

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893091

研究課題名(和文) Aquaporinを標的とした、胆道癌新規抗癌剤治療の探求

研究課題名(英文) The search for new anti-cancer drug therapy in biliary tract cancer (targeted to Aquaporin)

研究代表者

関根 慎一 (Sekine, Shinichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：60649292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：組織マイクロアレイ(TMA)にて検討を行った。AQP-1は、腫瘍深達度、CEAなど、癌の進展や悪性化に伴い発現が低下した。胆汁酸暴露後の胆道癌細胞株では、AQP-1遺伝子の発現低下を認め、胆汁鬱滞や癌の進展にAQP-1が関与していた。胆道癌における予後予測因子としてAQP-1が有用であると考察された。化学療法施行の膵頭部領域癌症例の検討において、PTEN発現群は、非発現群に比較して予後良好であった(DSS ;  $p < 0.01$ )。胆道癌において、AQPと癌抑制遺伝子のPTENのco-expressionがapoptosisおよび化学療法感受性と深く関連している事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined AQP expression by tissue microarray (TMA). In biliary tract cancer cell lines after the bile acid exposure showed a decreased expression of AQP-1 gene. AQP-1 was involved in the progress of cholestasis and cancer. AQP-1 were considered to be useful as a prognostic factor in biliary tract cancer. In biliary tract cancer patients who underwent chemotherapy, PTEN expression group, compared to a non-expression group had a good prognosis (DSS;  $p < 0.01$ ). Our result suggest that AQP and PTEN may contribute to the apoptosis and chemotherapy sensitivity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胆道癌 アクアポリン 化学療法

### 1. 研究開始当初の背景

胆道癌治療における薬物療法、化学療法は重要性が一層高まっている。しかし、薬剤耐性の克服や効果予測の確立は喫緊の課題である。私達は、水チャンネル Aquaporin(AQP)が胆道癌における薬剤感受性に重要な機能を有することを初めて明らかにした。本研究の目的は、胆道癌の発生・進展における AQP とその調節異常機構を解明し、さらにはこの Aquaporin(AQP)を薬剤ターゲットとし、薬剤感受性を増強させ、副作用を回避する理想的な抗癌剤治療法を開発することである。

胆道癌は極めて予後不良の疾患である。現在、術後補助化学療法として塩酸ゲムシタピン(GEM)やテガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤(TS-1)が有望な薬剤として広く用いられている。また、切除不能胆道癌に対するゲムシタピン+シスプラチン併用療法(GC療法)が国際的な標準治療として位置づけられた事もあり、胆道癌治療における化学療法は重要性が一層高まっている。抗癌剤の標的組織に対するデリバリーはその組織細胞膜における輸送特性に着目することが重要と考えられている。

Aquaporin(以下 AQP)は、細胞形質膜上に存在する約 30kDa 細胞膜を介した水移動を担う water channel protein であり、AQP0~AQP12 の 13 種類が確認されている。AQP-1 は胆管や膵管などの正常腺管組織、血管内皮および新生血管で発現が確認されている(Saadoun S, et al. Nature 2005)。ほとんどの AQP は異物の侵入に対する生体防御を担う上皮組織に存在し、AQP を標的とする薬物が上皮細胞のサイトカイン産生すなわち免疫応答に著明な影響を与えとも考えられている(Sakumoto Y, et al, BBRC 2014)。悪性腫瘍では、胃癌・大腸癌・膵癌・肺癌等において AQP-5 の発現が報告されている。一方で、胆道癌においては、まだ十分な検討がなされていない。AQP には臓器特異性があり、多数のアイソフォームが遺伝子ファミリーを形成している。AQP には濃縮、外分泌、消化管吸収などにおいて重要な役割を演じていることが明らかになってきている。さらに、抗癌剤が AQP による細胞機能を介して様々な薬理作用を呈している可能性を考え、AQP を薬剤ターゲットとし、薬剤感受性を増強させ、副作用を回避する理想的な抗癌剤治療法を開発することを目的に本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

胆道癌治療における薬物療法、化学療法は重要性が一層高まっている。しかし、薬剤耐性の克服や効果予測の確立は喫緊の課題である。私達は、水チャンネル Aquaporin(AQP)が胆道癌における薬剤感受性に重要な機能を有することを初めて明らかにした。本研究の目的は、胆道癌の発生・進展における AQP とその調節異常機構を解明し、さらにはこの Aquaporin(AQP)を薬剤ターゲットとし、薬剤感受性を増強させ、

