

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461983

研究課題名(和文)肝様腺癌に対する新規抗体を用いた治療戦略

研究課題名(英文)New strategy of treatment of hepatoid adenocarcinoma

研究代表者

高橋 伸育 (Takahashi, Nobuyasu)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20404436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝様腺癌は高率に肝転移を起こす胃癌の特殊型であり、薬剤への抵抗性を示す予後不良の疾患である。研究初年度に十二指腸乳頭部から発生した肝様腺癌細胞株の樹立を報じた論文を発表した(Int J Oncol. 2014;44(4):1139-45)。他の肝様腺癌細胞株と合わせて3種類の細胞株で三次元培養を行い、形態、機能解析を行った。今後はこれらの培養系を用いて治療に影響する蛋白の同定、解析を行う計画である。

研究成果の概要(英文)：Hepatoid adenocarcinoma is a special type of gastric cancer with high metastasis to the liver because of its drug resistance. In the first year of this study, we established a hepatoid adenocarcinoma cell line (Int J Oncol. 2014;44(4):1139-45). Using this cell line and other hepatoid adenocarcinoma cell line, we analysed cellular morphology and function by three dimensional culture. In the future, by this culture method, we are planning to identify and analyse a protein concerning new strategy of treatment of hepatoid adenocarcinoma.

研究分野：細胞形態

キーワード：肝様腺癌

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦で高頻度に見られる疾患である。近年の統計では1年間で新規に診断された癌患者は約56万人で、そのうち胃癌と診断されたのが約10万人と男女ともに高頻度に発症している。また死亡率は年々減少しているものの、約5万人が胃癌のために亡くなっている。

本研究の対象となる肝臓癌は、胃癌の組織型の中で特徴的な臨床経過を来すもので、肝臓以外の臓器で発症し、かつ癌胎児蛋白として知られる血清 - フェトプロテイン (AFP) の濃度上昇を伴う疾患と定義される。AFPは全肝臓癌のうち約65%にあたる多くの症例で上昇することが知られ、臨床的に治療や再発の指標として用いられる。通常の進行胃癌のうち肝転移を起こすのは3-6%と言われているが、肝臓癌では約72%に肝転移を伴い、高率にリンパ管浸潤、胃壁深部への浸潤を起こすことが報告されている。そのため予後は通常の胃癌と比較し、極めて不良であり、肝臓癌患者のほとんどは2年以内に死亡する。上記の理由に加えて、抗癌剤への感受性が低いことが予後不良の原因となっている。肝臓癌の発生頻度は数%と報告されているが、本邦における胃癌の高い発生頻度と、胃以外の消化管や肺などに由来する癌などでもその発生が多数報告されてきており、もはや希な腫瘍ではない。また肝臓癌の患者以外ではルーチンにAFPを測定することがないため、実際の患者数はさらに増加すると思われる。以上の理由から、肝臓癌患者の予後の改善に効果的な、新しい治療戦略の開発が急務とされている。

肝臓癌の悪性形質については、まだ不明な点が多い。現在報告されているのは肝臓癌の細胞株を用いた実験により、AFPの影響で血管新生が起こり肝転移をきたすというものである(Takahashi, *Oncol Rep.*, 2004)。この実験系ではAFPに対する抗体を用いるこ

とで抗腫瘍効果を認めている。また抗癌剤への耐性については、薬剤耐性遺伝子であるABCトランスポーターが肝臓癌で高発現していることが判明している(Kamata, *Histopathology*, 2008)。このABCトランスポーターは癌幹細胞でも高発現しており、AFP発現細胞が癌幹細胞の性質を持つことが報告されていることから、肝臓癌は癌幹細胞の性質を有している可能性がある。従って、本研究で計画されている解析を進めることで、癌幹細胞の本質に迫ることが期待される。

