

## 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15日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591765

研究課題名（和文）

胆管細胞癌に対する新生血管・リンパ管および腫瘍内間質を標的とした分子治療研究

研究課題名（英文）

Angiogenesis and lymphagenesis targeted molecular therapy for cholangiocarcinoma.

研究代表者

平野公通（HIRANO TADAMICHI）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：90340968

研究成果の概要（和文）：炎症性サイトカイン受容体である CXCR2 の肝内胆管癌における関与および制御による増殖抑制について検討。肝内胆管癌細胞株を用いて増殖、遊走、浸潤への CXCR2 の関与を SiRNA および CXCR2 アンタゴニストを用いて検討した。ヒト肝内胆管癌細胞株をマウス皮下に移植し、in vivo における CXCR2 制御による腫瘍への影響を検討。

結果：CXCR2 SiRNA およびアンタゴニストを用いた CXCR2 制御群では腫瘍の増殖、遊走、浸潤が抑制された。また皮下移植モデルにおいてはアンタゴニストを用いて制御することでその増殖能の抑制が可能であった。ケモカインレセプターである CXCR2 の制御は、肝内胆管癌の新たな治療戦略になりうる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the role of CXCR2 in intrahepatic cholangiocellular carcinoma (ICC). First, expression of CXCR2 is estimated by immunohistochemical staining in ICC using thirty ICC human specimens. Next, the role of CXCR2 was estimated in vitro by proliferation assay, migration assay, or invasion assay. In vivo effect was also estimated using xenograft mice model. As a result, blockage of CXCR2 significantly inhibited proliferation, migration, and invasion of ICC in vitro. Tumor growth of xenograft mice model was also inhibited by CXCR2 antagonist. Our results suggested that CXCR2 act crucial role in the development of ICC. Blockage of CXCR2 may be a promising therapeutic approach for ICC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

## 1. 研究開始当初の背景

胆管細胞癌(以下 CCC)は肝細胞癌に比して発生頻度は低い、切除症例においても5年生存率・無再発率ともに著しく低く強力な新規補助療法の開発が望まれる。現時点における補助療法はGemcitabinおよびTS-1による化学療法、放射線療法が標準的であるが、CCCはこれらに対しある程度の効果は期待できるが抵抗性である。この原因として現在までにCCCが有するIL-6を軸とした抗アポトーシスカスケード明らかにされている。しかし、CCCの浸潤・転移に必要な血管新生・リンパ管新生に関する報告はきわめて少なくさらなる探索が必要である。

## 2. 研究の目的

CCCの浸潤・転移を規定する血管新生・リンパ管新生に関する因子の同定および血管新生・リンパ管新生制御によるCCC分子治療法の開発

## 3. 研究の方法

### (1) ICC切除サンプルにおけるCXCR2の確認とその臨床病理学的パラメーターとの関連を解析

ICCの予後を規定する因子として門脈浸潤およびリンパ節転移が独立した因子として挙げられる。CXCR2の発現の強さと脈管浸潤、リンパ節転移あるいはその他の臨床病理学的パラメーターと何らかの関与が存在するのであれば、CXCR2はICCにおけるある種のバイオマーカーの役割を担う可能性もあり、その観点からもCXCR2は治療ターゲットになりうる。当科でのICC切除サンプルに対してCXCR2の免疫染色を行い、CXCR2の発現の程度と門脈浸潤およびリンパ節転移の相関について検討する。解析は統計学的手法を用いて評価する。

### (2) CXCR2の発現制御によるICCの増殖、遊走、浸潤の検討

CXCR2のノックダウンはSiRNAの手法を用いる。2種類のヒト胆管癌細胞株(RBEおよびSSP25)を用いてCXCR2発現制御下での増殖、遊走、浸潤における影響を検討する。SiRNAによってCXCR2の発現が確実に抑制されていることはRT-PCRを用いて確認する。以下実験ではSiRNA群とコントロール群の2群間での増殖、遊走、浸潤について比較検討を行う。

#### ① 増殖に関する検討

2種類のヒト胆管癌細胞株にSiRNAを行い、72時間後にアラマーブルーを培地に添加し吸光度を測定することでその増殖能を評価する。

#### ② 遊走に関する検討

SiRNAを行った24時間後に培地半分の細胞を除去し、除去後24時間後の観察を行う。

#### ③ 浸潤に関する検討

マトリゲルインベージョンチャンバーを用い、SiRNA施行後24時間の観察を行う。

観察はチャンバー内のメンブランを染色し、ポアを通過して浸潤した細胞数を任意の10視野で計測する。

### (3) CXCR2に対するアンタゴニスト使用下でのICCの増殖、遊走、浸潤の影響の検討

SiRNAを用いたCXCR2の制御下での実験同様にアンタゴニスト投与下での細胞への影響を検討する。CXCR2のアンタゴニストであるSB225002を細胞培地に添加し、上記(2)と同様、増殖、遊走、浸潤における影響を検討、観察する。SB225002については高濃度であれば細胞毒性を与える可能性があり、SB225002のIC50に相当する25nmol/Lより投与を開始し至適濃度を確立させる。

(4) 動物実験モデルを確立と生体内におけるケモカインレセプターの制御の影響の検討

2種類のヒト胆管癌細胞株を用いて免疫不全マウスの皮下に腫瘍を移植し担癌モデルを作製する。2種類の細胞株のうち担癌モデルとして本実験に適したモデルを使用する。細胞株単独で生着しない可能性もあるため、その場合は細胞外マトリックスを混入することとする。動物実験モデルが確立されたならば、アンタゴニスト投与群とコントロール群の2群間で、アンタゴニストを用いた生体内におけるCXCR2制御による抗腫瘍効果を検討する。抗腫瘍効果については腫瘍体積を経時的に測定し評価する。投与経路は腹腔内投与とし、隔日投与とした。また皮下腫瘍についても適時サンプリングし病理学的検討も行う。

4. 研究成果

(1) ICC切除サンプルにおけるCXCR2とその臨床病理学的パラメーターとの関連

ICC切除サンプルの免疫染色 (Fig. 1) では、全30症例の腫瘍部でのCXCR2の平均陽性率は64.3%であるのに対し、非腫瘍部の陽性率は421.9%であり統計学的有意差を認めた。

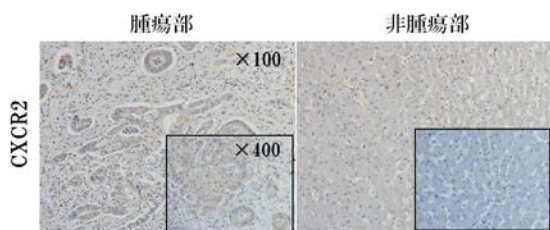


Fig. 1

臨床病理学的パラメーターとCXCR2発現の検討では、門脈浸潤の有無とCXCR2の発現強度に相関を認めた。すなわち、CXCR2強陽性(60%以上)を示す症例において

有意に門脈浸潤を認めた。

(2) CXCR2制御(SiRNAおよびアンタゴニスト)によるICCの増殖、遊走、浸潤の影響の検討

① 増殖への影響

SiRNAの手法を用いてCXCR2をノックダウンすると、有意に増殖が抑制された。(Fig. 2)

アンタゴニストを用いたCXCR2の制御においても有意に増殖が抑制された。(Fig. 3)