副作用を回避する理想的な抗癌剤治療法を開発することである。

### 3. 研究の方法

(1) マイクロアレイを用いた AQP 関連遺伝子の網羅的解析, cDNA アレイを用いた遺伝子解析、組織マイクロアレイによる発現解析; EMT およびアポトーシス経路に関連する遺伝子の検索を行う。特に、PI3K-Akt 経路の機能を抑制する PTEN や、Ras を経由して、Raf MEK ERK とリン酸化反応する ERK-MAPK 経路など、癌化に関連したシグナル伝達経路における AQP の役割を明らかにする。

(2) 胆道癌薬剤耐性株の作成; 新規樹立した胆道癌細胞株 (TYGBK-1、TYBDC) の Gemcitabine、TS-1、CDDP 各々に対する薬剤耐性株を作成し、miR-21 及び新たにマイクロアレイによる網羅的解析にて同定されたマイクロ RNA 発現を親株と比較する

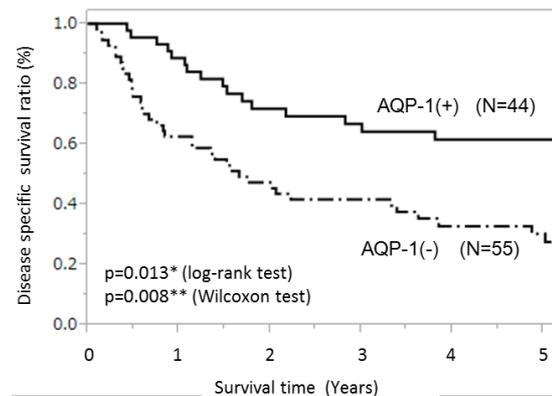
(3) 分子標的治療薬との関連

(4) 臨床検体、培養細胞により、感受性マーカーの同定及び機能解析を行う。

### 4. 研究成果

胆汁分泌との関連が注目されている AQP-1 と胆道癌(胆嚢癌、胆道癌、乳頭部癌)における検討を行った。切除標本の formalin 固定 paraffin 包埋切片を用いて各々の組織マイクロアレイ(TMA)を作成した。免疫組織化学的に AQP 発現を評価し、臨床病理学的因子との関連を解析した。

Survival rates of BTC patients with the AQP-1 expression



AQP-1 においては、腫瘍深達度、組織型、腫瘍径、CEA など、癌の進行や悪性化に伴い発現が低下していた。黄疸遷延症例では有意に AQP-1 発現が低下していた。

RT-PCR において胆汁酸暴露後の胆道癌細胞株では、AQP-1 遺伝子の発現低下を認めた。胆道癌症例において、黄疸遷延化による AQP-1 の発現低下を認め、胆汁鬱滞や胆道癌の進展に AQP-1 が関与していると考えられた。AQP-1 発現が、胆道癌における予後予測、悪性度予測因子として有用である可能性が示唆された。膵頭部領域癌症例の検討において PTEN 発現群は、非発現群に比較して予後良好であった。(DSS ;p<0.01)化学療法施行症例のみの検

討では、化学療法未施行症例に比較して、PTEN 発現による予後に差を認めた。癌抑制遺伝子の一つと考えられる PTEN の異常により、アポトーシスを抑制し、抗癌剤感受性を低下させていることから、PTEN 発現が化学療法感受性や予後予測に有用である可能性が示唆された。胆嚢癌においては、過去に RNA チップ (3D-Gene®)、RT-PCR による micro-RNA 発現解析にて、AQP-5 抑制細胞が、miR-21 のターゲット遺伝子の1つである癌抑制遺伝子 PTEN を抑制していることを確認したが、胆管癌、乳頭部癌を含めた胆道癌においても同様の傾向が認められ、AQP と PTEN の co-expression が apoptosis および化学療法感受性と深く関連している事が示された。AQP の臓器特異性を利用した分子標的治療および腫瘍の浸潤転移能の制御は、外科治療、放射線治療と組み合わせることにより、より個別化された集学的治療を行う事ができる。より効率的に化学療法を導入可能とするために、栄養、免疫学的側面より患者評価を行うシステムも構築中である。臨床的には、感受性予測が可能となれば、Downsizing resectionを目的とした化学療法としてより高い奏効率が期待できる。

