

対象と方法

対象は外科的胆嚢摘出術を施行された胆嚢癌患者16例（男性7例、女性9例）について検討した。American Joint Committee on Cancer (AJCC)¹⁰⁾によるTNM分類に基づく深達度別症例数はpT₁: 3例、pT₂: 2例、pT₃: 4例、pT₄: 7例であった。

胆嚢癌組織では、COX-1、COX-2およびEPサブタイプのmRNAの発現はRT-PCR法¹¹⁾にて解析した。さらにCOX-2およびEPサブタイプについては組織内分布を明らかにする目的にて免疫染色¹¹⁾¹²⁾および*in situ*ハイブリダイゼーション法¹¹⁾¹²⁾にて解析を行った。組織内PGE₂濃度はRIA法¹³⁾にて測定した。胆嚢癌細胞 (Mz-ChA-1・Mz-ChA-2)¹⁴⁾を用いてCOX-2およびEPサブタイプの発現を解析し、PGE₂ならびにEPアゴニスト (EP₂アゴニスト、ONO-AE1-259; EP₃アゴニスト、ONO-AE-248; EP₄アゴニスト、ONO-AE1-329; 小野薬品株式会社研究所: 丸山隆幸博士より提供)¹⁵⁾による腫瘍細胞のコロニー形成数とproto-oncogeneである*c-fos*遺伝子¹⁶⁾の発現について解析した。

結 果

1. 胆嚢癌組織におけるシクロオキシゲナーゼ-2の発現

図1は胆嚢癌組織におけるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 発現を癌深達度別に解析し、正常胆嚢

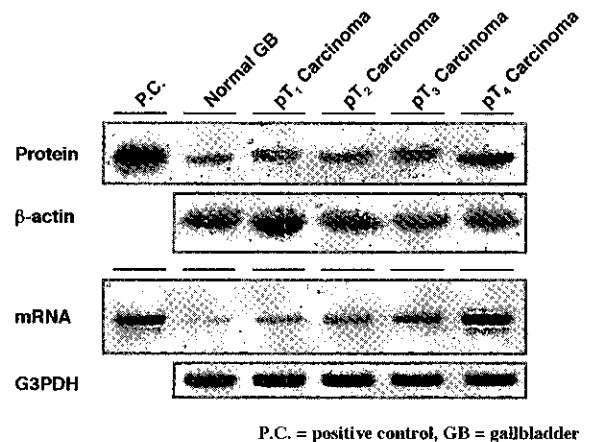


図1 The expression level of Cox-2 protein and mRNA in gallbladder carcinoma of different depth of invasion.

における発現と比較したものである。COX-2蛋白およびmRNAの発現、さらに癌組織におけるプロスタグランジンE₂ (PGE₂) は癌深達度に比例して増加していることが明らかとなった (表1)。一方COX-1発現については明らかな変化を認めなかった (表1)。

COX-2の免疫組織学的発現について解析すると (表2・図2)、上皮での発現頻度は正常組織 (80%) に対しpT₁・pT₂群 (100%)、pT₃・pT₄群 (100%) と、正常組織と胆嚢癌組織において有意な差は認められなかった。しかし、COX-2の発現強度についてはgrade 2は正常組織では認められなかった (0%) のに対し、pT₁・pT₂群で60%、pT₃・pT₄群で82%と、癌腺管上皮において有意 ($P < 0.05$) に発現強度の増加が認められた。

表1 Steady-state mRNA Levels of Cox-1 and Cox-2 and Tissue Concentration of PGE₂ in Gallbladder Carcinomas of Different Depths of Invasion

	Normal gallbladder (10)	pT ₁ ・pT ₂ Carcinoma (5)	pT ₃ ・pT ₄ Carcinoma (11)
Messenger RNA		% G3PDH	
Cox-1	105 ± 5	107 ± 12	98 ± 12
Cox-2	54 ± 5	91 ± 17 ^a	136 ± 1 ^{b,c}
Tissue concentration		pg/mg · protein	
PGE ₂	59.2 ± 7.9	106.2 ± 16.1	257.9 ± 26.1 ^{b,d}

Abbreviation used: Cox-1, cyclooxygenase-1; Cox-2, cyclooxygenase-2; PGE, prostaglandin E₂.

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, significantly different from normal gallbladder.

^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, significantly different from pT₁・pT₂ carcinoma.

表2 Immunohistochemical Expression of Cyclooxygenase-2 in the Epithelia and Stroma of Gallbladder Carcinomas of Different Depths of Invasion

	Normal gallbladder (10)			pT ₁ · pT ₂ Carcinoma (5)			pT ₃ · pT ₄ Carcinoma (11)					
	Positive rate	Intensity		Positive rate	Intensity		Positive rate	Intensity				
		G ₀	G ₁	G ₂		G ₀	G ₁	G ₂		G ₀	G ₁	G ₂
Epithelia	8/10	2	8	0 ^b	5/5	0	2	3	11/11	0	2	9 ^a
Stroma	0/10 ^a	10	0	0	1/5 ^a	4	1	0	9/11 ^b	2	3	6

Immunostaining of cyclooxygenase-2 was evaluated in terms of the positive rate and intensity (see Materials and Methods).

Abbreviations: G₀, grade 0; G₁, grade 1; G₂, grade 2

^aP<0.05, ^bP<0.01, significantly different from other groups.

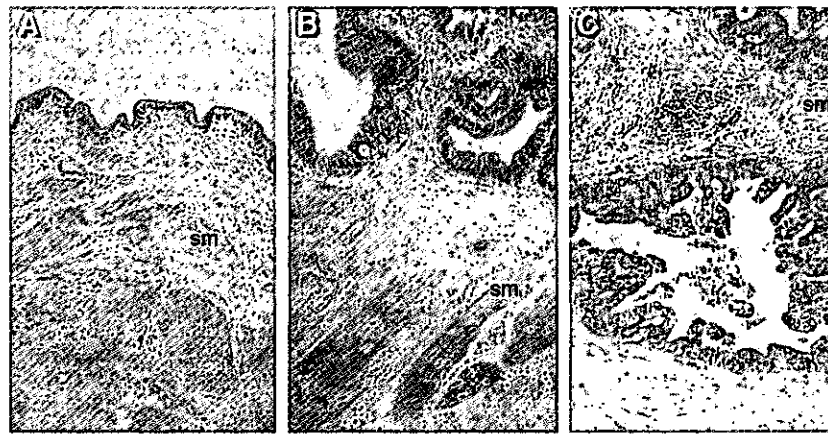


図2 Grading intensity of immunostaining of COX-2 in gallbladder tissues (original magnification × 33)

(A), normal gallbladder; grade 0 (G₀), an intensity less than that in internal controls (smooth muscles; sm) or negative staining. (B), pT₂ gallbladder carcinoma; grade 1 (G₁), an intensity in cancerous epithelia or adjacent stroma cells similar to that in internal controls. (C), pT₂ gallbladder carcinoma; grade 2 (G₂), an intensity in cancerous epithelia or adjacent stroma cells greater than that in internal controls.

間質における COX-2 発現は正常胆嚢組織においては全く認められなかった。一方胆嚢癌組織においては、pT₁・pT₂群では20%に発現が認められたのみであったが、pT₃・pT₄群では82%と、正常胆嚢組織、pT₁・pT₂群と比較して有意 (P<0.05) に発現頻度が高かった。発現強度についても pT₁・pT₂群ではgrade 2の強度発現は認められなかったのに対し、pT₃・pT₄群では発現頻度82%のうち55%が grade 2と発現強度の増加が認められた。これらの COX-2の免疫組織学的発現の変化は、肝内胆管癌組織においても認められた (図3)。

胆嚢癌組織における COX-2 mRNA の局在を *in situ* ハイブリダイゼーション法にて解析したとこ

ろ、pT₄胆嚢癌組織における COX-2 mRNA の発現が癌腺管上皮および癌周囲間質の両者において認められ、これら mRNA の局在は免疫組織化学による COX-2 蛋白の発現と同様の分布を示していた (図4)。

2. 胆嚢癌組織におけるプロスタグランジンE受容体の発現

図5に示すようにプロスタグランジンE受容体 (EP) には EP₁、EP₂、EP₃および EP₄の4種類のサブタイプが存在することが明らかとなっている。EPサブタイプはそれぞれ異なる G 蛋白質と連関することで情報伝達を行うことが明らかとなっており、EP₁の情報伝達は G 蛋白を介する Ca イオンの

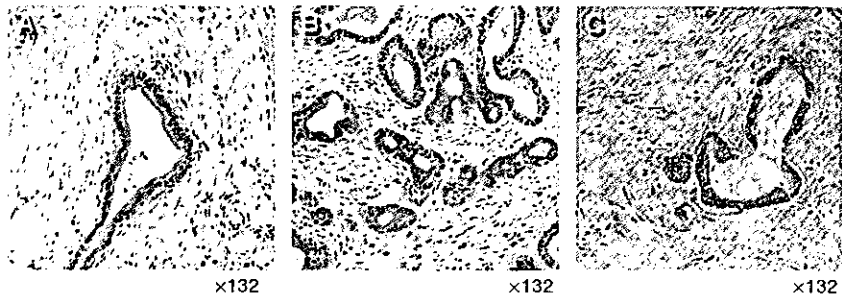


図3 Immunostaining of COX-2 in bile duct tissues (original magnification × 132)
 (A) normal intrahepatic bile duct. (B) chronic proliferative cholangitis. (C) cholangiocarcinoma.

