

先天性胆道拡張症術後例における肝内結石症 －治療後の経過と画像診断－

研究協力者 露口利夫

千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学

研究要旨

先天性胆道拡張症術後には肝内結石を高頻度に生じる。肝内結石の治療（PTCSL）後に再発することも多いがしばしば結石の存在及び局在診断に難渋する。そこでMRCPとMRCP撮像時のデヒドロコール酸投与の有用性を検討した。対象は先天性胆道拡張症術後に肝内結石を発症し当科でフォローしている5人のうちPTCSLを行った後定期的に通院している3人である。全員女性で平均年齢は38歳。MRCPの撮像方法は3D-TSE法（TR1650msec TE650msec TSE factor119 flipangle90）を用い40sliceを撮像し3断面のMIP画像を形成した。強力な利胆作用を有するデヒドロコール酸1000mgと50%Glu10mlを混ぜ緩徐に静注し、その前後（15分、30分後）で、MRCPを撮像し、胆管描出能と肝内結石描出能の変化を観察した。その結果投与した3例中2例で胆汁分泌量が増加し、肝内胆管はより末梢まで描出され、胆管全体の辺縁や吻合部も明瞭化し、肝内結石の描出は改善された。また吻合部からの胆汁の流出具合を確認でき吻合部狭窄の評価も可能であった。胆汁性肝硬変例では胆汁分泌量が増加せず肝内胆管、肝内結石の描出の改善は殆ど無かった。MRCP撮像時にデヒドロコール酸を投与することで肝内胆管、吻合部、肝内結石の描出能が改善することが示唆された。MRCPは非侵襲的であり先天性胆道拡張症術後に発症した肝内結石の存在及び局在診断に有用と考えられた。

A. 研究目的

先天性胆道拡張症に対しては年少時にRoux-Y法による胆管空腸吻合または肝門部空腸吻合を行われるが、長期的には肝内結石を合併することが多いことが知られている。また、経皮的胆道鏡下碎石術（PTCSL）を施行しても結石再発することも多い。胆道拡張症術後例では肝内結石を再発しても無症状であったり肝胆道系酵素データに異常が無いことがあるため結石再発の評価には定期的な画像診断が必要である。しかし、結石の存在及び局在診断にはしばしば難渋する。腹部超音波検査は、非侵襲的であり定期的なスクリーニング検査としては第1選択であるが、吻合部の存在によるpneumobiliaが結石の存在診断を妨げることが多い。CTは石灰化を伴わない結石の評価が行えないことやレントゲン被曝の

問題もあり頻回に行うわけにはいかない。ERCPはRoux-Y法後には行えず、PTCはスクリーニング検査には適さない。一方、MRCPは非侵襲的であり結石のスクリーニング検査としては腹部エコー同様に施行可能な検査である。しかし肝内胆管枝の描出は不良なことが多く現状では結石再発の診断に十分な画像とは言えない。そこでMRCP撮像時にデヒドロコール酸を投与し、胆汁分泌量を増加させることで肝内胆管、吻合部、肝内結石の描出能が改善されるかを臨床的に検討した。

B. 研究方法

対象は先天性胆道拡張症術後に肝内結石を発症し当科でフォローしている5人のうちPTCSLを行った後定期的に通院している3人で

表1

性	年齢	疾患	術式	PTCSL	再発時期
1 F	22	肝内結石再発・右(Roux-Y 後) PTCSL 後6年	肝門部空腸吻合 (4才)	H10.1.	H15.3.再発 5年2ヵ月
2 F	40	肝内結石再発・左右(Roux-Y 後) PTCSL 後2年	胆管空腸吻合 (4才)	H13.10.	H15.1.再発 1年3ヵ月
3 F	56	肝内結石再発・左右(Roux-Y 後) PTCSL 後3年	肝門部空腸吻合 (16才)	H13.4.	H15.12.再発疑い 2年8ヵ月
4 M	21	肝内結石 (Roux-Y 後) PTCSL 後7年	肝門部空腸吻合 (16才)	H9.9.	Drop out
5 F	17	肝内結石(Roux-Y 後)	肝門部空腸吻合 (0才)	.	.

