

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460501

研究課題名(和文)胆道領域がんの発がん・増殖・進展にかかわる分子機構の解明と臨床治療への応用

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms involved in carcinogenesis, proliferation and progression of biliary tract carcinoma and its application to clinical treatment

研究代表者

尾島 英知(Ojima, Hidenori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：80342905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多数の胆道領域がんバイオリソースを用いて、発がん・増殖・進展に関わる分子機構の解明を行った。その結果、腫瘍発生部位に関連する4候補遺伝子が見いだされ、免疫組織学的検討で腫瘍存在部位に一致した発現傾向を得た。腫瘍進展因子IDCC(Intraductal carcinoma component;上皮内がん成分)に関連する50候補遺伝子の解析では、IDCC陰性群(高悪性度群)に高く発現している遺伝子の多くは転移・浸潤に関連した遺伝子であることが判明し、臨床病理組の解析結果の裏付けとなった。さらに、これら遺伝子を標的にした新規抗がん剤の前臨床試験も可能なin vitro assay系も確立された。

研究成果の概要(英文)：We have elucidated the molecular mechanisms of carcinogenesis, proliferation and progression of biliary tract carcinoma (BTC) using numerous BTC-related bio-resources. As a result, four candidate genes associated with different sites of tumor locations were found and immunohistochemical study using surgical specimens confirmed the consistency of their expression with the tumor existing sites. Analysis of 50 candidate genes associated with IDCC (Intraductal Carcinoma Component) as one of the histopathological BTC spreading and malignancy factors revealed that many highly expressed genes in the tumor group without IDCC (high-grade group) were involved in tumor malignancy related with metastasis or invasion. This data supported the clinicopathological features of IDCC. Furthermore, we have established in vitro assay system of BTC that enables preclinical study and appropriate parameters for novel anticancer drugs which targeting the above genes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胆道領域がん 細胞株 新鮮切除検体 遺伝子発現 データベース 免疫染色 前臨床試験

1. 研究開始当初の背景

すでに海外を中心に多くの研究施設で胆道領域がんに関する検討が行われているが、それらは比較的限定された症例数であり、さらに、胆道領域がんの先行病変には多様な地域差があるので、世界で報告された新事実がわが国の胆道領域がんにすべて当てはまるとは限らない。少なくともわが国では現時点までに、胆道領域がんに関して、1施設での非常に多くの症例の臨床病理学的検討を軸に臨床情報を含めた包括的な全体像を詳細に解明する研究はされていないのが実状である。

難治性のがんとされている胆道領域がんの治療成績向上、さらには発がん機構の解明のためには、まず、その臨床病理学的特性を詳細に把握することが必要であると同時に、それらと“紐付け”可能な臨床検体を用いた包括的な分子病理学的検討が急務である。手術の技術的な困難性などから我が国には今日まで豊富な切除症例を蓄積している施設は数少なく、手術標本の体系的な再鏡検等に基づく臨床病理学的な解析もまだ十分とは言いがたい。仮に、臨床病理学的な特性を発見したとしても、これらを決定づける分子機構の解明に欠かすことのできない胆道領域がんの新鮮切除検体の凍結材料を多数症例保持している施設は日本には殆ど存在しないと思われる。さらに、分子機構の解明の際の強力なツールとなる事が期待される胆道領域がん培養細胞株は未だ少数しか樹立されていないことから、胆道領域がんの進展様式を模倣する *in vivo*, *in vitro* モデルは樹立されていない。従って、詳細な解析は困難であった。

2. 研究の目的

本研究では多数の胆道領域がん臨床検体、培養細胞株を用いた分子病理学的解析に加えて、既に報告されている腫瘍進展様式に関わる分子機構を分子病理学的・免疫組織学的に解明することを目的とする。また、多数の日本人由来の新規胆道領域がん培養細胞株や手術標本、遺伝子発現プロファイルを統合した大規模な前臨床試験システムの確立をめざす。本研究から、胆道領域がんの発がん・増殖・進展を規定する機能分子の候補が同定でき、これらに対する阻害薬が存在する場合は、独自に確立した前臨床試験システムを用いて検証を行い、臨床への橋渡し研究に発展できる環境を整えることも目的とする。