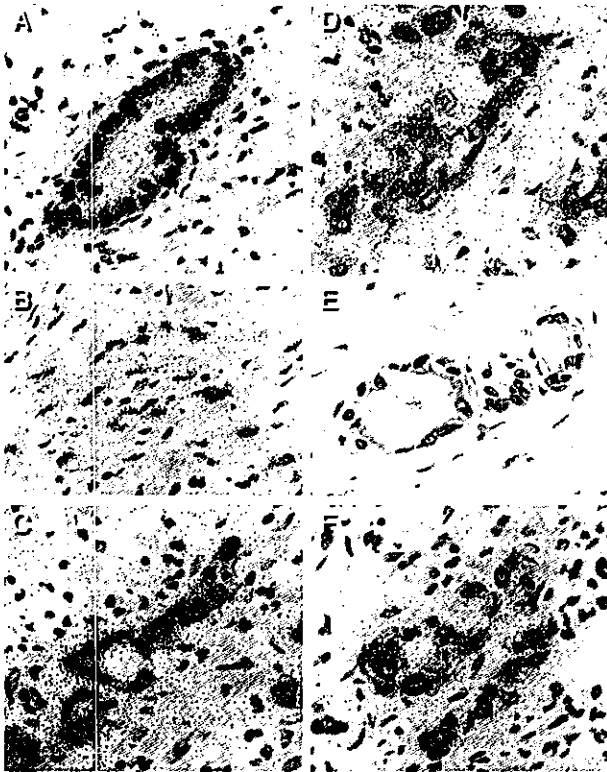


図4 *In situ* hybridization of cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E-receptor subtypes (EP₂₋₄) in gallbladder carcinoma tissue.
 A specimen of gallbladder carcinoma tissues from a case of pT₄ carcinoma was used for analysis. (A) COX-2 mRNA is diffusely expressed in the corresponding cancerous epithelia (original magnification × 200). (B) COX-2 mRNA is expressed focally in the corresponding fibroblasts (original magnification × 200). (C, D, and F) EP₂, EP₃, and EP₄ mRNAs are diffusely expressed in the corresponding cancerous epithelia (original magnification × 200). (E) EP₄ protein is expressed in the cancerous epithelia (original magnification × 200).

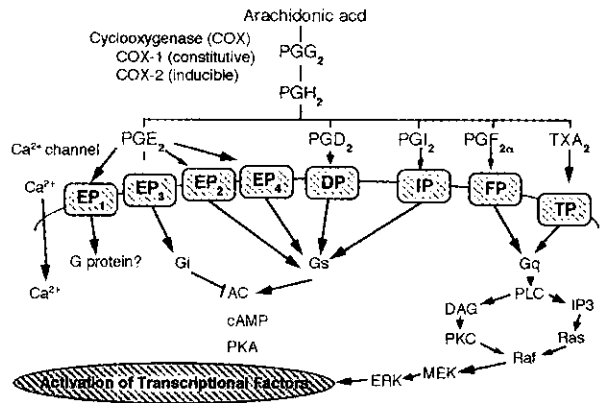


図5 Scheme of arachidonic cascade and prostaglandin E-receptor subtypes.

動員系、EP₂、EP₃、EP₄の情報伝達はG蛋白を介するアデニルシクラーゼ活性系、すなわちcAMPの産生系である。

図6は胆嚢癌組織におけるEPサブタイプのmRNAの発現について癌深達度別に解析し、正常胆嚢における発現と比較したものである。胆嚢癌組織では前回報告した本症におけるEPサブタイプの発現パターン同様に、EP₁を除くEP₂、EP₃およびEP₄のmRNAの発現を認めた。癌深達度とEPサブタイプmRNAの発現量には明らかな相関は認められなかった。EP₂、EP₃およびEP₄の組織内分布を検討するために、EPサブタイプのmRNAの発現について *in situ* ハイブリダイゼーション法にて解析を行った。図4はその結果を示したものである。EPサブタイプmRNAの発現は解析の結果、癌腺管上皮に一致してEP₂、EP₃、EP₄のmRNAのシグナル

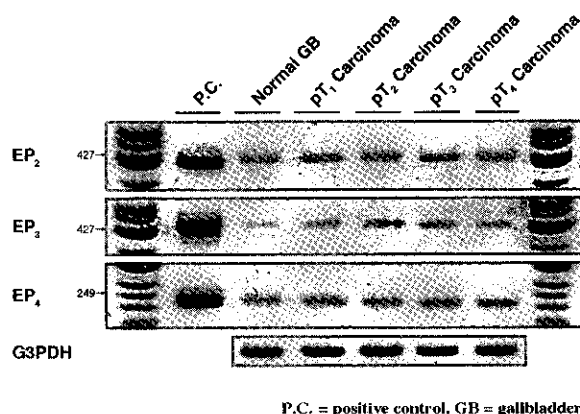


図 6 The expression level of EP₂, EP₃, and EP₄ mRNAs in gallbladder carcinoma of different depth of invasion.

を認めた。重要なことはEPサブタイプのmRNA発現はCOX-2と同様に癌腺管上皮において認められたことである。

3. 胆嚢癌細胞におけるシクロオキシゲナーゼ-2 およびプロスタグランジンE受容体の発現

癌組織において産生されるPGE₂が癌細胞上に発現するどのEPサブタイプと結合し、癌増殖あるいは進展にかかわる情報伝達の経路を形成しているかを同定することは重要である。そこでEPを発現する胆嚢癌培養細胞にPGE₂、EPアゴニストを添加することにより胆嚢癌細胞増殖に及ぼす影響について検討をおこなった。

培養胆嚢癌細胞 (Mz-ChA-1・Mz-ChA-2) について解析したところ (図7)、Mz-ChA-1においてはCOX-2mRNAおよび蛋白の発現が強度に認められ、それを反映してアラキドン酸添加後の培養液中のPGE₂濃度は高値を呈していた。一方、Mz-ChA-2に

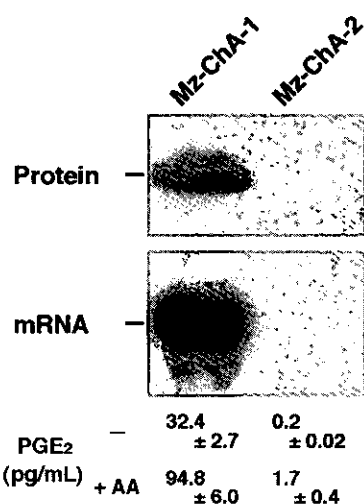


図 7 Expression levels of COX-2 in the Mz-ChA-1 and Mz-ChA-2 cells.

COX-2 protein and mRNA were expressed strongly in the Mz-ChA-1 cells but were hardly detectable in the Mz-ChA-2 cells. The Mz-ChA-1 cells were observed to produce significant amounts of PGE₂ in response to treatment with 10 mM of arachidonate, while the Mz-ChA-2 cells were observed to produce only trace amounts. The results are expressed as means ± SEM, and the experiment was performed in triplicate.

おいてはCOX-2mRNA および蛋白の発現はほとんど認められず、培養液中のPGE₂濃度も低値であった (図7)。

図8はMz-ChA-2における各EPmRNAの発現をRT-PCRおよび*in situ*ハイブリダイゼーション法にて解析した結果である。胆嚢癌組織同様にEP₂、EP₃、EP₄ mRNAの発現が認められたが、いずれも同程度の発現であった。EP₁ mRNAの発現は認められなかった。*in situ*ハイブリダイゼーションにお

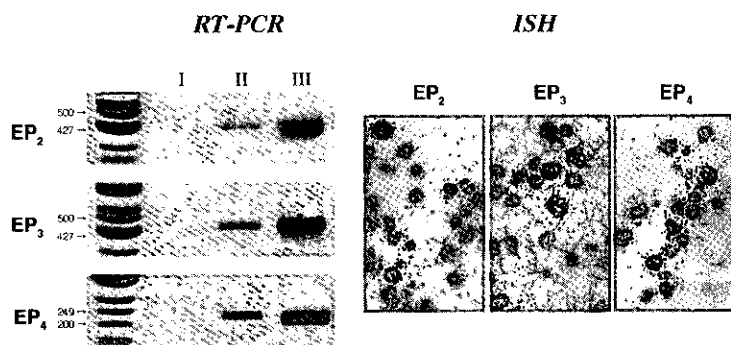


図 8 RT-PCR and *in situ* hybridization of EP₂₋₄ mRNAs in the Mz-ChA-2 cells.

In the RT-PCR, the mRNAs of EP₂, EP₃, and EP₄ are amplified in the cells. Lane I in each panel shows RT-negative controls. Lane II in each panel shows the PCR products of expected size from Mz-ChA-2 mRNA. Lane III in each panel shows the PCR products from positive control cDNAs. In the *in situ* hybridization, EP₂, EP₃, and EP₄ mRNAs were diffusely and strongly expressed in the cells.