#### 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 4 件)

Sekine S, Okumura T, Nagata T, Shibuya K, Yoshioka I, Matsui K, Hori R, Tsukada K. Expression Analysis of Aquaporin-1 (Aqp-1) in Human Biliary Tract Carcinoma. Journal of Cancer Therapy,(査読有), 2016,7,17-23 DOI: 10.4236/jct.2016.71003

Sekine S, Nagata T, Okumura T, Kawai K, Hirano K, Miwa T, Moriyama M, Hirofumi K, Hashimoto I, Shibuya K, Hojo S, Yoshioka I, Matsui K, Sawada S, Tsukada K. The Usefulness of Nutritional Index CONUT for Risk Assessment and Prognosis after Pancreaticoduodenectomy. Int J Cancer Clin Res,(査読有)

<http://clinmedjournals.org/articles/ijccr/international-journal-of-cancer-and-clinical-research-ijccr-3-041.pdf>,2016,3:041.

Okumura T, Shimada Y, Hojo S, Sekine S, Hirano K, Moriyama M, Miwa S, Nagata T, Tsukada K. Perforation of intramural gastric metastasis during preoperative chemotherapy in a patient with thoracic esophageal squamous cell carcinoma. Int J Surg Case Rep. (査読有) 2015,17:23-7.doi:10.1016/j.ijscr.2015.10.024.

Okumura T, Shimada Y, Moriyama M, Takei Y, Omura T, Sekine S, Nagata T, Shimizu K, Tsukada K. MicroRNA-203 inhibits the progression of esophageal squamous cell carcinoma with restored epithelial tissue

architecture in vivo. Int J Oncol. (査読有) 2014 Jun;44(6):1923-32,doi:10.3892/ijo.2014.2365.

(学会発表)(計 7 件)

1. 関根慎一, 平野勝久, 渋谷和人, 橋本伊佐也, 松井恒志, 吉岡伊作, 奥村知之, 長田拓哉, 塚田一博.

膵頭部領域癌における PTEN 発現と化学療法有効性に関する検討.

第 28 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2016.6.2-4;大阪

2. 関根慎一, 小島博文, 森山亮仁, 橋本伊佐也, 渋谷和人, 北條莊三, 吉岡伊作, 松井恒志, 奥村知之, 長田拓哉, 塚田一博.

十二指腸乳頭部癌における膵頭十二指腸切除後の予後予測.

第 51 回日本胆道学会学術集会 ;2015.9.17-18;宇都宮

3. 関根慎一, 長田拓哉, 吉岡伊作, 渋谷和人, 松井恒志, 平野勝久, 渡辺 徹, 森山亮仁, 橋本伊佐也, 北條莊三, 堀亮太, 奥村知之, 塚田一博.

栄養指数 CONUT は胆道癌における膵頭十二指腸切除後の長期予後と関連する.

第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015.4.16-18;名古屋

4. Sekine S, Nagata T, Sawada S, Hirano K, Shibuya K, Yoshioka I, Matsui K, Okumura T, Tazawa K, Tsukada K.

THE USEFULNESS OF RISK ASSESSMENT AND EARLY ENTERAL NUTRITION FOR PANCREATO DUODENECTOMY.

The 5th Biennial congress of the Asian-Pacific hepato-pancreato-biliary association

2015 Mar 18-22; Singapore

5. 関根慎一, 森山亮仁, 小島博文, 山口哲司, 橋本伊佐也, 渋谷和人, 吉岡伊作, 松井恒志, 澤田成朗, 長田拓哉, 塚田一博.

胆道癌における、発癌・増殖マーカーの解析.

第 50 回日本胆道学会学術集会 ;2014.9.26-27;東京.

6. 関根慎一, 平野勝久, 渡辺 徹, 森山亮仁, 橋本伊佐也, 北條莊三, 奥村知之, 長田拓哉, 塚田一博.

十二指腸乳頭部癌における予後因子の検討.

第 73 回日本癌学会学術総会 2014.9.25-27;横浜.

7. 関根慎一, 田澤賢, 河合俊輔, 土屋康紀, 金山雅美, 野々目和信, 月城孝志, 奥村知之, 長田拓哉, 山岸文範, 常山幸一, 塚田一博

複数回のステント留置、および GEM 療法により切除可能となった、閉塞性黄疸を伴う Stage 下

部胆管癌の一例.  
第 52 回日本癌治療学会学術総会  
2014.8.28 -30 ;横浜 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関根 慎一 (Sekine Shinichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・

助教

研究者番号:60649292