ある(表1の1~3)。全員女性で平均年齢は38歳であった。

MRCPの撮像方法は3D-TSE法(TR1650msec TE650msec TSE factor119 flipangle90)を用い40sliceを撮像し3断面のMIP画像を形成した。デヒドロコール酸1000mgと50%Glu10mlを混ぜ緩徐に静注し、その前後(15分、30分後)で、MRCPを撮像し、胆管描出能と肝内結石描出能の変化を観察した。デヒドロコール酸とはコール酸の酸化により製する化合物で、直接肝細胞に作用して肝臓の胆汁分泌機能を亢進する。催胆作用は強力で注射後急速に胆汁分泌量が増加する。

C. 研究結果

天性胆道拡張症術後の肝内結石を治療した4人のうち3人が肝内結石を再発した。1人はdrop outしたため再発の評価が出来なかった。再発までの期間は1年3ヶ月から5年2ヶ月で平均約3年であった。再発した3人のうち2人は発熱、腹痛といった胆管炎の症状は出ていない。またそのうち1人は採血データも正常である。結石再発の有無を定期的に外来でチェックしている腹部超音波検査はpneumobiliaで肝内結石の評価が難しく、MRCPで結石の再発と局在を診断することが可能であった。MRCP撮像時

にデヒドロコール酸を投与することで胆汁分泌が促進され肝内胆管、吻合部の描出能が向上した。それに伴い肝内結石の透亮像が明瞭になった。また吻合部からの胆汁の流出具合を確認でき吻合部狭窄の評価も可能であった。しかし肝硬変の患者では胆汁分泌能が落ちており画像の向上は得られなかった。

症例1:22歳、女性

昭和59年4才時に先天性胆道拡張症に対し、胆管囊腫切除術、肝門部空腸吻合術を施行。平成9年11月右側腹部痛、発熱を認め肝内結石の診断となり、平成10年1月1日内科入院。PTCSLを8回施行し結石のないことを確認し3月退院。

PTCSL後は外来で経過を見ている。特に症状はなく、肝胆道系酵素も動いていない。フォローアップのエコーでも明らかな結石は指摘されていなかった(図1)。平成15年2月のエコーでpneumobiliaと石の鑑別の難しい高エコー像を認めたため、3月にMRCPを施行。B6に透亮像を認めた。デヒドロコール酸投与により、胆管全体の辺縁や吻合部も明瞭化し、肝内結石の描出は改善され、また吻合部からの胆汁流出も良好であることが確認された(図3)。平成15年8月のエコーで結石を確認した(図2)。

症例2:40歳、女性

昭和42年4歳時に胆道拡張症に対し胆管切除術、胆管空腸吻合術を施行。その後胆管炎の症状は無か

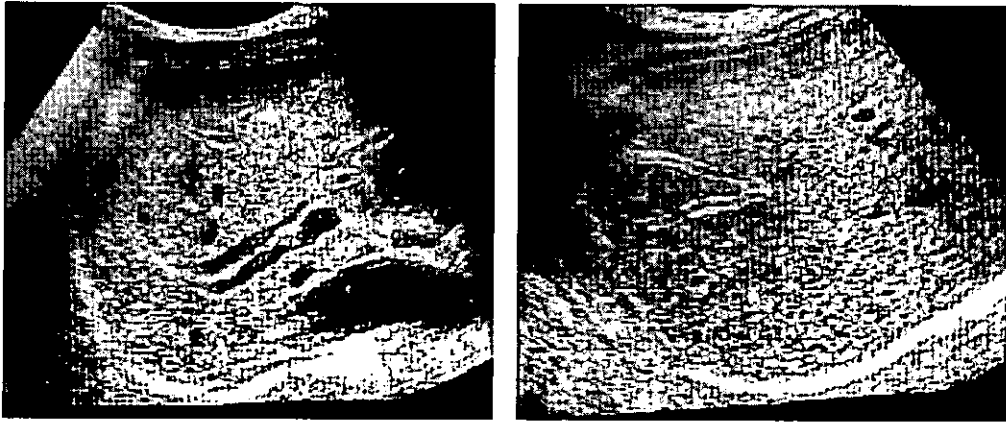


図1 平成14年2月のエコー (PTCSL後2年)

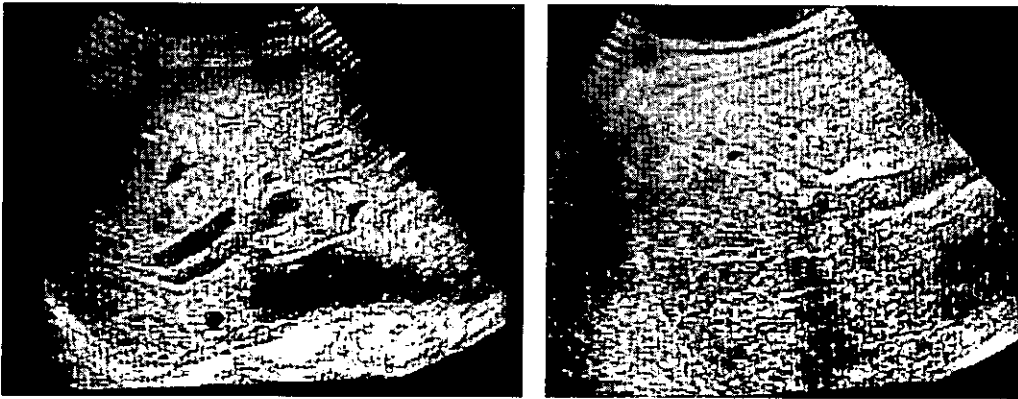


図2 平成15年8月のエコー (PTCSL後5年5ヶ月)

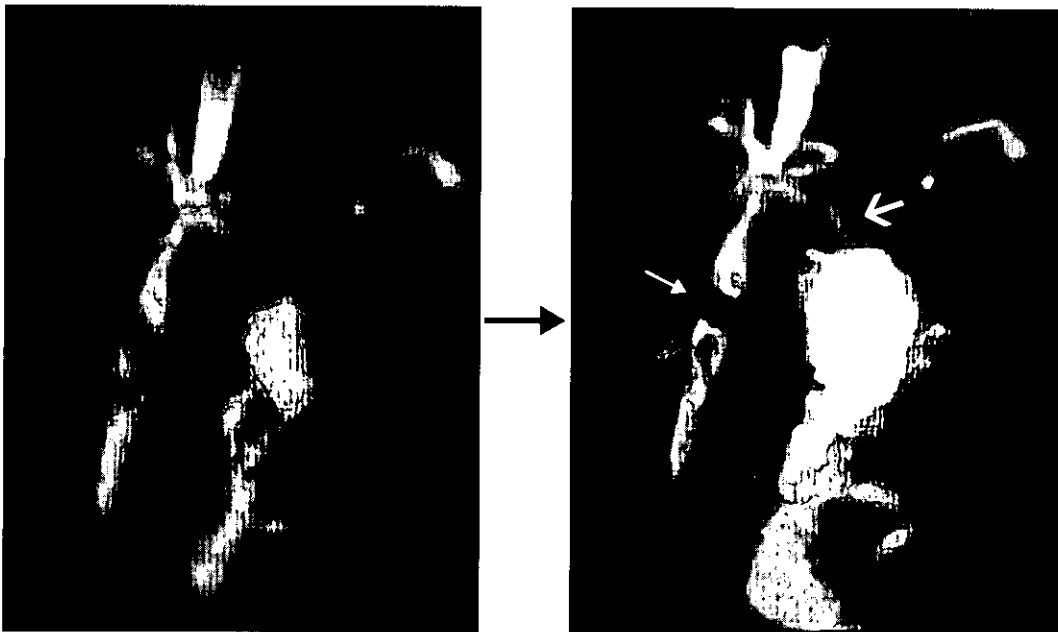


図3 平成15年3月のMRCP MIP (PTCSL後5年)