いてもEP₂、EP₃、EP₄ mRNAが癌細胞にびまん性に認められた(図8)。

4. 胆嚢癌細胞におけるプロスタグランジンE受容体アゴニストの腫瘍増殖効果

Mz-ChA-2におけるPGE₂およびEP₂、EP₃、EP₄アゴニスト添加による癌細胞増殖に及ぼす影響をコロニー形成数および*c-fos*遺伝子発現の点より検討した。

培地にPGE₂ 1 μMを14日間添加することにより、Mz-ChA-2コロニー数は、コントロールと比較して1.3倍に増加した(図9)。また培地にEP₂、EP₃、EP₄アゴニストを14日間添加したところ、EP₄アゴニストにおいてのみMz-ChA-2コロニー数の増加が認められた。この変化は1 μM添加まで用量依存性であ

り、EP₄アゴニスト1 μM添加において、コントロールと比較して1.4倍の増加を認めた(図9)。

PGE₂あるいはEP₄アゴニスト添加による*c-fos* mRNAの変化について解析したところ、培地にPGE₂ 1 μMを添加により、Mz-ChA-2における*c-fos* mRNAは、コントロールと比較して2.1倍に増加した(図10)。また同様に培地にEP₄アゴニストを添加することによりMz-ChA-2における*c-fos* mRNAの増加が認められた。このmRNA発現増加は1 μM添加まで用量依存性であり、EP₄アゴニスト1 μM添加において、コントロールと比較して3.1倍に増加した(図10)。

考 察

本研究では慢性炎症(アラキドン酸代謝の活性化)が胆嚢癌の増殖・進展にどのような役割を果たしているかを解明するために、種々の深達度の胆嚢癌手術標本におけるアラキドン酸代謝のパラメーターであるCOX-2およびEPの発現を分子生物学的ならびに免疫組織化学的に詳細に解析・検討した。

本研究において得られた重要な所見の第一点は、胆嚢癌におけるCOX-2の発現は癌深達度に比例し増加していた点である。すなわちpT₃・pT₄症例におけるCOX-2 mRNAおよび蛋白の発現レベルはpT₁・pT₂症例、正常胆嚢と比較して増加していた。また進行胆嚢癌におけるCOX-2の局在は増殖した癌腺管上皮の周囲間質の線維芽細胞における発現増加であった。COX-2を誘導もしくは活性化させる因子としてはIL-1β、HGF、TGF-β1、EGFなどが挙げ

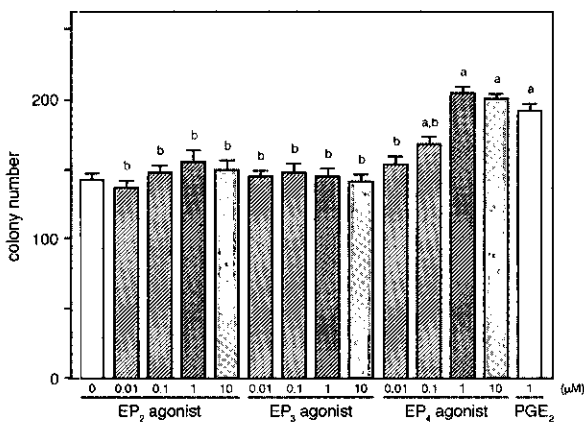


図9 Effect of the EP₂, EP₃, EP₄ agonist or PGE₂ treatment on Mz-ChA-2 colony number.

The results are expressed as means (bars, SEM), and the experiment was performed in triplicate. a, $P < 0.01$, significantly different from the non-treated cells; b, $P < 0.01$, significantly different from the cells treated with PGE₂.

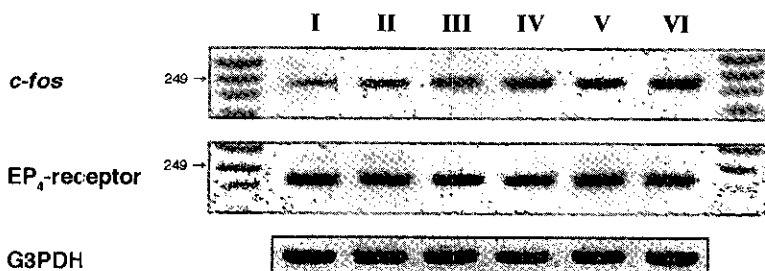


図10 Effect of the EP₄ agonist or PGE₂ treatment on *c-fos* expression.

Lane I, non-treated; lane II, 0.01 μM of EP₄ agonist; lane III, 0.1 μM of EP₄ agonist; lane IV, 1 μM of EP₄ agonist; lane V, 10 μM of EP₄ agonist; lane VI, 1 μM of PGE₂. The PCR products were 236bp in size for *c-fos* and 311bp for G3PDH.

られているが、線維芽細胞におけるCOX-2は癌細胞自身の産生するこれらサイトカインや増殖因子などにより誘導されたものと推測された。COX-2の発現誘導によりアラキドン酸代謝が活性化された結果、癌組織におけるPGE₂の産生が促進されるものと考えられた。胆嚢癌の腺管上皮においては早期癌の段階からCOX-2の発現が認められたが、癌の深達度が進行するのに従い癌周囲間質においてもCOX-2の過剰発現が認められ、進行胆嚢癌においては、癌腺管上皮のみならず癌周囲間質においても発現したCOX-2によってPGE₂が産生され、胆嚢癌細胞の生物学的活性度を増加させているものと考えられた。

PGE₂はアラキドン酸代謝の最終産物であり、生体内では主に炎症反応に際して産生されるエイコサノイドである。近年では癌組織あるいは培養癌細胞においてPGE₂の組織濃度が高値を呈しているという報告¹⁷⁾や、選択的COX-2阻害剤を投与してPGE₂産生を抑えることによって癌の増殖が抑制されたという報告¹⁸⁾のように、PGE₂には癌細胞の腫瘍生物学的活性を高める働きがあることが論じられている。悪性腫瘍の特徴である浸潤・転移には、癌腺管上皮の生物学的(形質)変化が関与していると考えられることより、COX-2を介して産生されたPGE₂の胆嚢癌細胞における効果を明確にすることは重要であると考えられる。一般にプロスタノイドが生体反応を起こすためには個々のプロスタノイドが細胞膜上に存在する特異的な受容体への結合が必要である。PGE₂の受容体に関しては、現在までにEP₁~EP₄までの4種類がクローニングされている。PGE₂が癌細胞の生物学的活性の変化(増殖促進¹⁸⁾、アポトーシスの抑制¹⁹⁾、炎症性細胞活性化の抑制による免疫能低下²⁰⁾、増殖因子の誘導²¹⁾など)に関与しているならば、癌細胞の表面にいずれかのEPの存在が不可欠であると考えられる。

本研究において得られた重要な所見の第二点は、胆嚢癌組織および培養胆嚢癌細胞においてEP₂、EP₃、EP₄ mRNAの発現が明らかとなった点である。そこで胆嚢癌細胞におけるPGE₂の作用機序を

解明するために、胆嚢癌培養細胞を用いてPGE₂のEP₂、EP₃、EP₄を介した胆嚢癌細胞に与える生物学的効果について考察した。

PGE₂およびEP₂、EP₃、EP₄アゴニストが胆嚢癌細胞増殖に及ぼす影響を解析するために、胆嚢癌培養細胞の培養上清中にPGE₂、EP₂、EP₃、EP₄アゴニストを添加して、細胞増殖の変化を観察した。Mz-ChA-2は内因性のPGE₂の発現がほとんど認められないため、内因性に高いPGE₂発現が認められるMz-ChA-1と比較した場合、添加したPGE₂あるいは各アゴニストの効果がより正確に反映されるものと考えられた。

1 μMのPGE₂の14日間にわたる添加により、Mz-ChA-2のコロニー数は約1.3倍に増加し、PGE₂の癌細胞増殖効果が認められた。またEP₄アゴニストを添加した場合でも1 μMまで用量依存性にコロニー数は約1.4倍に増加したことより、最近の大腸癌培養細胞における結果²²⁾同様に、胆嚢癌においてもPGE₂の腫瘍増殖作用にはEP₄の活性化が重要なステップであると考えられた。これらの成績を支持するように、LS174TにおいてはPGE₂がEP₄を介してムチン分泌を亢進させるという報告²³⁾がされており、これは癌細胞の活動性を亢進させているものと解釈される。さらに子宮頸癌²⁴⁾や前立腺癌培養細胞²⁵⁾においてPGE₂がEP₄を介して腫瘍増殖能を亢進させたとの報告もなされている。

さらにPGE₂およびEP₄アゴニストによる胆嚢癌培養細胞の増殖能亢進を裏付けるため細胞中の*c-fos*遺伝子の発現について解析した。細胞増殖を指示する因子としてTPA121などの発癌プロモーターやTGF、EGFなどの増殖因子が知られている²⁶⁾²⁷⁾が、癌細胞をこれらの因子で刺激することにより、一過性に転写因子複合体であるAP-1を構成する蛋白遺伝子が誘導され、細胞増殖が起こるものと考えられている²⁸⁾²⁹⁾。このAP-1を構成する蛋白遺伝子の一つが*c-fos*遺伝子¹⁵⁾であり、PGE₂またはEP₄アゴニストを添加により*c-fos*遺伝子の発現亢進が認められ、PGE₂のEP₄を介した胆嚢癌細胞増殖機転

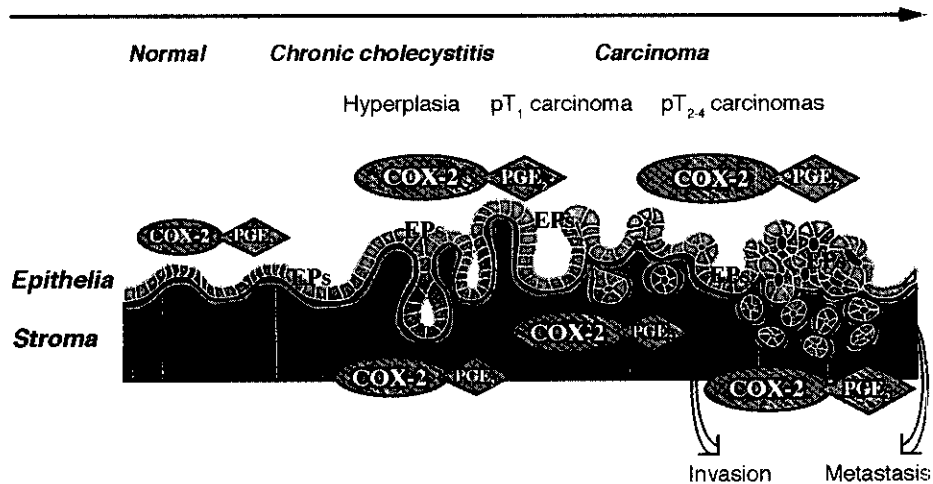


図 11 Scheme of epithelial-stromal interaction in gallbladder carcinoma.

In cases of advanced carcinoma of the gallbladder, the enhanced expression of COX-2 mRNA and protein is observed in the adjacent stroma rather than in the cancerous epithelia and that the stroma in these advanced carcinomas is a potent source of prostaglandin synthesis. In epithelial-stromal interactions, the increased production of COX-2-derived PGE₂ in the adjacent stroma and its biological effect via EP subtypes on the carcinoma cells in a paracrine fashion may contribute to the development of gallbladder carcinoma.

