

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究（B）海外学術調査

研究期間：2009～2011

課題番号：21406019

研究課題名（和文）タイ肝吸虫による胆管細胞がん発症の分子疫学的研究と予防法の確立

研究課題名（英文）Molecular epidemiological study on cholangio-carcinogenesis induced by liver fluke *Opisthorchis viverrini* in Thailand.

研究代表者

川西 正祐 (KAWANISHI SHOSUKE)

研究者番号：10025637

研究成果の概要（和文）：

タイ肝吸虫感染による肝内胆管細胞がんにおいて、幹細胞マーカーの CD133、OV6、CK-19、および DNA 損傷塩基の 8-oxodG と 8-ニトログアニンの局在が一致していた。CD133 および CK-19 の発現と、患者予後との相関性が認められた。胆管癌で特徴的に酸化ストレスによってカルボニル化されているタンパク質を 14 種同定し、カルボニル化部位を明らかにした。さらにカルボニル化と患者予後とが相関することが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Cholangiocarcinoma (CCA) is associated with chronic inflammation caused by liver fluke infection. Stem cell markers (CD133, OV6, CK-19) and DNA base damage (8-oxodG, 8-nitroguanine) were clearly colocalized in CCA. We identified 14 highly carbonylated proteins in CCA tissues. The oxidative modification of these proteins was significantly associated with poor prognoses as determined by the Kaplan-Meier method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：DNA 損傷・感染・炎症・がん予防・酸化ストレス・胆管癌・肝吸虫

1. 研究開始当初の背景

寄生虫感染症は世界中で数億人が罹患しており、特に発展途上国において重要な健康問題である。川魚の生食の習慣があるタイ東北部は、肝吸虫の感染率がきわめて高く、肝内胆管細胞がんの多発地域である。タイ肝吸虫感染は国際がん研究機関（IARC）において group 1（ヒトに発がん性を有する）と評価されているが、発がん機序は不明である。

我々は感染・炎症関連発がん機構において、

活性酸素・窒素種による酸化およびニトロ化 DNA 損傷を重要視し、特に炎症による突然変異誘発性の DNA 損傷塩基「8-ニトログアニン」に注目してきた。タイ肝吸虫感染ハムスターでは、肝内胆管上皮に 8-ニトログアニンが著明に生成されることを世界で初めて明らかにした (BBRC 2003, Carcinogenesis 2004, Nitric Oxide 2004)。タイとの国際共同研究では、タイ肝吸虫感染者・がん患者の尿で酸化 DNA 損傷の生成が増加し、寄生虫駆除薬投与により改善することを見だし、胆管細胞

がん予防の可能性を示した (Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev. 2008)。以上より、酸化・ニトロ化 DNA 損傷をバイオマーカーとして利用し、炎症関連発がんリスクおよび治療効果を評価することが可能と考えた。

近年、「がん幹細胞説」が提唱され、胆管細胞がんにおいても幹細胞の関与が示唆されている (Komura et al. Hepatology, 2008)。炎症部位では、炎症によって損傷した組織の修復や再生のために幹細胞が増殖する。炎症部位での幹細胞/前駆細胞は、炎症によって生じた活性酸素・窒素種に暴露され、DNA 損傷が蓄積すると予測される。自己再生能をもつ幹細胞/前駆細胞における DNA 損傷は発がんに重大な影響を及ぼすことから、発がん機序にもとづく予防戦略をたてるうえで解析が不可欠である。

以上から、がん幹細胞マーカーも含め、胆管細胞の発がん過程で誘導される特異的な新規タンパク質マーカーを探索し、これまでに成果を上げてきた炎症特異的 DNA 損傷マーカーの 8-ニトログアニンと組み合わせ、感染・炎症による発がんリスク評価およびがん予防に有用なバイオマーカー解析法の開発ができると考えた。