3. 研究の方法

研究代表者が新たに樹立した日本人由来の胆道領域がん培養細胞株 13 種、ジェノグラフィトモデル 26 症例、凍結保存された胆道領域がん臨床サンプル 350 症例 (非腫瘍性胆管も含まれる)、手術症例約 400 症例の切除標本を軸に、以下の方法で研究を進める。

3-1) 胆道領域がんの遺伝子発現解析は、

手術材料から診療の為に採取され、診療の為に使用された残余の組織を 2003 年より一部凍結保存して蒐集したサンプルを用いる。また、研究代表者が樹立した日本人由来の胆道領域がん培養細胞株 13 種と市販株 4 株の計 17 細胞株を用いる。手術材料に関しては、凍結保存した検体から薄切標本を作製し、細胞株はピュレットを作製し、これらから RNA を抽出し、逆転写酵素処理により cDNA を得る。複数症例からの cDNA、あるいは必要に応じて増幅した cRNA について、種々のマイクロアレイを用いた網羅的な発現プロファイル解析を行う。

3-2) 腫瘍の増殖・進展様式を規定する遺伝子検索に関しては、研究代表者が、国立がん研究センター中央病院開院以来の全胆道領域がん約 400 症例の手術標本を再鏡検し、胆道領域がんの病理組織学的特性として提唱した腫瘍進展因子 IDCC (Intraductal carcinoma component; 上皮内がん成分) に注目することにした。胆道領域がん進展様式が IDCC 付随型、IDCC 非付随型に 2 分でき、IDCC 付随型症例においては局所における浸潤性増殖は IDCC 非付随型より軽微な傾向がある事を既に見出している。

さらに、用いた凍結材料に対応する患者手術標本にて、腫瘍の存在部位 (肝臓内と肝臓外) に関する検討も行う。病理学的に IDCC 付随の有無や腫瘍の存在部位についてそれぞれ群分けし、さらに正常胆管を含めた各群間で比較した遺伝子発現プロファイル解析の結果から、著明な差異のある分子を選出する。さらに、定量的 Real-Time PCR 法を施行して確認を行う。

3-3) 着目した分子に対し、既存抗体または必要に応じて新規に作製した抗体を用いて、多数のヒト胆道領域がんの手術標本を用いた免疫組織化学的検討を施行し、各型を特徴づける機能分子の発現の異常が臨床症例においても実際におこっていることを確認する。それらの因子のタンパク発現について詳細に観察し、がん増殖・進展に深く関連すると考えられる実際に高頻度に発現する分子を選別する。同時に、がんの臨床病理学的特性や患者の生命予後等との関係についても詳細に検討し、がんの生物学的特性の決定に寄与し、病態診断・予後予測の指標あるいは治療標的の候補となる分子の同定を行う。

3-4) 腫瘍の進展・増殖を規定する分子機構が解明された時に、それらを標的にした薬剤や、既存の薬剤などを適切に評価する大規模前臨床試験システムの確立を行うため、研究代表者が新たに樹立した日本人由来の胆道領域がん培養細胞株 13 種、ジェノグラフィトモデル 26 症例、凍結保存された胆道領域がん臨床サンプル 350 症例 (非腫瘍性胆管も

含まれる)、手術症例約 400 症例の切除標本さらに、これらの遺伝子プロファイルを統合させた前臨床試験システムの構築を行う。このシステムを用いて新規抗がん剤や既存抗がん剤の薬効試験だけでなく、遺伝子プロファイルを用いた薬効を規定する遺伝子検索や、既存の薬剤の上乗せ効果を実施して、前臨床試験の幅広い可能性を検討する。