の存在が示唆された。EP₄の活性化は他の報告にもあるように核内における *c-fos* 遺伝子の転写活性を上昇させ、この *c-fos* 遺伝子の発現亢進が胆嚢癌細胞のコロニー数の増加を起こしたものと考えられた。PGE₂は胆嚢癌組織に発現しているEPを介して進行胆嚢癌の腫瘍増殖過程において腹膜播種・臓器転移などを起こしやすいように癌細胞の性質を変化させる可能性が示唆される。選択的EP受容体アンタゴニストを用いて各EPの作用を抑制することによりPGE₂が癌細胞の性質を変化させるメカニズムを解明できる可能性があると考えられた。

結 語

本研究結果を総括すると、進行胆嚢癌においては癌腺管上皮に加えて癌周囲間質においてCOX-2のmRNAおよび蛋白の発現増加が認められ、このCOX-2の過剰発現はPGE₂産生を亢進させていると考えられた。進行癌の間質におけるCOX-2の過剰発現により産生されたPGE₂は、epithelial-stromal interactions (図 11)において、パラクライン的に

癌細胞に存在するEP₄の受容体を活性化し、胆嚢癌細胞の増殖に寄与しているものと考えられた。

本研究内容は International Journal of Cancer 2002 および Clinical Cancer Research 2002 に印刷中である。

文 献

- 1) 谷村 弘, 内山和久, 石本喜和男: 肝内結石症の全国疫学調査(Ⅱ). 厚生省特定疾患: 肝内結石症調査研究班, 平成7年度報告書, 1996; 11-19
- 2) 寺田忠史, 中沼安二, 太田哲生: 肝内結石症に合併する肝内胆管癌と前癌病変の病理. 胆と膵 1995; 16: 47-52
- 3) Wong NA, Harrison DJ: Colorectal neoplasia in ulcerative colitis-recent advances. *Histopathology* 2001; 39: 221-234
- 4) Correa P: *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995; 19(Suppl 1): S37-43
- 5) Dore MP, Realdi G, Mura D, et al: Genomic instability in chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32: 698-703

- 6) Lowenfels AB, Lindstrom CG, Conway MJ, *et al*: Gallstones and risk of gallbladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1985; **75**: 77-80
- 7) Iwai N, Yanagihara J, Tokiwa K, *et al*: Congenital choledochal dilatation with emphasis on pathophysiology of the biliary tract. *Ann Surg* 1992; **215**: 27-30
- 8) Shoda J, Ueda T, Ikegami T, *et al*: Increased biliary group II phospholipase A₂ and altered gallbladder bile in patients with multiple cholesterol stones. *Gastroenterology* 1997; **112**: 2036-2047
- 9) Shoda J, Kano M, Asano T, *et al*: Secretory low molecular weight phospholipase A₂ and their specific receptor in bile ducts of patients with intrahepatic calculi — factors of pathophysiological significance for chronic proliferative cholangitis. *Hepatology* 1999; **29**: 1026-1036
- 10) Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, *et al*: AJCC Cancer Staging Manual. 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven, 1997
- 11) Kawamoto T, Shoda J, Asano T, *et al*: Expression of cyclooxygenase-2 in the subserosal layer correlates with postsurgical prognosis of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *Int J Cancer*, 2002, *In press*
- 12) Asano T, Shoda J, Ueda T, *et al*: Expression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the gallbladder — crucial role of arachidonate metabolism in tumor growth and progression. *Clin Cancer Res*, 2002, *In press*
- 13) Reed MK, Taylor B, Myers SI: The effect of hypoxia on rat splanchnic prostanoid output. *Prostaglandins* 1989; **38**: 599-608
- 14) Knuth A, Gabbert H, Dippold W, *et al*: Biliary adenocarcinoma Characterization of three new human tumor cell lines. *J Hepatology* 1985; **1**: 579-596
- 15) Suzawa T, Miyaura C, Inada M, *et al*: The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP₁, EP₂, EP₃, and EP₄) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology* 2000; **141**: 1554-1559
- 16) Lau LF, and Nathans D: Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with *c-fos* or *c-myc*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 1182-1186
- 17) Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H: Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 135-138
- 18) Sheng H, Shao J, Morrow JD, *et al*: Modulation of apoptosis and *bcl-2* expression by prostaglandin E₂ in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; **58**: 362-366
- 19) Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, *et al*: Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999; **59**: 198-204
- 20) Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, *et al*: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 3785-3789
- 21) Noran RD, Danilowicz RM, Eling TE: Role of arachidonic acid metabolism in mitogenic response of BALB/c 3T3 fibroblasts to epidermal growth factor. *Mol Pharmacol* 1988; **33**: 650-656
- 22) Sheng H, Shao J, Washington MK, *et al*: Prostaglandin E₂ increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 18075-18081
- 23) Belley A, Chadee K: Prostaglandin E₂ stimulates rat and human colonic mucin exocytosis via the EP₄ receptor. *Gastroenterology* 1999; **117**: 1352-1362
- 24) Sales KJ, Katz AA, Davis M, *et al*: Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E(2) synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP₂/EP₄ receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 2243-2249
- 25) Chen Y, Hughes-Fulford M: Prostaglandin E₂ and the protein kinase A pathway mediate arachidonic acid induction of *c-fos* in human prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2000; **82**: 2000-2006
- 26) Gold LI: The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 1999; **10**: 303-360

- 27) Xian W, Kiguchi K, Imamoto A, *et al*: Activation of the epidermal growth factor receptor by skin tumor promoters and in skin tumors from SENCAR mice. *Cell Growth Differ* 1995; **6**: 1447-1455
- 28) Seppanen M, Henttinen T, Lin L, *et al*: Inhibitory effects of cytokines on ovarian and endometrial carcinoma cells *in vitro* with special reference to induction of specific transcriptional regulators. *Oncol Res* 1998; **10**: 575-589
- 29) Eickelberg O, Pansky A, Mussmann R, *et al*: Transforming growth factor-beta1 induces interleukin-6 expression via activating protein-1 consisting of JunD homodimers in primary human lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1999; **274**: 12933-12938

DNA マイクロアレイによる肝内結石症の遺伝子発現解析

愛媛大学医学部 外科学第1

研究協力者 本田 和男

共同協力者 児島 洋, 小林 展章

はじめに

我々は、従来肝内結石症の発症に関与する因子を、分子生物学的手法を用いて解析してきた。肝内結石症で特徴的な同一患者の肝臓での laterality の存在に着目して、今回は differential display (DD) 法により結石側肝臓組織と非結石側肝臓組織の遺伝子発現の差を検討した。DD法は予測にとらわれず、発現の差のある遺伝子を網羅的にスクリーニングすることができるが実際に発現の差のある塩基配列の同定とその正確な単離が難しく、またそれらをすべてシーケンシングして既知の遺伝子の塩基配列と比較する必要があり煩雑である。今回我々は一度に多数の遺伝子の発現解析が可能なDNAマイクロアレイの二蛍光標識法を用いて結石側肝臓、非結石側肝臓のアポトーシス、サイトカインに関連した遺伝子発現の差を比較検討した。

対象と方法

本研究では、厚生省特定疾患肝内結石症調査研究班の臨床試料採取プロトコールに基づいて十分な説明を行い、同意の得られた肝内結石症患者より採取された臨床検体2検体を肝内結石症調研究班班長：二村雄次先生より供与を受け使用した。

肝内結石患者の結石側肝臓と非結石側肝臓の摘出標本のそれぞれ約0.4gより TRIzol (Gibco BRL) を用いて totalRNA を抽出した。抽出した totalRNA から QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いて mRNA を抽出した。この mRNA

を鋳型として逆転写反応を行う時に非結石側肝臓から抽出した mRNA より合成される cDNA に Cy3-dUTP を、結石側肝臓から合成される cDNA に Cy5-dUTP を取り込ませ、それぞれ異なる蛍光色素で標識された蛍光標識 cDNA プローブを合成した。この蛍光標識 cDNA をカラムをつかってそれぞれさらに精製した。Cy3標識Cy5標識両精製溶出液を混合し、このサンプルをエタノール沈殿しハイブリダイゼーションバッファーに溶解した。プローブ溶液を 95°C で2分間加熱し変性させ、DNAチップ (IntelliGene Human Cytokine CHIP、IntelliGene Apoptosis CHIP) に TaKaRa Spaced Cover Glass をかぶせて、その隙間に 10 μ l のハイブリダイゼーション溶液を展開し、恒温槽にて反応させた。DNAチップを 2 \times SSC/0.2%SDS で洗浄し (55°C で5分間2回、その後65°C で5分間)、0.05 \times SSC でリンス (室温) した。その後低速遠心し DNAチップを乾燥させ、Affymetrix 428 Array Scanner にてスキャンニングした。マイクロアレイ発現解析ソフト ImaGene にて各スポットのグリッド認識を行い、スポットされたそれぞれの cDNA の蛍光シグナルデータを抽出し、発現量が一定な遺伝子を用いた補正を行った¹⁾。

結 果

IntelliGene Human Apoptosis CHIP はヒト由来既知遺伝子のうち Apoptosis に関連する遺伝子 164 種類の cDNA 断片を、IntelliGene Human Cytokine CHIP はヒト由来既知遺伝子のうち Cytokine 関連遺伝子約 240 種類の cDNA 断片をそれぞれスライドガ

ラス上に整列・固定化したDNAチップである。図1はIntelliGene Human Apoptosis CHIP、図2はIntelliGene Human Cytokine CHIPの結果である。

非結石側肝臓組織はCy3（赤）、結石側肝臓組織はCy5（緑）で蛍光標識したので結石側肝臓組織に比べ非結石側肝臓組織で強く発現している遺伝子については赤色、結石側肝臓組織で強く発現している遺伝子については緑色、両者が同等に発現している遺伝子については黄色、両者とも発現していない場合には無色となる。表1に非結石側肝臓組織で発現の多い遺伝子を、表2に結石側肝臓組織で発現の多い遺伝子を示した。

