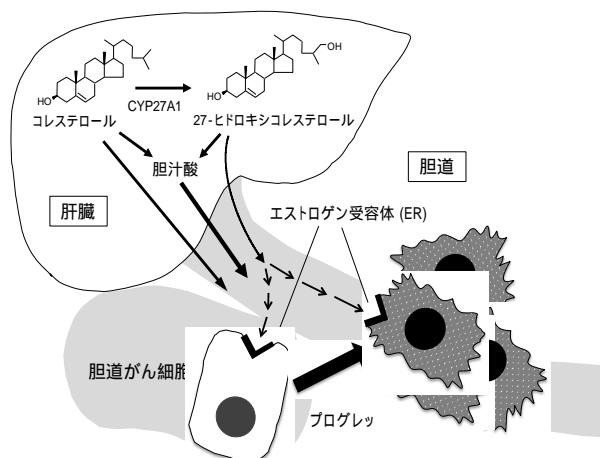


図1 27-ヒドロキシコレステロールによる胆道がんの進展メカニズム

2. 研究の目的

ERsを発現する培養胆管癌細胞へ27HCを添加することによって、本当に癌細胞の増殖が促進するか否かを明らかにし、さらに増殖促進を引き起こした濃度以上の27HCが胆道がん患者の胆汁中に実際に存在することを証明する。以上により、ERsの抑制による新しい胆道がん治療方法の開発に繋げることが目的である。

3. 研究の方法

(1) ER発現培養胆道がん細胞の準備

Riken Cell Bankより肝外胆管癌由来のTFK-1細胞株を購入し、継代培養して実験に用いた。また、ERsの発現を確認するために、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)を用いて培養細胞からRNAを抽出した。Reverse transcriptionによりcDNAを生成後、LightCycler (Roche)とFastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green Iを用いてERとERのmRNA発現定量を行った。

(2) TFK-1細胞への27HC投与の影響

TFK-1細胞を24-well plateに 2.5×10^4 cells/wellの濃度で播種し、RPMI1640培地(10% FBS)にて培養した。24時間後、フェノールレッド不含のRPMI1640培地に交換し、さらに24時間培養した。その後、エタノールに溶解した27HCまたはエストラジオール(E2)を、培地中の最終エタノール濃度が0.1%になるように添加して培養した。48時間後に細胞数をカウントし、コントロール(0.1%エタノールのみ添加)に対する増加比を算出した。

同様に、フェノールレッド不含培地でTFK-1細胞を24時間培養した後、27HCまたはE2と共にERβ特異的アンタゴニストであるPHTPPを添加した。48時間後に細胞数をカウントし、コントロール(0.1%エタノールのみ添加)に対する増加比を算出し、PHTPPを同時添加しなかった場合のデータと比較した。

(3) 胆汁中オキシステロール分析

同意の得られた胆道がん患者の手術時に採取した胆汁100 μLに、重水素標識されたオキシステロールを内部標準として添加し、1N KOHエタノール中で37℃、1時間加水分解した。ステロイド類をn-ヘキサンで抽出し、蒸発乾固後にピコリン酸で誘導体化して、HPLC-MS/MSにてオキシステロールの一斉分析を行った(J Steroid Biochem Mol Biol 121:556-564, 2010)。

4. 研究成果

(1) TFK-1細胞におけるERsの遺伝子発現

ERsにはERとERの2種類存在することが知られている。TFK-1細胞における両者の発現の有無を明らかにするため、real-time PCRを用いてERとERのmRNA発現を定量した。その結果、図2に

