

研究種目： 基盤研究(B)
研究期間： 2007 ~ 2010
課題番号： 19390348
研究課題名(和文) 肝門部胆管癌からの胆管癌幹細胞の分離と網羅的遺伝子解析に基づく分子標的治療の開発
研究課題名(英文) The development of the molecular target therapy for cancer stem cell in cholangiocarcinoma
研究代表者
 椰野 正人 (NAGINO MASATO)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：20237564

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：肝門部胆管癌、胆管癌幹細胞

1. 研究計画の概要

癌に対する新たな治療法としての分子標的治療薬などが開発され、消化器癌の多くは治療成績が飛躍的に向上しつつある。肝門部胆管癌は化学療法や放射線療法には治療効果が認められず、手術で切除する以外には有効な治療法はない。最近の分子生物学の進歩により癌の発生、進展機序において癌幹細胞の存在が指摘されている。癌幹細胞は分化能と自己複製能を有する細胞で効率に癌を作ることが報告されている。癌幹細胞の分離においては癌幹細胞のマーカーの特定が重要である。本研究では、肝門部胆管癌より胆管癌幹細胞を分離し、その網羅的遺伝子解析により新たな癌幹細胞のマーカーを同定し、それらの遺伝子に対して分子標的治療を開発し、その実用化を目指すものである。本研究の最終目的は、胆管癌幹細胞を標的にした新たな分子標的治療による肝門部胆管癌の治療成績の向上である。

2. 研究の進捗状況

(1) 胆管癌幹細胞の分離およびその網羅的遺伝子解析

①臨床サンプルより入手が容易な胆管癌由来細胞株 HuCCT1 からの胆管癌幹細胞の分離を行った。分離した CD45 陰性、TER 陰性、CD49 f 陽性、c-Met 陽性細胞には肝細胞のマーカーであるアルブミン、胆管細胞のマーカーであるサイトケラチン 19 の発現がなかった。
②このため異なるマーカーとして大腸癌において癌幹細胞のマーカーとして報告されている CD133 に対する磁性ビーズを用いて胆管癌由来細胞株 HuCCT1 から CD133 陽性の癌幹細胞の分離を行った。十分量の細胞が採取

可能であり、CD133 陽性胆管癌細胞と CD133 陰性胆管癌細胞の遺伝子解析を行い、CD133 の発現の有無による遺伝子発現の違いについて解析中である。

(2) 胆管癌細胞株、造血幹細胞、骨髄細胞などを用いた siRNA の機能解析、とくに副作用などの検討

①分離した CD133 陽性胆管癌細胞と CD133 陰性胆管癌細胞に関してウェスタンブロッティング法で癌特異的遺伝子 Nek2(NIMA related kinase2) の発現を検討した。CD133 陽性、陰性いずれの細胞においても、Nek2 は発現しており、その発現量に有意な差がなかった。

(3) 担癌動物実験モデルを用いた siRNA の効果的かつ安全な投与方法の開発

①膵癌細胞株 KP4 を用いたヌードラット肝転移モデルに対して脾静脈に留置したアクセスポートを用いて Nek2 siRNA を投与した。この結果、肝転移巣数の減少および各肝転移巣の腫瘍径の縮小を認め、肝転移に対する有効性を明らかにした。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

理由：

研究開始直後、臨床サンプルでの胆管癌幹細胞の分離において、回収された細胞数が 1×10^7 個と不十分であり、RNA 収量も不十分であり、網羅的遺伝子解析をおこなうことができなかった。また回収された胆管癌幹細胞に不要な細胞(血球細胞)が混入しており実験を円滑に進めることができなかったため。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 胆管癌幹細胞の分離およびその網羅的遺伝子解析の継続

① 肝門部胆管癌症例の集積と保存

② 胆管癌幹細胞の分離

③ 胆管癌幹細胞に対する網羅的遺伝子解析

(2) 胆管癌幹細胞を標的にした siRNA の開発の継続

① 遺伝子発現の抑制効果の検討

② 導入効率の検討

③ 作用機序の解明

④ siRNA の塩基配列の検討

⑤ siRNA への化学修飾の検討

(3) 胆管癌細胞株、造血幹細胞、骨髄細胞などを用いた siRNA の機能解析、とくに副作用などの検討

① 癌細胞への効果の検討

② RNA 発現プラスミドを用いた研究

③ 副作用の検討

(4) 担癌動物実験モデルを用いた siRNA の効

果的かつ安全な投与方法の開発

① 導入効率の検討

② 副作用の検討

(5) ラット肝切除モデルの開発と siRNA の効果の検討

5. 代表的な研究成果

(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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他]