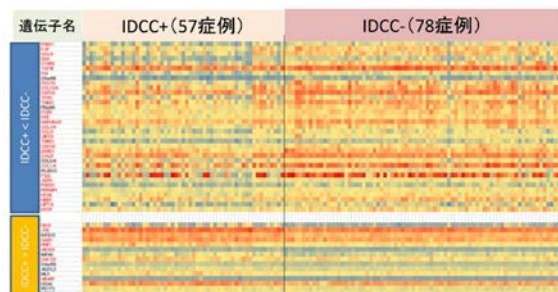
4. 研究成果

4-1) 非常に多数の凍結検体から、クオリティーの高い RNA の抽出とマイクロアレイを用いた網羅的な発現プロファイル解析、さらに匿名化された患者手術標本データと関連付けを行い、146 症例分の胆道領域がん遺伝子発現データベースを完成させた。細胞株に関しても同様の遺伝子発現データベースを完成させた。なお、これらの検討途中に一部マテリアルを研究代表者が共同研究者として参加している他の研究プロジェクトにも共有され、遺伝子変異のデータベースが同時に完成した。本データベースは単独施設としては最大級と考えられる。

4-2) 17 細胞株および 146 症例の胆道領域がん遺伝子発現データベースを用いて、腫瘍の存在部位（肝臓内と肝臓外）、進展様式腫瘍進展様式（上皮内がん成分（IDCC）の有無）に基づいたデータの群分けを行い、さらに正常胆管を含めた各群間で比較した遺伝子発現プロファイル解析の結果から、著明な差異のある分子を複数個選出し、定量的 Real-Time PCR 法を施行して発現の確認を行った。

腫瘍存在部位によって差のある遺伝子に関しては 4 分子まで絞り込み、免疫組織学的検討で腫瘍存在部位に一致した発現傾向を得た。

一方、IDCC の有無が検討可能な 135 例に関して差のみられた 50 個の候補遺伝子の解析で、IDCC を有さない腫瘍群（高悪性度群）に高く（IDCC+<IDCC-）発現している遺伝子の殆どは転移・浸潤に関連した腫瘍の悪性度に関わる遺伝子であった（図 1）。

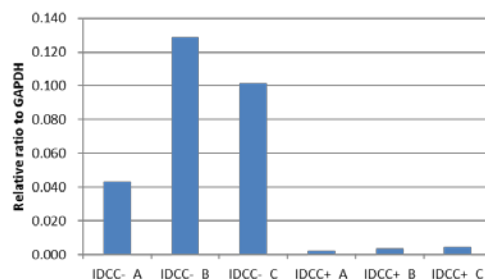


(図 1) ・ヒートマップはログの値が大きいほど赤く、低いほど青くなるように設定した
・悪性度に関する遺伝子を赤字にした。

この結果に基づき発現の高い手術検体と低い手術検体をそれぞれ 3 個選んだ後定量的

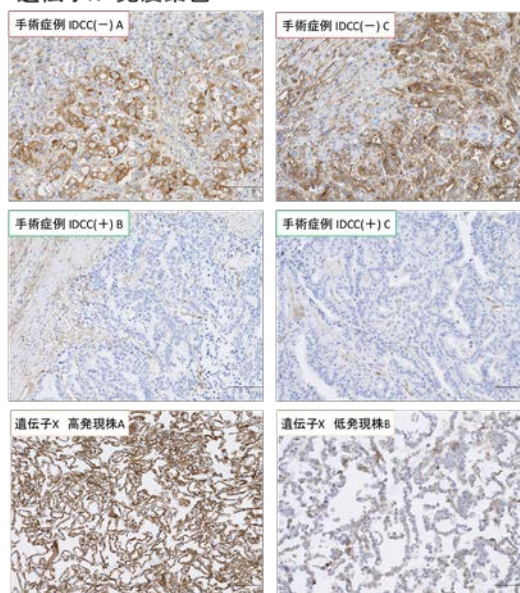
Real-Time PCR 法（図 2）を行い、切除法本で免疫染色を行い確認した。さらに細胞株での発現プロファイルから発現の高い株と低い株の免疫染色も行った（図 3）。