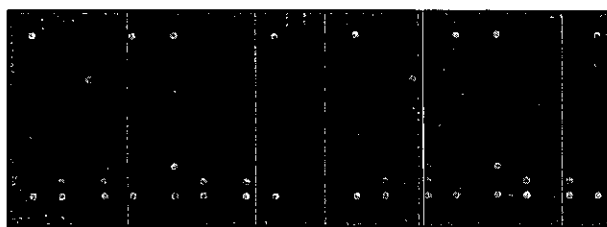


図1：IntelliGene Human Apoptosis CHIP

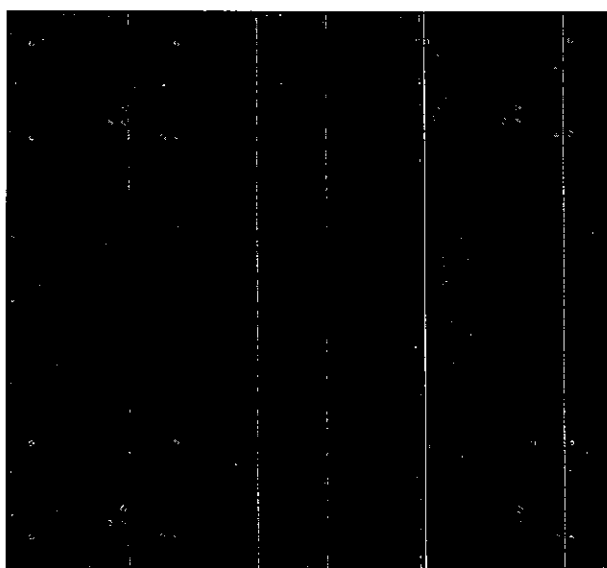


図2：IntelliGene Human Cytokine CHIP

表1：非結石側肝臓でより多く発現している遺伝子

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)
 Insulin-like growth factor 2 (IGF-2)
 Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1)
 Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3)
 Interferon gamma receptor 1
 Cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 7
 Pre-B-cell colony-enhancing factor

表2：結石側肝臓でより多く発現している遺伝子

Small inducible cytokine A₂ (monocyte chemotactic protein 1, homologous to mouse Sig-je)
 Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54)
 GRO oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)
 Insulin-like growth factor 2 receptor
 Syndecan 1
 Cyclin dependent kinase 4
 CDC37 (cell division cycle 37, S.cerevisiae, homolog)
 Lymphotoxin beta receptor (TNF superfamily, member 3)
 CD27-binding (Siva) protein
 Prefordin 5
 CASP2 and RIPK domain containing adaptor with death domain
 Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell 1 (p105)
 Non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in (human putative NDP kinase, nm23-H2S)
 Glutaredoxin (thioltransferase)
 Glutathione S-transferase theta 1
 Glutathione S-transferase M4
 Dynein, cytoplasmic, light polypeptide
 v-act murine thymoma viral oncogene homologue 1

考 察

DNAマイクロアレイは2つの異なるmRNAサンプルにおいて遺伝子発現の差を検出するもので、それぞれを異なる蛍光色素で標識し、アレイ上で競合的ハイブリダイゼーションを行い、両方の蛍光を検出し比較するものである。理論的には1万個以上の遺伝子の発現を網羅的に解析可能であるが、既知の遺伝子のcDNAをあらかじめスライドガラス上にスポットしておく必要がある。このためカスタムメイドのマイクロアレイを作製するためには検討するすべての遺伝子のcDNAを入手し、それらを高価な作製装置を用いてアレイ上にスポットする必要がありコストが高くなる。また試料より抽出したmRNAを鋳型として作製した標識DNA断片と、直接にアレイにスポットされたcDNAをハイブリダイズさせて検出するため、その感度にも問題がある(PCR等による増幅の過程がない)。

一方、Differential Display法は組織特異的な発現パターンを示す遺伝子や転写量に差のある遺伝子をPCR法を用いてクローニングする方法で、少量のRNAで同時に比較可能であるが、増幅の過程があるため定量性に乏しく、mRNA全体を網羅的に調べるには複数のプライマーの組み合わせについて比較検討し差のあるDNA断片をそれぞれ単離精製しシーケンシングする必要があり膨大な作業が必要となる。

今回、我々はタカラより発売されたアポトーシスに関連する遺伝子のcDNAが164種類スポットされたDNAチップとサイトカインに関連するcDNAが220種類スポットされたDNAチップを用いて結石側肝臓と非結石側肝臓で発現の差のある遺伝子を解析した。

1. 非結石側肝臓でより多く発現している遺伝子

insulin-like growth factor 1 (IGF-I) は第12番染色体長腕に、insulin-like growth factor 2 (IGF-II) は第11番染色体短腕にそれぞれ位置する²⁾。IGF-Iはインスリン様の代謝作用をもつが、生理的には主

に骨組織をはじめとした多くの細胞において増殖・分化に関与している。IGF-1からIGF-1 receptorと伝達されたシグナルはIGF-1 receptorのチロシンキナーゼを活性化し、細胞増殖、形質転換、アポトーシスの抑制などの作用を伝達すると考えられている³⁾。IGF-IIは胎生期には分泌が盛んであるが出生後の生理的意義は不明な点が多い。

Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) と insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) も非結石側肝臓でより多く発現している遺伝子である。IGFBP-1, 3は血中および血管外へのIGFの運搬と分解の抑制、レセプターへの結合に対する影響などによりIGFの機能を調整する。IGFBP-1, 3はIGF作用を抑制する場合と促進する場合がある。IGFBP-3の主な発現調節因子はIGF、成長ホルモン、糖質コルチコイドである⁴⁾。また前回のDD法での検討ではinsulin-like growth factor binding protein 2が非結石側で発現が強いことが確認されていて、IGFファミリーとIGFBPファミリーが非結石側肝臓で増加していると考えられる。

Interferon gamma receptor 1 (INFR1) はINF- γ との結合により結合鎖が活性化されその結果種々のINF応答遺伝子の発現を誘導する。INF- γ はウイルスや細菌感染、痛などに対する免疫応答に重要な役割を果たしている。又、INF- γ はアポトーシスとの関与が考えられているが、アポトーシスを抑制するのか、あるいは促進するのかに関しては一定の見解は出ていない。マクロファージに対してはINF- γ によって誘導されたp21により細胞周期の停止とともにさまざまな刺激によるアポトーシスを抑制することが知られている⁵⁾。

Cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 7の正常側肝臓での発現の増加は、チトクロームは肝臓のさまざまな代謝に重要な役割を果たしていて、結石側肝臓ではこの発現が低下していると考えられる。

Pre-B-cell colony-enhancing factorは自身の活性はないが、Pre-Bcellの成熟を促すサイトカイン様物

質で⁶⁾、非結石側で発現が増加しているが、正常側肝臓では液性免疫をつかさどるB cellの増生を促しているのかもしれない。

2. 結石側肝臓でより多く発現している遺伝子

結石側肝臓では多くの遺伝子が発現している。炎症反応、免疫反応に関係している遺伝子として Small inducible cytokine A₂、ICAM-1、GRO 1 oncogene 等がある。

Small inducible cytokine A₂ (Monocyte chemotactic protein-1) は単球の活性化因子として発見された蛋白である。単球に対する作用は走化性の亢進の他に、ライソゾーム酵素や活性酸素の放出亢進、抗腫瘍活性の増強、IL-1およびIL-6の産生誘導などがある。単球以外への作用としては、好塩基球の化学伝達物質遊離促進作用、Tリンパ球走化性亢進作用がある。そのため炎症の際リンパ球の組織浸潤を促す。

ICAM-1の正常の機能はマクロファージが抗原提示細胞としてT細胞に抗原提示するときマクロファージのICAM-1とT細胞のLFA-1が結合してco-stimulatoryに働くことにある。正常細胞ではマクロファージと内皮細胞に発現しているにすぎない。しかし、IL-1、INF- γ 、TNF- α などにより活性化⁷⁾、あるいは炎症の刺激を受けると多くの細胞に発現してくる。

GRO 1 oncogene は、IL8様物質であり、炎症疾患により発現が増加する。NF-kappaBの活性化によってこの蛋白の発現が制御されているとの報告がある。

IGF 2 receptorの生理的意義ははっきりと解明されていないがIGF-2がIGF-2 receptorを介してGi2を活性化し、細胞増殖などの生理作用を示すという報告がある。

細胞の修復に関与していると思われる遺伝子は、Syndecan 1、cyclin dependent kinase 4、CDC37 (cell division cycle 37, *S.cerevisiae*, homolog)、lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3) 等がある。

Syndecan 1は Transmembrane heparan sulfate proteoglycanのひとつである。コラーゲン、フィブロネクチン、トロンボスポンディン、ラミニンなどさまざまな細胞外マトリックス成分と結合する細胞外マトリックスレセプターであり、細胞間接触にかかわっていると考えられている⁸⁾⁹⁾。又、ある種の細胞の発達や分化あるいは腫瘍化の過程で発現が変化することから、細胞の形態形成や組織の再生成長においても重要な役割を担っていると思われる。

cyclin dependent kinase 4とCDC37 (cell division cycle 37, *S.cerevisiae*, homolog) は共に細胞周期に関係している。DNAの損傷が起きた場合、細胞はG₁あるいはG₂期で増殖を停止して損傷の修復を行う。その修復が完了するまでS期の開始やM期への進行を行わせないようにする機構が働いており、checkpoint機構と呼ばれている。DNA損傷のシグナルに対応して起こるG₁期停止がCDK4のtyrosineリン酸化—脱リン酸化によって調節されている。このCDK4をターゲットとしているのがCDC37 (cell division cycle 37, *S.cerevisiae*, homolog) である¹⁰⁾。

アポトーシスに関与していると思われる遺伝子はCD27-binding (Siva) protein、prefoldin 5、CRADD (CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain)、nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell 1 (P105) である。CD27-binding proteinはCD27から細胞内に送られる信号としての蛋白で、アポトーシスを仲介している¹¹⁾。

Prefoldin 5はMRNA for c-Myc-binding proteinで、c-MycはARFの発現を誘導しDNA損傷などのストレスでアポトーシスを誘導すると考えられている。

CRADDはデスドメインをもち¹²⁾、P105は、TNFのシグナル伝達型の一部でありどちらもTNF関連物質でアポトーシスを誘導すると言われている。Lymphotoxin beta receptorは、TNFR superfamilyであるが、リンホトキシン (LT)- $\alpha_1\beta_2$ のレセプターで、細胞障害活性、ケモカイン産生、インテグ

リンの調節に関与している。

Non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed inは多機能性蛋白質であるヌクレオチド二リン酸キナーゼ (NDPK) と同一であり約150のアミノ酸塩基からなる。NM23-H2は癌の転移抑制作用を示す蛋白であるがその転移抑制の分子メカニズムはまだよく分かっていない¹³⁾。

Glutaredoxinは活性酸素による酸化ストレスに対する細胞の防御・調節機構として働いているレドックス蛋白の一つであり、内部の還元環境を維持しようとする働きを持っている¹⁴⁾¹⁵⁾。肝内結石症においては細菌感染などの外来要因による酸化ストレスのためにglutaredoxinの発現が結石側で増加している可能性がある。

Glutathione S-transferase theta 1と glutathione S-transferase M4は抗酸化剤誘導性遺伝子であり、ビリルビン、ヘム、ステロイド等の内因性リガンドを結合するのみならず、活性化された生体異物の代謝産物をグルタチオンなどの内因性基質で包含して無毒化する。Glutathione S-transferaseは代謝的に活性化される有毒物質や変異原生物質から生体を保護する誘導酵素ファミリーである¹⁶⁾。

Dynein, cytoplasmic, light polypeptideはHuman cytoplasmic dynein light chain 1 (hdlc 1)とも呼ばれ微小管のマイナスエンドへさまざまな物質を動かす moter proteinである¹⁷⁾。Dyneinは細胞間のコンタクトを行い、細胞間接着蛋白である beta-cateninと E-cadherinと結合する¹⁸⁾。

v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1はHuman rac protein kinase-alphaである。これはphosphotransferaseの1つでセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞増殖や遺伝子発現や平滑筋収縮など広範な生理機能に関わるProtein kinase Cと interactionを示す可能性があるという報告¹⁹⁾がある。

肝内結石症の多くはビリルビンカルシウム石であり、その特徴的な病理組織学所見として①大型胆管壁の繊維性肥厚、②大型胆管壁の胆管付属腺増生、

③胆管付属腺周囲に多くみられる小円形細胞浸潤からなる慢性増殖性胆管炎 (chronic proliferative cholangitis)が知られている²⁰⁾⁻²²⁾。これらの変化は周囲の肝臓組織にも影響を及ぼしていると考えられ、今回我々は結石側と非結石側の肝臓組織標本を用いたため、肝内胆管の増殖性変化に対する遺伝子発現解析は困難と考え TaKaRaのIntelliGene Human Cytokine CHIP、IntelliGene Apoptosis CHIPを使用してDNAマイクロアレイをおこなった。肝内胆管組織を含む非結石側肝臓、結石側肝臓でDNAマイクロアレイをおこなえば増殖因子に関連する遺伝子の発現や肝内胆管における炎症、アポトーシス等の遺伝子の発現が網羅的に解明できると思われる。

結 語

肝内結石症患者2例に対してTaKaRaのIntelliGene Human Apoptosis CHIP、IntelliGene Human Cytokine CHIPを用いてDNAマイクロアレイ法により遺伝子発現解析を行った。

非結石側肝臓ではアポトーシス抑制、増殖抑制遺伝子などの発現が相対的に増加しており、結石側肝臓では炎症反応、アポトーシス、細胞の保護、修復と増殖に関連する遺伝子の発現が相対的に増加していた。

DNAマイクロアレイは肝内結石症の病態の解明に有用であると思われた。

文 献

- 1) Hekker RA, Schena M, Chai A, *et al*: Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12833-12838
- 2) 葛谷 健: インスリン, 講談社サイエンティック, 1996; 32-53
- 3) Dudek H, *et al*: *Science* 1997; **275**: 661-665
- 4) 宮園浩平: サイトカイン・増殖因子, 羊土社, 1998; 104-105
- 5) Fan KD, Stark GR, Bloom BR: Molecular cloning

- of a gene selectively induced by gamma interferon from human macrophage cell line U937. *Mol Cell Boil* 1989; **5**: 1922-1928
- 6) Sandal B, *et al*: Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 1431-1437
- 7) Most J, *et al*: Regulation of the expression of ICAM-1 on human monocytes and monocytic tumor cell lines. *J Immunol* 1992; **148**: 1635-1642
- 8) Stanley MJ, *et al*: Heparan sulfate-mediated cell aggregation. Syndecans-1 and -4 mediate intercellular adhesion following their transfection into human B lymphoid cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 5077-5083
- 9) Salmivirta M, *et al*: A novel laminin-binding form of syndecan-18 cell surface proteoglycan produced by syndecan-1 cDNA-transfected NIH-3T3 cells. *Exp Cell Res* 1994; **215**: 180-188
- 10) Stepanova L, *et al*: Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of HSP90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev* 1996; **10**: 1491-1502
- 11) Prasad K.V.S., *et al*: CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 6346-6351
- 12) Ahmad M, *et al*: CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* 1997; **57**: 615-619
- 13) Stahl JA, *et al*: Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 1991; **1**: 445-449
- 14) Xia T-H, *et al*: NMR structure of oxidized Escherichia coli glutaredoxin: Comparison with reduced E. coli glutaredoxin and functionally related proteins. *Protein Sci* 1992; **1**: 310-321
- 15) Daily D, *et al*: Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by dual activation of the phosphoinositide 3-kinase and jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 2001; **24**: 21618-21626
- 16) 井上正康: レドックス制御と抗酸化治療戦略, 医薬ジャーナル社, 2000
- 17) Wilson MJ, *et al*: Light chains of mammalian cytoplasmic dynein: identification and characterization of a family of LC8 light chains. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001; **4**: 229-240
- 18) Ligon LA, *et al*: Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol* 2001; **10**: 913-917
- 19) Konishi H, *et al*: Molecular cloning of rat RAC protein kinase alpha and beta and their association with protein kinase C zeta. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **1**: 817-825
- 20) Nakanuma Y, Ohta G, Nagakawa T, *et al*: Histological studies on the livers with intrahepatic. *Jpn J Gastroenterol* 1981; **78**: 874-882
- 21) Terada T, Nakanuma Y: Morphological examination of intrahepatic bile ducts in hepatolithiasis. *Virchows Arch (pathol Anat)* 1988; **413**: 167-176
- 22) Ohta T, Nagakawa T, Takeda T, *et al*: Histological evaluation of the intrahepatic biliary tree in intrahepatic cholesterol stones, including immunohistochemical staining against apolipoprotein A-1. *Hepatology* 1993; **17**: 531-537

肝内結石症における遺伝子発現の網羅的解析

名古屋大学大学院 器官調節外科¹⁾

分子病態研究部門²⁾

研究協力者 二村 雄次¹⁾

共同協力者 國料 俊男¹⁾, 山本 竜義¹⁾

小田 高司¹⁾, 神谷 順一¹⁾

濱口 道成²⁾

はじめに

肝内結石症の治療成績の向上により長期生存例が増え経過中に胆管細胞癌を発症する症例の報告^{1)~4)}がされるようになり、病態についても少しずつ明らかになってきている^{5)~7)}。これらよりわれわれは肝内胆管癌は肝内結石症の重要な予後規定因子であると考えている。

一般に癌はいくつかの遺伝子による多段階的の過程を経て発生すると考えられており⁸⁾⁹⁾、網羅的に遺伝子発現を解析することが重要である。これまでの単一遺伝子についての解析¹⁰⁾¹¹⁾では不十分であり、発癌メカニズムの研究には網羅的な遺伝子発現の解析が必要である。

われわれは肝内結石症における発がんの機序として肝内結石による慢性炎症がDNAに損傷を与え、tumor suppressor gene、proto-oncogene、およびDNA damage repair geneに異常が生じ、癌が発生するという仮説をたてた(図1)。本研究の目的はこの仮説に基づいてDNA arrayを用いて網羅的な遺伝子解析をおこない、肝内結石症およびそれに伴う胆管癌発症に関与する遺伝子を同定することである。

対象と方法

対象症例は前回報告した肝内結石症4例(うち胆管細胞癌合併例2例)に肝内結石症3例を加えた7

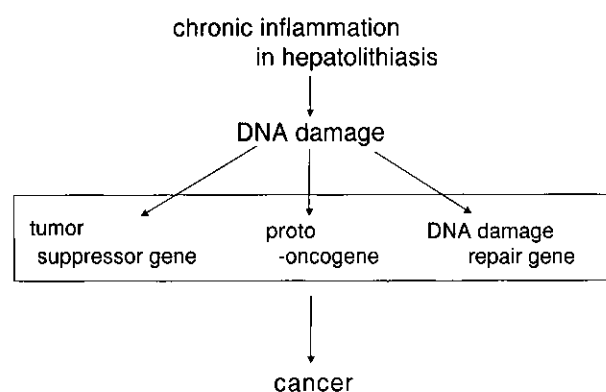


図1 発癌の機序

例で、男性1例、女性6例、年齢は44歳から56歳で、平均年齢48歳であった(表1)。

表1 症例

対象：肝内結石症7例(胆管細胞癌合併例2例を含む)