Glypican-3 (GPC3)は細胞膜上に発現する蛋白でグリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)アンカーにより細胞膜に結合したものである。近年、この遺伝子が胎児期の肝臓と肝細胞癌に発現することが報告され、AFPと同様の肝細胞癌マーカーとしての有用性が期待されている。研究代表者はC型肝炎ウイルスを罹患した肝細胞癌患者でGPC3を発現するものは予後不良であることを報告した(Yorita et al. *Liver Int.*, 2011)。この実験で用いた抗体gc33はGPC3に対する新規の抗体であり、肝細胞癌細胞株移植ヌードマウスに対する腫瘍縮小効果を有していることが報告されている(Ishiguro, *Cancer Res.*, 2008)。また肝臓癌でも肝細胞癌と同様にGPC3を発現することが報告されているため、この抗体を用いた肝臓癌に対する治療効果が期待される。これまで肝臓癌の細胞株として、いずれも胃原発の肝臓癌であるTakigawaやFU97などが汎用されてきたが、AFP、GPC3の多様な生物学的特性を捉えるには、胃以外の臓器を起源とする肝臓癌の細胞株を用いた新たな視点が必要である。最近我々は十二指腸乳頭部を起源とする肝臓癌の細胞株樹立に世界で初めて成功した。これにより、肝臓癌に対する様々な実験が可能となり、胃以外を起源とする肝臓癌が有する特殊性を明らかにする研究が可能とな

った。

## 2. 研究の目的

胃癌の特殊型である肝様腺癌は血清 AFP の上昇を伴い、通常の胃癌と比較して高率に肝転移を起こし、薬剤への抵抗性を示す予後不良の疾患である。その報告は年々増加する一方、その生物学的特性については不明な点が多く、研究に有用なツールも不十分である。研究代表者は十二指腸乳頭部を由来とする新規肝様腺癌細胞株の樹立に成功しており、これを用いて浸潤、転移に関わる因子を同定し、有効な治療戦略を確立することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 肝様腺癌細胞株の三次元培養：光顕、電顕的解析、コラーゲングルを用いた三次元培養による周囲微少環境との相互作用の評価

(2) 肝様腺癌細胞株の超微形態解析：高圧凍結装置を用いて固定した細胞の細胞内小器官、膜形態の評価

(3) 肝様腺癌細胞株における AFP、GPC3 の生物学的特性の解明：shRNA、siRNA を用いた抑制株の作製による関連遺伝子の探索、癌幹細胞的特性の評価

(4) gc33 の抗腫瘍効果の評価：肝様腺癌の抗体 gc33 を用いたヌードマウス移植片による分裂能、転移、浸潤能の評価

## 4. 研究成果

肝様腺癌は血清 AFP を高発現し、高率に肝転移を起こす胃癌の特殊型であり、薬剤への抵抗性を示す予後不良の疾患である。本研究は、当研究室で樹立された肝様腺癌細胞株を用いて遊走、浸潤に関わる因子を同定し、有効な治療戦略を確立することを目標とした。その成果として、研究初年度に十二指腸乳頭部から発生した肝様腺癌細

胞株の樹立を報じた論文を発表した (Int J Oncol. 2014;44(4):1139-45)。次に、この細胞株と同様に肝様腺癌由来で血清 AFP を産生する細胞株 FU97 と GCIY を入手し RNA の抽出を行った。また、当研究室では膵癌の細胞株をコラーゲングル内で三次元培養する手法を確立し、光顕に加えて電顕レベルの解析が行われており、入手した細胞株 FU97 と GCIY で三次元培養を行った。この過程で、コラーゲングルの厚みやゲル内に添加する物質、培地の量、気相液相界面法の有効性に関する検討を行い、細胞株 FU97 と GCIY に適した培養条件を確立した今後はこれらの培養系を用いて、肝細胞癌に発現される代表的な蛋白である GPC3 の発現量を RNAi の応用によって低下させ、本研究で確立された三次元培養法によって細胞の発育が制御されるか否かについて検証を進める計画である。

## 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1件)

Nobuyasu Takahashi, Fumiyo Aoyama, Masahide Hiyoshi, Hiroaki Kataoka and Akira Sawaguchi

Establishment and biological characterization of a novel cell line derived from hepatoid adenocarcinoma originated at the ampulla of Vater  
査読あり

Int J Oncol. 2014 Apr;44(4):1139-45

[学会発表](計0件)

[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

高橋 伸育 (Nobuyasu Takahashi)  
宮崎大学医学部・助教  
研究者番号：20404436

(2)研究分担者

青山 典世 (Fumiyo Aoyama)  
宮崎大学医学部・講師  
研究者番号：10468035

澤口 朗 (Akira Sawaguchi)  
宮崎大学医学部・教授  
研究者番号：30336292

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )