

機関番号：13901  
 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）Molecule targeted therapy for Cholangiocarcinoma based on the gene profiling of cancer stem cell  
 研究代表者  
 榑野 正人 (NAGINO MASATO)  
 名古屋大学・医学系研究科・教授  
 研究者番号：20237564

## 研究成果の概要（和文）：

分化能と自己複製能を有する癌幹細胞が癌の発生、進展機序において重要であることが指摘されている。胆管癌由来細胞株 HuCCT1 より CD133 抗体を用いて分離した CD133 陽性胆管癌細胞と CD133 陰性胆管癌細胞の DNA アレイ法による網羅的遺伝子解析を行なった。その結果 CD133 の発現と肝幹細胞の表面マーカーと考えられている CD45、TER、CD49 f、c-Met の発現の間に関連性を見いだすことはできなかった。また胆管癌由来細胞株 HuCCT1 から分離した CD133 陽性胆管癌細胞と CD133 陰性胆管癌細胞のヌードマウス皮下発癌モデルにおいて、大腸癌と異なり胆管癌では腫瘍形成能に有意差がないことが明らかになった。これは癌由来臓器の違い、CD133 以外の癌幹細胞マーカーの関与など様々なことが原因と考えられた。

ま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た Nek2 siRNA を経門脈的投与により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、肝転移に対して siRNA の経門脈的な薬剤投与方法が有効であることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Cancer stem cell, have the ability of differentiation and self-reproduction, is important in carcinogenesis and cancer progression.

We analyzed a gene profiling between CD133 positive HuCCT1 and the CD133 negative HuCCT1 by DNA array. As a result, we were not able to find the relationship between CD133 and hepatic stem cell marker, such as CD45, TER, CD49f, and c-Met.

And then, we inoculated CD133 positive HuCCT1 and the CD133 negative HuCCT1 in the nude mouse. There was significant difference of carcinogenesis in this model. We considered that this caused in various factors, such as the cancer origin, another cancer stem cell marker except CD133.

In addition, we administered Nek2 siRNA in liver metastasis of a nude rat through portal vein using the access port. We recognized decrease of the number of the liver metastasis and the reduction of the tumor volume.

We clarified that the drug delivery system of siRNA through the portal vein was effective.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：胆管癌幹細胞、分子標的治療、肝門部胆管癌

#### 1. 研究開始当初の背景

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。しかし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、進展機序において分化能と自己複製能を有する癌幹細胞の存在が指摘されている。

#### 2. 研究の目的

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同定した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。また癌幹細胞の分離より癌幹細胞のマーカーの特定が重要である。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。

#### 3. 研究の方法

＜胆管癌幹細胞の分離およびその網羅的遺伝子解析＞

胆管癌臨床サンプル、ヒト胆管癌由来細胞株 HuCCT1 より FACS および磁性ビーズを用いて、胆管癌幹細胞の分離を行った。分離した胆管癌幹細胞に関して免疫染色により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 の発現を検討した。

大腸癌幹細胞の表面マーカーと考えられている CD133 抗体を用いて、ヒト胆管癌由来細胞株 HuCCT1 を CD133 陽性胆管癌細胞と CD133 陰性胆管癌細胞に分離し、網羅的遺伝子解析を行った。

＜胆管癌細胞株を用いた siRNA の機能解析、とくに副作用などの検討＞

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 kinase 2) の発現を検討した。

＜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＞

分離した CD133 陽性胆管癌細胞と CD133 陰性胆管癌細胞をヌードマウスに移植し皮下発癌モデルを作成し、その腫瘍サイズなどに関して比較検討した。

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 を用いてその投与方法の有効性を検討した。

#### 4. 研究成果

＜胆管癌幹細胞の分離およびその網羅的遺伝子解析＞

胆管癌サンプルより FACS を用いて CD45 陰性、TER 陰性、CD49 f 陽性、c-Met 陽性細胞を分離した。この分離で回収された細胞数は  $1 \times 10^7$  個であり、生存細胞数も少なく、RNA 収量も不十分であり、研究に必要とされるレベルに到達しなかった。そのため分離方法を変更し磁性ビーズを用いて行った。この方法により分離細胞数は十分採取できたが、分離した CD45 陰性、TER 陰性、CD49 f 陽性、c-Met 陽性細胞の免疫染色により胆管細胞のマーカーであるサイトケラチン 19 の発現と肝細胞のマーカーであるアルブミンの発現を認めなかった。サイトケラチン 19 の発現を認めなかったことより、この分離細胞内にはわれわれの予想した胆管癌幹細胞は存在していても極めて少ないことが考えられた。次に臨床サンプルではなく胆管癌由来細胞株 HuCCT1 より磁性ビーズを用いて、CD45 陰性、TER 陰性、CD49 f 陽性、c-Met 陽性細胞の分離を行った。HuCCT1 から分離した CD45 陰性、TER 陰性、CD49 f 陽性、c-Met 陽性細胞の免疫染色においても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 の発現を認めることができなかった。

そのため表面マーカーを変更し検討することとした。大腸癌幹細胞の表面マーカーと考えられている CD133 抗体を用いて胆管癌由来細胞株 HuCCT1 を CD133 陽性胆管癌細胞と CD133 陰性胆管癌細胞に分離し検討を行った。十分量の細胞が採取可能であり、RNA 量も存在しており DNA アレイ法による網羅的遺伝子

解析を行った。CD133 陽性胆管癌細胞と CD133 陰性胆管癌細胞の間に CD45、TER、CD49 f、c-Met の発現に定まった傾向は存在していなかった。現在その他の遺伝子発現についても詳細に解析中である。