症例	年齢、性	胆管細胞癌合併例
1 :	50 女	+
2 :	56 女	-
3 :	44 女	-
4 :	46 女	-
5 :	46 男	+
6 :	45 女	-
7 :	49 女	-

DNA arrayの原理¹²⁾(図2)

肝切除標本の結石存在部位の肝葉と結石非存在部位の肝葉から、また胆管細胞癌合併例では癌部よりTRIZolTM、μMACS mRNA isolation kitTMにて

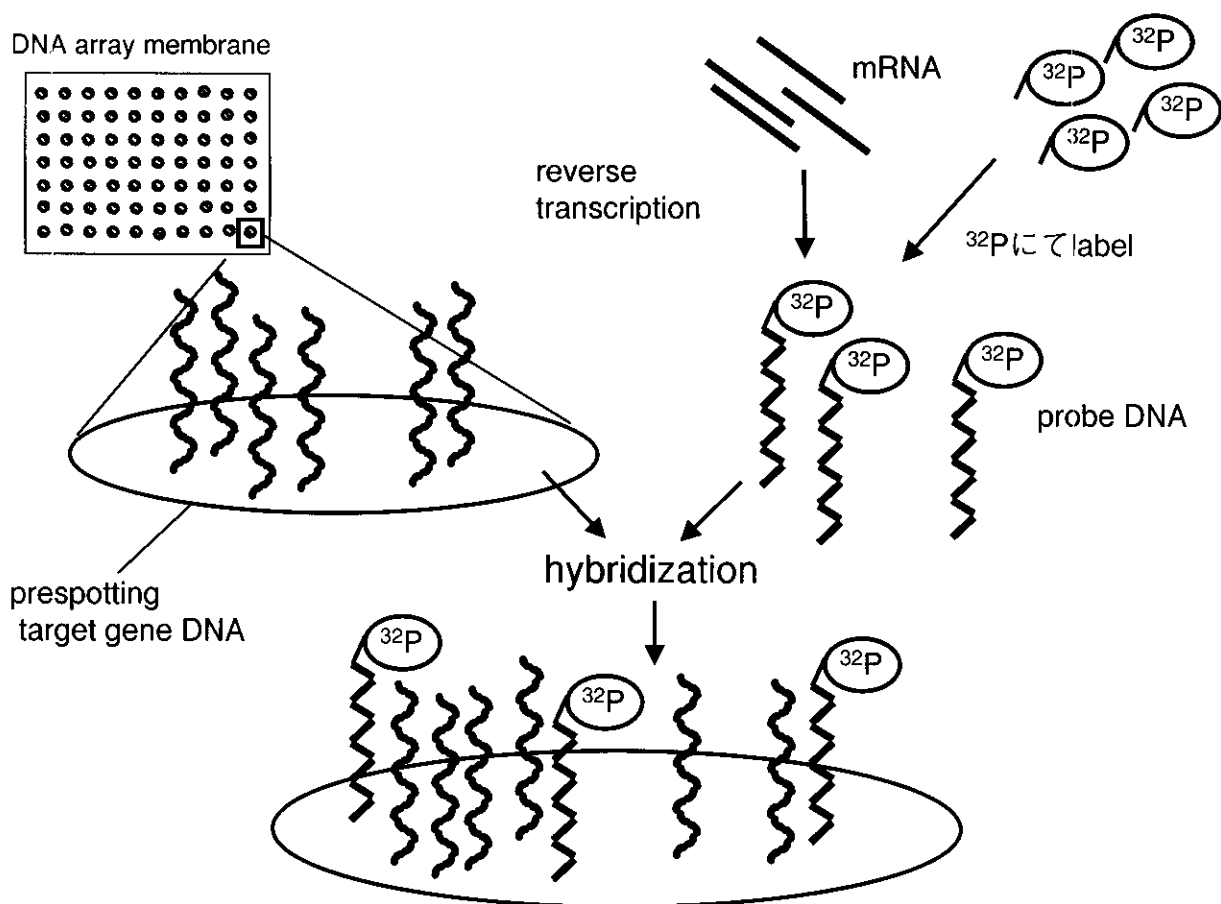


図2 DNA arrayの原理

mRNAを抽出した。このmRNAよりcDNAへ逆転写する際に、 ^{32}P でラベルしプローブDNAを作成した。DNA array membrane上にはあらかじめターゲット gene のDNAがプロットされており、このターゲット geneDNAとプローブDNAをハイブリダイズさせ、遺伝子の発現をアイソトープのシグナルとして検出した。シグナル強度としてグリッドのなかの単位面積あたりの放射線量を測定し、バックグラウンドの補正と house keeping gene であるサイトプラスミック β アクチン、G3PDHによる internal control normalization¹³⁾をおこなった。高発現している遺伝子は高シグナルとして描出され、遺伝子発現は結石非存在部位の肝葉に対する結石存在部位の肝葉のシグナル強度の比を2を底とする対数として検討した。遺伝子発現の比が2倍以上である1以上、1/2倍以下である-1以下を有意差ありとした。このmembrane (CLONTECH: Atlas Human

Cancer 1.2 ArrayTM) 上には1176個の cancer related gene、8個 house keeping geneがプロットされている。このうち tumor suppressor gene 33個、proto-oncogene 100個、DNA damage repair gene 37個について検討した。

結 果

1. 癌非合併例5例の結石存在部位の肝葉における遺伝子解析

結石存在部位の肝葉での tumor suppressor gene の発現 (図3)

縦に33個の tumor suppressor gene、横に各症例を示し、色は各症例のシグナル強度を示す。1以上で発現亢進しているものは赤、発現量に差のなかったものは黄色、-1以下で発現の低下しているものは緑で示した。すべての症例に共通して発現亢進または低下している tumor suppressor geneはないが、

33 tumor suppressor genes

- 1a adenomatous polyposis coli protein (APC)
- 2a breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2)
- 3a colorectal cancer suppressor protein (DCC)
- 4a p53-binding mouse double minute 2 homolog (MDM2)
- 5a neurofibromatosis protein type 1 (NF1); neurofibromin
- 6a MOESIN-ezrin-radixin-like protein (MERLIN) neurofibromatosis 2 (NF2)
- 7a retinoblastoma-like protein 2 (RBL2; RB2)
- 8a p53 cellular tumor antigen
- 9a retinoblastoma-associated protein 1 (RB1); phosphoprotein 110 (pp110)
- 10a VonHippelLindau tumor suppressor protein (VHL)
- 11a Wilms' tumor protein (WT33; WT1)
- 12a phosphatase & tensin homolog (PTEN); MMAC1; TEP1
- 13a colorectal mutant cancer protein (MCC)
- 14a cadherin1 (CDH1); epithelial cadherin (E-cadherin; CDHE); UVO; CAM 120/80
- 15a ras-related protein RAP-1A; C21KG; KREV-1 protein; G-22K
- 16a EB1 protein
- 17a ezrin; cytovillin 2; villin 2 (VIL2)
- 18a transforming growth factor beta 3 (TGF-beta3; TGFB3)
- 19a transforming growth factor beta receptor III (TGF beta receptor III; TGFR3); betaglycan
- 20a prohibitin (PHB)
- 21a tight junction protein 1 (TJP1); zonula occludens (ZO1)
- 22a mothers against decapentaplegic homolog 4 (DPC4; MADH4; SMAD4)
- 23a nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB); NME2; PUF; NM23B
- 24a nucleoside diphosphate kinase A (NDKA); NM23-H1
- 25a TSG101 tumor susceptibility protein
- 26a LUCA15 putative tumor suppressor
- 27a MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 (MARK3)
- 28a wee1Hu CDK tyrosine 15-kinase; wee-1-like protein kinase
- 29a cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2B (CDKN2B); p14-INK4B; MTS2
- 30a cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2 (CDK4I; CDKN2); p16-INK4; MTS1
- 31a cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2D (CDKN2D); p19-INK4D
- 32a cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (CDKN1C); p57; KIP2
- 33a cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A); MDA6; CIP1; WAF1; SDI1

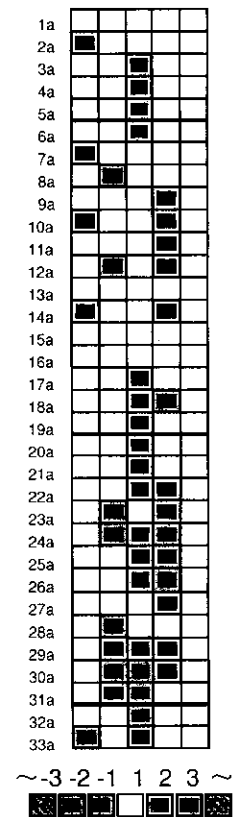


図3 癌非合併例における tumor suppressor gene の発現

表2 癌非合併例における tumor suppressor gene の発現

Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL)
cadherin 1 (CDH1); epithelial cadherin (E-cadherin; CDHE)
mothers against decapentaplegic homolog 4 (DPC4)
nucleoside diphosphate kinase A (NDKA); NM23-H1
TSG101 tumor susceptibility protein
LUCA15 putative tumor suppressor
cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2B (CDKN2B); p14-INK4B
cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2 (CDK4I; CDKN2); p16-INK4
cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2D (CDKN2D); p19-INK4D

各症例で発現低下している tumor suppressor gene の数は 0 から 5 個であり、多くの症例で発現亢進しているのがわかり、9 遺伝子が 2 症例以上で共通して発現亢進していた (表 2)。

結石存在部位の肝葉での proto-oncogene の発現 (図 4a、4b、4c)