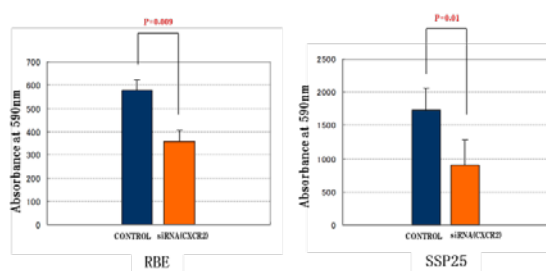


Fig. 2

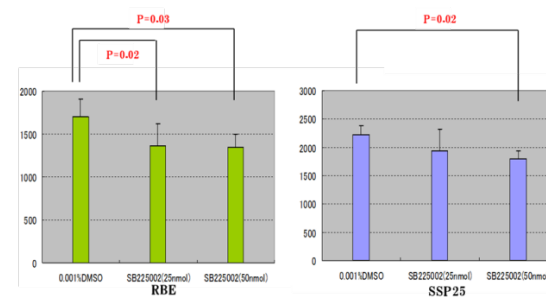


Fig. 3

② 遊走への影響

SiRNAによるCXCR2をノックダウンした群では、遊走機能が抑制された。(Fig. 4)

アンタゴニストを用いたCXCR2の制御においても、遊走機能は抑制された。(Fig. 5)

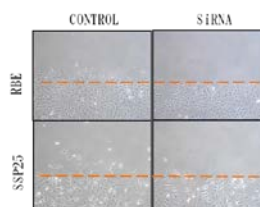


Fig. 4

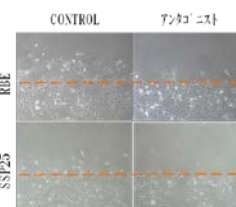


Fig. 5

③ 浸潤への影響

SiRNA群においては有意差をもって浸潤を抑制した(RBE P=0.007 SSP25 P=0.017)。

アンタゴニスト投与群も同様に有意に浸潤を抑制した。(Fig. 6)

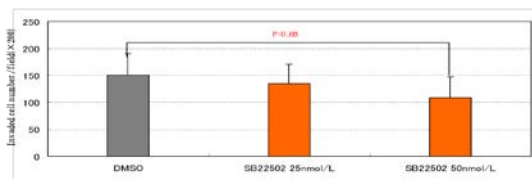


Fig. 6

### (3) 動物実験モデルを確立と生体内におけるケモカインレセプターの制御の影響の検討

CXCR2 を制御することで胆管細胞癌の増殖、遊走、浸潤はいずれも抑制することが可能であった。

次にこれらの現象が生体内でも同様に生じるかを検討した。胆管細胞株単独でのマウス皮下への生着は生じず、細胞外マトリックスを細胞株に混入し実験モデルを作成した。RBE は細胞外マトリックスを使用しても生着しなかった為、以下の実験成果はSSP25を用いた結果である。(Fig. 7)

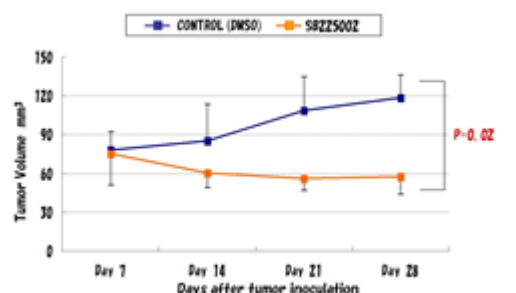


Fig. 7

Fig. 7 に示す如くアンタゴニスト投与群は腫瘍サイズの増大傾向を示さなかったのに対して、コントロール群ではアンタゴニスト投与群と比べて有意に増大を認めた。

Vitro, vivo においてCXCR2を制御することで腫瘍の進展の制御が可能であり、CXCR2 は ICC の新しい治療ターゲットになりうる事が示唆された。

## 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)

[学会発表] (計 件)

① Blockage of CXCR 2 suppresses cell proliferation, migration and invasion in intrahepatic cholangiocellular carcinoma  
H. Sueoka, T. Hirano, N. Uyama, U. Iimuro, T. Okada, J. Fujimoto  
European Society for Surgical Research (ESSR) 46 th Annual Congress, Aachen, Germany, May 27, 2011

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 公通 (HIRANO TADAMICHI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：90340968

(2) 研究分担者

宇山 直樹 (UYAMA NAOKI)

兵庫医科大学・医学部・研究生 (研究員)

研究者番号：70402873

佐竹 真 (SATAKE MAKOTO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70399153

飯室 勇二 (IIMURO YUUJI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：30252018

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199373

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：