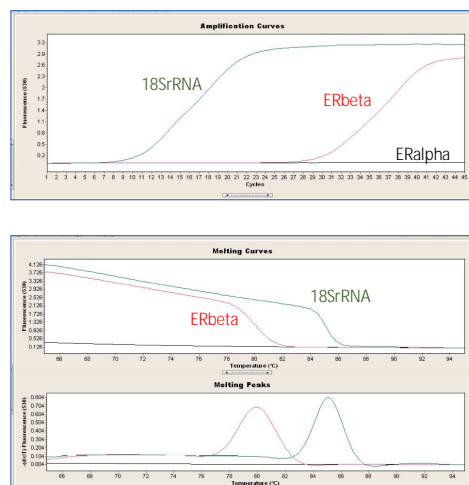


図2 TFK-1細胞におけるエストロゲン受容体の発現

示すように、TFK-1 細胞では ER α の発現は認められたが、ER β の有意な発現は認められないことが明らかになった。

(2) 27HC が TFK-1 細胞の増殖に与える影響

培地中へ最終濃度 1-1000 nM の 27HC、またはポジティブコントロールとして 10 nM の E2 を添加し、それらの添加が細胞増殖に与える影響を図 3 に示す。わずか 1 nM の 27HC 添加で、細胞増殖には促進傾向が認められ、10 nM 以上の濃度では、統計学的にも有意に増殖が促進されることが明らかになった。また、E2 は 27HC と同濃度では 27HC より強い増殖促進効果を認められたが、男性または閉経後女性の血中 E2 濃度は 0.07 nM 程度なのに対して、血中 27HC 濃度は 500 nM 程度あり、血中 27HC が E2 と違ってリポ蛋白に包まれていることを考慮しても、27HC の影響は無視できないと考えられた。

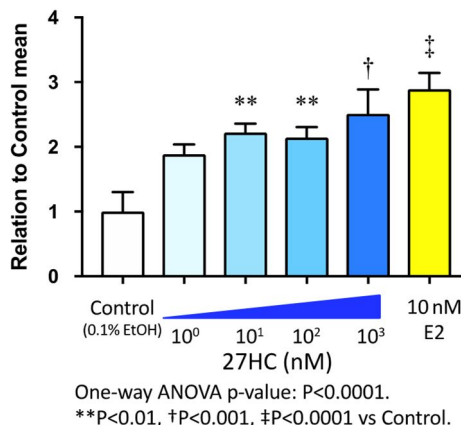


図3 27HCがTFK-1細胞の増殖に与える影響

(3) 27HC の TFK-1 細胞増殖促進に対する ER β 特異的アンタゴニストの抑制効果

TFK-1 細胞では ER β の発現を認めないことから、27HC と E2 による増殖促進効果は ER β の活性化を介していると推測される。それを証明するため、100 nM の 27HC または 10 nM の E2 に加えて、ER β 特異的アンタゴニストである PHTPP を 10 μ M の濃度で添加して細胞増殖を比較した。その結果、PHTPP の添加は 27HC または E2 による細胞増殖促進効果を有意に抑制した (図 4)。このことから、27HC と E2 による TFK-1 細胞の増殖促進は、いずれも ER β を介していると結論づけた。

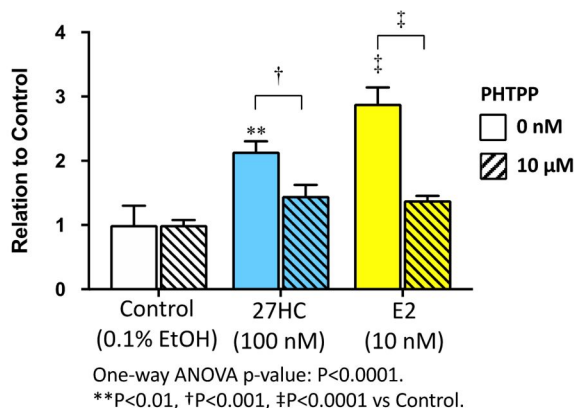


図4 27HCのTFK-1細胞増殖促進に対する ER β 特異的アンタゴニストの抑制効果

(4) 胆道がん患者の胆汁中オキシステロール濃度の定量

前述のように、健常人の血中には 500 nM 程度の 27HC が存在するが、胆道がん患者の胆汁中に実際にどの程度の 27HC が存在するのかを明らかにするため、胆汁中オキシステロールの一斉分析を行った。その結果、図 5 に示すように、胆汁中の 27HC 濃度は個体差が非常に大きい、血中と同程度の 50-1000 nM であった。個体差が大きい理由としては胆汁の濃縮率の違いが関係していると推測される。また、血中 27HC はリポ蛋白に包まれていて、遊離型よりも脂肪酸エステル型が優位なのに対して、胆汁中 27HC は胆汁酸、リン脂質とのミセル中に存在し、100%遊離型であるため、より癌細胞に取り込まれやすいと考えられる。