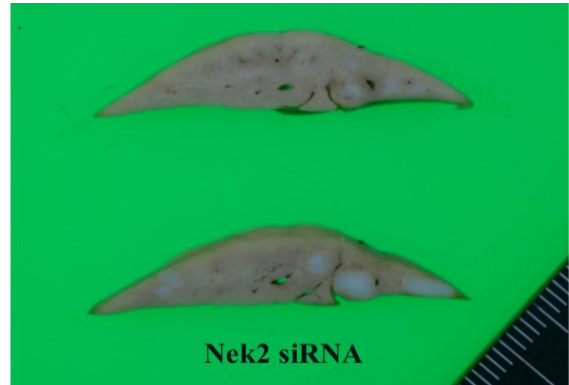
<胆管癌細胞株を用いた siRNA の機能解析、とくに副作用などの検討>

胆管癌由来細胞株 HuCCT1 から分離した 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。

<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法の開発>

胆管癌由来細胞株 HuCCT1 から分離した CD133 陽性胆管癌細胞と CD133 陰性胆管癌細胞をヌードマウスに移植し皮下発癌を作成した。いずれの群においても、移植 7 日目以降に腫瘍形成され 21 日目の時点で腫瘍サイズに有意差はなかった。大腸癌においては CD133 の発現の有無により腫瘍形成までの時間、サイズに差があるとの報告がされている。しかし胆管癌で有意差はなかったことについて、由来臓器の違い、CD133 以外の癌幹細胞マーカーの存在など様々なことが原因として考えられる。これらについては今後の更なる検討が必要である。

siRNA の薬剤投与方法に関して膵癌細胞株 KP4 を用いたヌードラット肝転移モデルを用いて検討した。脾静脈に留置したアクセスポートを用いて Nek2 siRNA を経門脈的に肝転移に投与し、その有効性を検討した。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 (図 1)、肝転移に対して有効でありアクセスポートを用いた門脈内への siRNA の薬剤投与方法の有効性を明らかにした。



## 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 16 件)

- ① Nagino M, Nimura Y, Kamei Y. (他7名)  
Hepatectomy with simultaneous resection of the portal vein and hepatic artery for advanced perihilar cholangiocarcinoma: an audit of 50 consecutive cases. Ann Surg. 252(1):115-23. 2010査読有
- ② Yokoyama Y, Sugawara G, Nagino M. Value of indocyanine green clearance of the future liver remnant in predicting outcome after resection for biliary cancer. (他5名) Br J Surg. 97(8):1260-8. 2010査読有
- ③ Watanabe K, Yokoyama Y, Nagino M. (他7名) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 prevents inflammatory response and endothelial cell damage in rats with acute obstructive cholangitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 298(3):G410-8. 2010 査読有
- ④ Takayama Y, Kokuryo T, Senga T. (他6名) Silencing of Tousled-like kinase 1 sensitizes cholangiocarcinoma cells to cisplatin-induced

- apoptosis. *Cancer Lett.* 296(1):27-34. 2010 査読有
- ⑤ Suzuki K, Kokuryo T, Hamaguchi M. (他5名)  
Novel combination treatment for colorectal cancer using Nek2 siRNA and cisplatin. *Cancer Sci.* 101(5):1163-9. 2010 査読有
- ⑥ Kawai K, Kokuryo T, Nagino M. (他5名)  
Inchinkoto, an herbal medicine, exerts beneficial effects in the rat liver under stress with hepatic ischemia-reperfusion and subsequent hepatectomy. *Ann Surg.* 251(4):692-700. 2010 査読有
- ⑦ Igami T, Nagino M, Yokoyama Y (他4名)  
Clinicopathologic study of cholangiocarcinoma with superficial spread. *Ann Surg.* 249(2):296-302. 2009 査読有
- ⑧ Tsunoda N, Kokuryo T, Nagino M. (他4名)  
Nek2 as a novel molecular target for the treatment of breast carcinoma. *Cancer Sci.* 100(1):111-6. 2009 査読有
- ⑨ Matsubara H, Nagino M, Nimura Y, (他9名)  
Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene* 26(41):6099-105. 2007 査読有
- ⑩ Nagai H, Nagino M, Nimura Y, (他7名)  
CLCP1 interacts with semaphoring 4B and regulates motility of lung cancer cells. *Oncogene* 26:4025-31. 2007 査読有
- ⑪ Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y.  
Mechanism of impaired hepatic regeneration in cholestatic liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.*;14:159-66. 2007 査読有
- ⑫ Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. (他5名)  
1) Recent advances in treatment of hilar cholangiocarcinoma: Portal vein embolization. *J HPB Surg.* 14:447-54. 2007 査読有
- ⑬ Kawai T, Yokoyama Y, Nagino M, (他2名) Is there any effect of renal failure on the hepatic regeneration capacity following partial hepatectomy in rats? *Biochem Biophys Res Commun.* 352:311-6. 2007 査読有
- ⑭ Kokuryo T, Yokoyama Y, Nagino M (他3名)  
Nek2 as an affective target for inhibition of tumorigenic growth and peritoneal dissemination of cholangiocarcinoma. *Cancer Research* 67(20):9637-42. 2007 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 國料俊男、横山幸浩、榑野正人  
siRNAを用いた癌分子標的治療のトランスレーショナルリサーチ  
JDDW 2010, 2010. 10. 13-16, 横浜
- ② Kokuryo T, Senga T, Yokoyama Y, Nagino M, Hamaguchi M.  
Nek2 as an effective molecular target for cancer treatment  
AACR 101<sup>st</sup> annual meeting, Apr 17-21 2010, Washington DC, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榑野 正人 (NGINO MASATO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20237564

### (2) 研究分担者

横山 幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座講師  
研究者番号：80378091

國料 俊男 (KOKURYO TOSHIO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：60378023

### (3) 連携研究者 なし