2. 研究の目的

タイ肝吸虫による胆管細胞がんの進展と関連して増加するタンパク質および損傷や修飾を受けるタンパク質を明らかにし、新規タンパク質マーカーの候補とする。また候補タンパク質マーカーの患者組織における局在を明らかにし、DNA 損傷 (8-ニトログアニンおよび 8-oxodG) および幹細胞/前駆細胞の局在と比較解析することにより、候補タンパク質マーカーを発がんリスク評価のために選別する。選別した新規タンパク質マーカーと DNA 損傷マーカーとを組み合わせ、患者データと解析結果を総合的に評価し、有効な発がんリスク評価法を確立する。

以上から、感染関連発がんにおけるバイオマーカー解析法の有効性を証明し、がん予防法の確立をめざす。

3. 研究の方法

《調査研究実施国・地域》
疫学調査は、タイ肝吸虫の流行地域であるタイ東北部にて行った。コンケン大学タイ肝吸虫研究センターを拠点とし、コンケン大学の Yongvanit 教授 (タイ肝吸虫研究センター副所長) の協力を得て行った。解析は鈴鹿医療科学大学と三重大学で行った。

(1) 関連疾患患者の生体試料収集

インフォームド・コンセントの得られた地域住民を対象としてタイ肝吸虫患者と肝内胆管がん患者に関する疫学調査を行った。現地病院の協力を得て、臨床試料 (血液・尿・肝生検組織・手術標本) およびデータを得た。

(2) 病理診断

持ち帰った組織サンプルは、標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色により病理学的診断を行った。

(3) 抗 8-ニトログアニン抗体の作製

8-ニトログアニンのリボースを開裂して生成したアルデヒドとウサギ血清アルブミンとの複合体を作成して、ウサギに皮下注射した。血液を採取し、アフィニティーカラムを用いて高感度かつ特異的な抗 8-ニトログアニン抗体を精製した。

(4) 8-ニトログアニンの局在の検討

自作した 8-ニトログアニン抗体と各種市販抗体を用いて、患者組織標本の二重蛍光免疫組織染色を行った。8-ニトログアニンおよび酸化 DNA 損傷の指標である 8-oxodG の生成部位を解析し、炎症像との関係を検討した。8-ニトログアニンの相対的生成量を免疫組織染色の所見から定量化し、各疾患の病期および予後 (生存期間) との関連について解析した。腫瘍性疾患に関しては、癌部と非癌部における所見を比較した。

(5) プロテオミクス解析

蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム (2D-DIGE) によりタンパク質ディファレンス解析を行った。患者組織標本からタンパク質を抽出し、腫瘍組織と正常組織で発現や損傷・修飾に差異のあるタンパク質を新規タンパク質マーカーの候補として選別し、サンプリングした。さらに質量分析装置 MALDI-TOF/TOF を用いて同定した。

(6) タンパク質マーカーの選別

臨床データとの関連からタンパク質マーカーの候補を選び、タンパク質マーカー候補の抗体を作製し、蛍光免疫二重染色を行い、組織中の局在を 8-ニトログアニン・8-oxodG と比較した。さらに幹細胞/前駆細胞マーカーを用いて、幹細胞/前駆細胞における DNA 損傷とタンパク質マーカーの局在を比較した。

4. 研究成果

タイ肝吸虫感染による肝内胆管細胞がんは、アルブミンを発現する肝細胞がんと、サイトケラチン 19 を発現する胆管細胞がんの、両方の性質をあわせもっていることを示した。また、幹細胞マーカーである CD133 と OV6、CK-19、および DNA 損傷塩基である 8-oxodG と 8-ニトログアニンの局在が一致していることを示した。さらに、CD133 および CK-19 の発現と、肝内胆管細胞がん患者の予後との相関性が認められたことは興味深い。

また二次元電気泳動-発現差解析により、癌組織と周辺正常組織を比較し、胆管癌で特徴的に酸化損傷を受けているタンパク質を探索した。その結果、alpha 1-antitrypsin (AAT)やトランスフェリンなど胆管癌で特徴的にカルボニル化されているタンパク質を14種、同定することに成功した。タンパク質のカルボニル化は、酸化ストレスによっておこる不可逆的な損傷である。セロトランスフェリン、HSP70.1、alpha 1-antitrypsin (A1AT)は、癌組織で有意にカルボニル化されており、質量分析装置 LC-MALDI-TOF/TOF による解析結果から、カルボニル化部位はそれぞれ R50、K327、P357 であることが分かった。