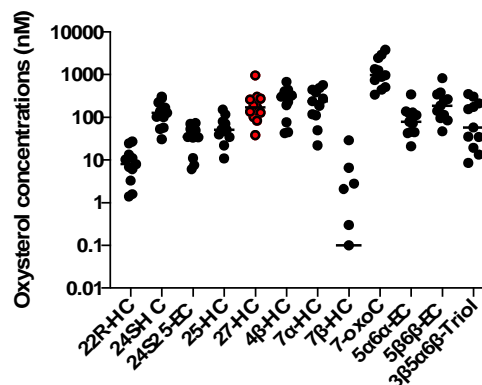


図5 胆道がん患者の胆汁中オキシステロール濃度

(5) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

ERs と 27HC の関係は乳癌ではよく検討されているが、その他の癌での検討は国内外を含めてほとんど行われていない。今回、婦人科系以外の癌の増殖に、エストロゲンのみならず 27HC が関連している可能性を明らかにした。このことは、ERs (特に ER β) を発現する婦人科系以外の癌の治療にも性別を問わず ERs の抑制が有用な可能性を示唆するものであり、学術的、社会的なインパクトは大きいものと考えられる。

(6) 今後の展望

胆道がんは予後不良のがんであり、有効性の高い化学療法も確立されていない。今回、ER β を発現している肝外胆管癌細胞の増殖に 27HC が関与している可能性を証明したが、実際にどの程度の割合の肝外胆管癌で ER β が発現しているのか、ER β 発現肝外胆管癌には臨床的にどのような特徴があるのかを調査する計画である。さらに、胆嚢癌、肝内胆管癌などその他の胆道がんでも同様の検討を行い、最終的には ER β 発現胆道がんに対して、ER β 阻害による術後再発の抑制を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鈴木 修司、下田貢、丸山常彦、大城幸雄、森下由紀雄	4. 巻 33
2. 論文標題 長期生存を認めている胆管原発癌肉腫の1切除例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 胆道	6. 最初と最後の頁 272-279
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 Suzuki Shuji, Shimoda Mitsugi, Shimazaki Jiro, Maruyama Tsunehiko, Oshiro Yukio, Nishida Kiyotaka, Kuroda Jun, Miyoshi Kenta, Koike Nobusada, Harada Nobuhiko	4. 巻 Volume 12
2. 論文標題 <p>Number of positive lymph nodes and lymphatic invasion are significant prognostic factors after pancreaticoduodenectomy for distal cholangiocarcinoma</p>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 255 ~ 262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/CEG.S207333	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鈴木修司
2. 発表標題 遠位胆道癌根治術後adjuvant chemotherapyにおけるS-1の検討
3. 学会等名 日本胆道学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 修司
2. 発表標題 Number of positive lymph nodes and lymphatic invasion are significant prognostic factors after pancreaticoduodenectomy for distal cholangiocarcinoma
3. 学会等名 Asia Pacific Hepatobiliary Association 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Suzuki
2. 発表標題 Dissected margin is a significant prognostic factor for distal cholangiocarcinoma
3. 学会等名 International Hepato-Pancreato Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 修司
2. 発表標題 遠位胆管癌切除例の臨床病理学的因子における無再発生存予後因子の検討
3. 学会等名 日本消化器病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 修司
2. 発表標題 胆石症に対する胆嚢癌高リスク因子における術前臨床生理学的因子の検討
3. 学会等名 日本胆道学会
4. 発表年 2018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	本多 彰 (Honda Akira) (10468639)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宮崎 照雄 (Miyazaki Teruo) (60532687)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	
研究分担者	下田 貢 (Shimoda Mitsugi) (90332999)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関