すべての症例に共通して発現亢進または低下して

いる症例はないが、発現低下している遺伝子は少なく広範囲に発現亢進していることがわかる。各症例で発現低下していた proto-oncogene の数は 0 から 12 個であり、広範囲に亢進していた。8 遺伝子が 3 症例以上で共通して発現亢進していた (表 3)。

met proto-oncogene の発現を DNA array と RT-PCR で検討した (図 5)。N は結石非存在部位の肝

100 proto-oncogenes

- 1b c-fos proto-oncogene; G0S7 protein
- 2b c-jun proto-oncogene
- 3b myb proto-oncogene
- 4b myc proto-oncogene
- 5b c-rel proto-oncogene protein
- 6b L-myc proto-oncogene (MYCL1)
- 7b N-myc proto-oncogene
- 8b ets1 proto-oncogene
- 9b MAX dimerization protein (MAD)
- 10b junD proto-oncogene
- 11b elk-1; ets-related proto-oncogene
- 12b MYB-related protein B (B-MYB); MYBL2
- 13b fos-related antigen 2 (FRA2); fos-like antigen 2 (FOSL2)
- 14b FOS-related antigen 1 (FRA1); FOS-like antigen 1 (FOSL1)
- 15b ets translocation variant 6 (ETV6); TEL proto-oncogene
- 16b jun-B
- 17b A-raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; PKS2
- 18b B-raf proto-oncogene (RAF1)
- 19b pim-1 proto-oncogene
- 20b raf1 proto-oncogene
- 21b mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 (MAP3K8; MAP3K8); cot proto-oncogene
- 22b tyrosine-protein kinase receptor UFO; axl oncogene
- 23b colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R); fms proto-oncogene
- 24b c-kit proto-oncogene; mast/stem cell growth factor receptor (SCFR); CD117 antigen
- 25b met proto-oncogene; hepatocyte growth factor receptor (HGF receptor; HGFR)
- 26b papillary thyroid carcinoma-encoded protein + RET proto-oncogene
- 27b epidermal growth factor receptor (EGF receptor; EGFR); erbB proto-oncogene
- 28b erbB2 proto-oncogene; neu proto-oncogene; HER2
- 29b erbB3 proto-oncogene; HER3
- 30b erbB4 proto-oncogene; HER4; neuregulin receptor
- 31b platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR-alpha; PDGFRA); CD140A antigen
- 32b fms-related tyrosine kinase 1 (FLT1); VEGFR1; vascular permeability factor receptor
- 33b TYRO3 tyrosine-protein kinase receptor; RSE; SKY; DTK

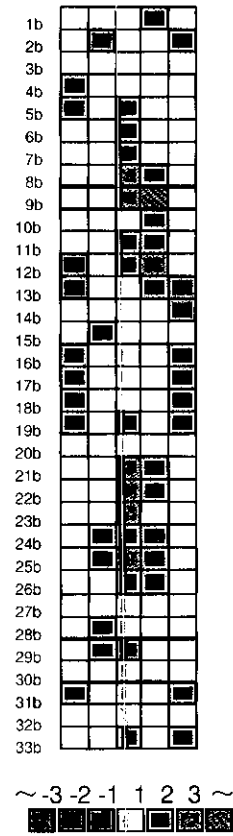


図 4a 癌非合併例における proto-oncogene の発現

100 proto-oncogenes

- 34b c-ros-1 tyrosine-protein kinase proto-oncogene
- 35b c-abl proto-oncogene
- 36b Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (ABL2); ARG
- 37b C-src proto-oncogene (SRC1)
- 38b c-yes proto-oncogene; YES1
- 39b C-fes proto-oncogene
- 40b c-fgr proto-oncogene (p55-FGR); SRC2
- 41b src homology 2 protein (SH2)
- 42b ras homolog gene family member A (RHOA; ARHA); ARH12; RHOH12
- 43b H-ras proto-oncogene; transforming G protein
- 44b v-Ki-RAS2B proto-oncogene (KRAS2)
- 45b n-ras proto-oncogene; transforming protein p21
- 46b C-cbl proto-oncogene
- 47b platelet-derived growth factor beta subunit (PDGF-beta; PDGFB); sis proto-oncogene
- 48b mas proto-oncogene
- 49b thrombopoietin receptor (TPOR); myeloproliferative leukemia protein (MPL)
- 50b cell surface glycoprotein MUC18; melanoma-associated antigen A32; CD146 antigen
- 51b insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGF-binding protein 2; IGFBP2; IBP2)
- 52b T-lymphoma invasion and metastasis inducing TIAM1
- 53b matrix metalloproteinase 11 (MMP11); stromelysin 3
- 54b putative oral tumor suppressor protein; DOC-1
- 55b synapse-associated protein 102 (SAP102); NE-DLG; DLG3; DLG
- 56b malignant melanoma metastasis-suppressor (KISS-1) gene
- 57b p33ING1
- 58b 5T4 oncofetal antigen
- 59b neurogenic locus notch protein
- 60b c-myc-binding protein MM-1; prefoldin 5 (PFDN5; PFD5)
- 61b metastasis-associated protein 1 (MTA1)
- 62b gamma-interferon-inducible protein; IP-30
- 63b matrix metalloproteinase 10 (MMP10); stromelysin 2 (STMY2; SL2); transin 2
- 64b matrix metalloproteinase 18 (MMP18); MMP19
- 65b tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3); SFD
- 66b prostate-specific membrane antigen (PSM)

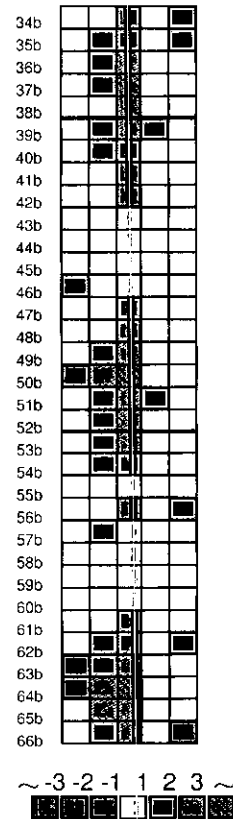


図 4b 癌非合併例における proto-oncogene の発現

100 proto-oncogenes

- 67b interferon-inducible protein 9-27
- 68b p53-induced protein
- 69b interferon-inducible protein AIM2
- 70b neurogenic locus notch protein homolog 1 (NOTCH1); TAN1
- 71b neurogenic locus notch protein homolog 2 (NOTCH2)
- 72b neurogenic locus notch protein homolog 4 (NOTCH4)
- 73b MDM2-like p53-binding protein (MDMX)
- 74b mer proto-oncogene
- 75b P126 (ST5)
- 76b von Hippel-Lindau-binding protein 1 (HIBBJ46; VHL-binding protein 1; VBP1)
- 77b box-dependent myc-interacting protein 1
- 78b cullin homolog 2 (CUL2)
- 79b active breakpoint cluster region-related protein
- 80b CD82 antigen; inducible membrane protein R2; C33 antigen; metastasis suppressor kangai 1
- 81b leukemia-associated gene 1
- 82b myelodysplasia/myeloid leukemia factor 2 (MLF2)
- 83b putative RHO/RAC guanine nucleotide exchange factor (rho/rac GEF); FGD1
- 84b Abl interactor 2 (Abl-2) + Abl binding protein 3 (AbIBP3) [ArgBP1B]
- 85b GRB-IR / GRB10
- 86b vav oncogene
- 87b ras homolog gene family member C (RHOC; ARHC); ARH9; H9
- 88b rho6 protein
- 89b Rho7 protein
- 90b ras-like protein TC10
- 91b ras-like small GTPase TTF
- 92b rho-related GTP-binding protein (RHOG); ARHG
- 93b Rho-related GTP-binding protein RhoE; Rho8; ARHE
- 94b rhoHP1
- 95b ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (RAC2)
- 96b CDC42 GTPase-activating protein
- 97b rho GDP dissociation inhibitor 2 (RHO GDI2; RHO-GDI beta); LY-GDI; ARHGDIB; GDID4
- 98b RHO GDP-dissociation inhibitor 3 (RHO-GDI 3); RHO-GDI gamma; ARHGDIG
- 99b rho-GAP hematopoietic protein C1 (RGC1); KIAA0131
- 100b neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 (NTRK1; TRK)

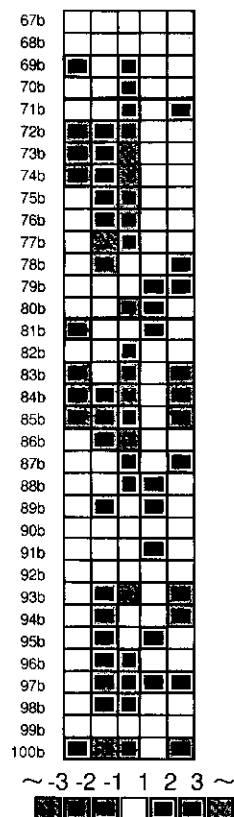


図 4c 癌非合併例における proto-oncogene の発現

表 3 癌非合併例における proto-oncogene の発現

pim-1 proto-oncogene
c-kit proto-oncogene; mast/stem cell growth factor receptor (SCFR)
met proto-oncogene; hepatocyte growth factor receptor (HGFR)
c-abl proto-oncogene
c-fes proto-oncogene
insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2)
gamma-interferon-inducible protein; IP-30
rho GDP dissociation inhibitor 2 (RHO GDI2; RHO-GDI beta)

葉、Sは結石存在部位の肝葉、DNA arrayで発現亢進を認めた3症例のうち、2症例の結石存在部位の肝葉でRT-PCRによるmet proto-oncogeneの発現を認めた。

結石存在部位の肝葉でのDNA damage repair geneの発現(図6)

3例以上で共通して発現している遺伝子はなく、発現亢進していた遺伝子数は1から6個、低下では

1から25個でDNA damage repair geneではtumor suppressor gene、proto-oncogeneのような広範囲な発現の亢進は認めなかった。

2. 癌合併例2例の結石存在部位の肝葉、癌における遺伝子解析

癌合併例2例の結石存在部位の肝葉、癌におけるtumor suppressor geneの発現(図7)

Cは癌、Sは結石存在部位の肝葉をしめす。症例