遺伝子 X Real-Time PCR



(図 2) 50 個の候補遺伝子から選び出された遺伝子 X の切除材料を用いた Real-Time PCR 結果

遺伝子 X 免疫染色



(図 3) 遺伝子発現に一致して免疫染色の発現を認める

同様の方法で今後さらなる絞り込みを行う予定である。

4-3) 前臨床試験に関して、現在標準化学療法とされるジェムシタピン (GEM) とシスプラチン (CDDP) の併用療法の効果を in vitro assay で初めて証明した。モル比 GEM:CDDP=1:1 の時は、17 細胞株中 14 株 (82%)、血漿クリアランス比を考慮したモル比 GEM:CDDP=7:1 の時は 17 細胞株中 13 株 (77%) に相乗効果が認められた。拮抗作用を示す株は認められなかった。この結果は、実臨床の結果を裏付ける結果となった。さらに、増殖に関わる遺伝子を標的にした新規抗がん剤 4 剤に関して、本 in vitro assay を用いて検討し、細胞株の遺伝子データベースとの照合で、一部の薬剤の標的遺伝子発現量と薬効との間に相関傾向が認められた。

また、細胞株遺伝子発現データベースとシスプラチン単独の本 in vitro assay での薬

効結果を照合した結果、シスプラチン感受性に関与する候補遺伝子を4分子まで絞り込み、いずれも細胞株を用いた免疫染色での発現と感受性がほぼ一致した。こういった胆道領域がんにおける多剤併用 in vitro assay は世界的に行われておらず、臨床試験でしか示すことができなかった多剤併用療法の薬効検討をも可能にした assay 系を確立したことは有意義と考えられる。

本研究により、腫瘍進展様式に関する臨床病理組的解析結果を裏付ける候補遺伝子が選定され、多剤併用試験をも可能にした胆道領域がん in vitro assay 系の確立により、これら遺伝子を標的にした新規抗がん剤の前臨床試験も可能になると考えられた。

なお、当初予定していた胆道がん培養がん細胞株や新鮮切除材料の免疫不全マウスへの同所性移植による進展様式を模倣する in vivo モデルの確立は、候補遺伝子の同定が十分でない点や動物倫理の観点から断念した。また、今回選出された腫瘍進展・増殖に関わる遺伝子や薬効に関連する候補遺伝子の in vitro による機能試験は、2017年度の科研費研究テーマに引き継がれ実践されてゆく予定である。

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 3 件) 全て査読あり

- ① Ojima H, Yamagishi S, Shimada K, Shibata T. Establishment of various biliary tract carcinoma cell lines and xenograft models for appropriate preclinical studies. *World J Gastroenterol.* 2016 Oct 28;22(40):9035-9038.
DOI: 10.3748/wjg.v22.i40.9035
- ② Shirota T, Ojima H, Hiraoka N, Shimada K, Rokutan H, Arai Y, Kanai Y, Miyagawa S, Shibata T. Heat Shock Protein 90 Is a Potential Therapeutic Target in Cholangiocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2015 Sep;14(9):1985-93.
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0069
- ③ Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Hiraoka N, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet.* 2015 Sep;47(9):1003-10.
DOI: 10.1038/ng.3375

[学会発表] (計 3 件)

- ① 尾島英知, 柴田龍弘, 金井弥栄 『胆道癌に対するベストな化学療法は何か 胆道癌モデルと臨床検体を用いた大規模前臨床試験システム確立の試み』 第 51 回日本胆道学会学術集会 2015 年 9 月 18 日、ホテル東日本宇都宮(栃木県宇都宮市)
- ② 山岸せり, 尾島英知, 坂本康成, 金井弥栄 『胆管がん細胞株を用いたゲムシタピンとシスプラチン併用による相乗効果の検討』 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
- ③ 尾島英知 『Pathology of the Liver Tumor, an Update』 第 74 回日本放射線学会総会 2015 年 4 月 17 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

④
[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
尾島 英知 (OJIMA, Hidenori)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：80342905