以前から AAT の遺伝子異常により肺気腫や肝臓疾患を引き起こすことは知られていたが、本研究では肝内胆管癌の進展や転移に重要な役割を果たすことが示唆された。またトランスフェリンなど鉄結合性のタンパク質は、カルボニル化されると局所における鉄の蓄積や放出に影響を及ぼし、鉄フェントン反応によって酸化ストレスを増加させる可能性を示した。

タンパク質の適時破壊に重要なユビキチン・プロテアソーム経路に関与する HSP70.1 や、タンパク質分解酵素に抵抗性をもつ A1AT のカルボニル化は、損傷タンパク質の蓄積やタンパク質の機能不全をおこし、胆管癌の進展につながる可能性がある。さらにカルボニル化と患者予後とが相関することが分かったことは、分子疫学的マーカー候補として重要な成果である。

今後は、これらのターゲットタンパク質を新規マーカーとし、DNA 損傷マーカーである 8-ニトログアニンを組み合わせて解析することにより、高精度な胆管細胞がんのリスク評価を行い、がん予防・診断法の確立をめざす。

わが国では、寄生虫による炎症関連発がんは発生していないが、炎症関連発がんの例として、バレット食道炎について研究した。炎症疾患バレット食道炎は食道がんのリスク要因となるが、その発がん機構には炎症に伴って生じる NO が、ニトロ化 DNA 損傷の 8-ニトログアニンを生成することを示した。さらに、食道がんリスク低減のためにプロトンポンプ阻害剤を投与した患者では、これら DNA 損傷塩基量も低減し、がん予防の有用なマーカーとなることが分かった。

本研究で有効性が明らかになったバイオマーカー解析法を用いることで、発展途上国において頻度の高い感染・炎症関連発がんの予防に貢献でき、国際保健学的問題を解決できる。さらに、炎症関連がん予防対策を確立することは、C 型肝炎ウイルス感染による肝臓がんやピロリ菌感染による胃癌など、日本における感染・炎症関連発がんの予防にも寄

与できる可能性があり、非常に意義深い。

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 20 件)

1. Thanan R, Oikawa S, Yongvanit P, Hiraku Y, Ma N, Pinlaor S, Pairojkul C, Wongkham C, Sripan B, Khuntikeo N, Kawanishi S, Murata M. Inflammation-induced protein carbonylation contributes to poor prognosis for cholangiocarcinoma. *Free Radic Biol Med*. 2012 ;52(8):1465-72. 査読有り DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.018
2. Murata M, Thanan R, Ma N, Kawanishi S. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 623019. 査読有り DOI: 10.1155/2012/623019
3. Thanan R, Murata M, Ma N, Hammam O, Wishahi M, El Leithy T, Hiraku Y, Oikawa S, Kawanishi S. Nuclear Localization of COX-2 in relation to the Expression of Stemness Markers in Urinary Bladder Cancer. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:165879. 査読あり DOI: 10.1155/2012/165879
4. Ma N, Thanan R, Kobayashi H, Hammam O, Wishahi M, El Leithy T, Hiraku Y, Amro el-K, Oikawa S, Ohnishi S, Murata M, Kawanishi S. Nitrative DNA damage and Oct3/4 expression in urinary bladder cancer with *Schistosoma haematobium* infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 414(2):344-9. 査読あり DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.073
5. Ohnishi S, Saito H, Suzuki N, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S. Nitrative and oxidative DNA damage caused by K-ras mutation in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(2):236-40. 査読あり DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.08.076
6. Ma N, Sasoh M, Kawanishi S, Sugiura H, Piao F. Protection effect of taurine on nitrosative stress in the mice brain with chronic exposure to arsenic. *J Biomed Sci*. 2010 Aug 24;17 Suppl 1:S7. 査読あり DOI: 10.1186/1423-0127-17-S1-S7
7. Hiraku Y, Kawanishi S, Ichinose T, Murata M. The role of iNOS-mediated

- DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 ;1203:15-22. Review. 査読あり DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05602.x
8. Ma N, Sasaki T, Sakata-Haga H, Ohta K, Gao M, Kawanishi S, Fukui Y. Protective effect of taurine against nitrosative stress in the stomach of rat with water immersion restraint stress. *Adv Exp Med Biol.* 2009;643:273-83. 査読あり
 9. Hiraku Y, Kawanishi S. Immunohistochemical analysis of 8-nitroguanine, a nitrosative DNA lesion, in relation to inflammation-associated carcinogenesis. *Methods Mol Biol.* 2009;512:3-13. 査読あり DOI: 10.1007/978-1-60327-530-9_1

〔学会発表〕 (計 20 件)

1. Mo Yingxi, RRAD with tumor suppressive function is aberrantly methylated in nasopharyngeal carcinoma. 第 82 回日本衛生学会総会, 2012 年 3 月 25-26 日, 京都
2. Thanan Raynoo, Protein carbonylation in liver fluke-induced cholangiocarcinoma in relation to poor prognosis. Mahidol International Conference on Infection and Cancer, 2012 年 2 月 6 日-2 月 8 日, タイ国バンコク市
3. Thanan Raynoo, 寄生虫感染による幹様細胞における酸化・ニトロ化 DNA 損傷. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 5 日, 名古屋市
4. Mo Yingxi, 上咽頭がんにおけるゲノムワイドなメチル化 DNA の解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3 日, 名古屋市
5. S. Kawanishi, N. Ma, M. Onoda, H. Inano, S. Ohnishi, M. Murata. : Role of mutagenic 8-nitroguanine in estrogen-dependent radiation-induced mammary tumorigenesis of rats. 14th International Congress of Radiation Research. Warsaw, Poland. 2011.8.
6. S. Kawanishi, S. Ohnishi, H. Saito, N. Suzuki, Y. Hiraku, M. Murata. : K-ras activation and oxidative DNA damage. 2009 Annual Meeting of the Society for Free Radical Research-Europe, Rome, Italy, 2009.8.

〔図書〕 (計 5 件)

1. N. Ma, M. Murata, S. Ohnishi, R. Thanan, Y. Hiraku, S. Kawanishi. Chapter 10, 8-Nitroguanine, a Potential Biomarker to Evaluate the Risk of Inflammation-Related Carcinogenesis. 2012.4, Biomarker (Edited by Tapan Kumar Khan), InTech, p.201-224
2. S. Kawanishi, S. Ohnishi. K-ras activation and oxidative DNA damage. 2009.8, Free Radicals, Health and Lifestyle (Editors: Daniela Caporossi, Fabio Pigozzi, Stefania Sabatini), Medimond, p.75-78
3. 川西正祐, 大西志保. 第 1 章 炎症、C.2 炎症とがん. 2009.6, 炎症・再生医学事典 (松島綱治、西脇徹 編) 朝倉書店、p.328-331

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川西 正祐 (KAWANISHI SHOSUKE)
 鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授
 研究者番号：10025637

(2) 研究分担者

村田 真理子 (MURATA MARIKO)
 三重大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：10171141

平工 雄介 (HIRAKU YUSUKE)
 三重大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：30324510

馬 寧 (MA NEI)
 鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・教授
 研究者番号：30263015

大西 志保 (OHNISHI SHIHO)
 鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手
 研究者番号：80511914

井上 純子 (INOUE SUMIKO)
 鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授
 研究者番号：20378657

鎮西 康雄 (CHINZEI YASUO)
 鈴鹿医療科学大学・医用工学部・教授
 研究者番号：60024709

(3) 連携研究者

及川 伸二 (OIKAWA SHINJI)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10277006

海外研究協力者

P. Yongvanit コンケン大学 教授
R. Thanan 鈴鹿医療科学大学 ポスト・ド
クター