右図はデヒドロコール酸投与30分後である。胆管全体の辺縁や吻合部が明瞭化し肝内結石の描出が改善されている。

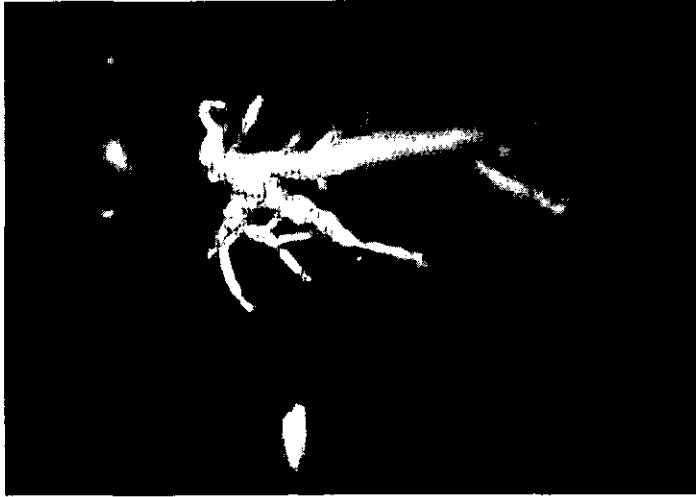


図4 平成15年1月のMRCP MIP (PTCSL後1年3ヶ月)

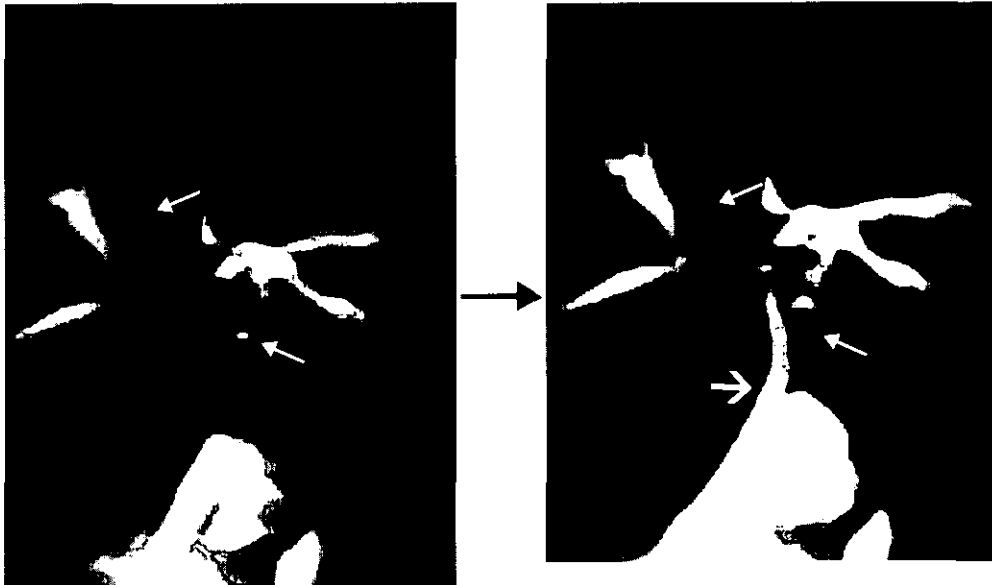


図5 平成15年1月のMRCP MIP (PTCSL後2年1ヶ月)

右図はデヒドロコール酸投与30分後である。胆管全体の辺縁や吻合部が明瞭化し肝内結石の描出が改善されている。

ったが、平成5年肝膿瘍にて近医入院時に肝内結石を指摘された。その後も度々胆管炎を生じるため、平成13年10月当科入院となった。PTCSLを3回行い11月退院。PTCSL後は平成14年6月と10月に発熱、尿濃染などの胆管炎の症状を認めた。

エコーでは結石の再発ははっきりしなかったが、平成15年1月のMRCPにてB2に透亮像を認めた(図4)。5月のエコーではB2,B3に高エコー像を確認した。12月のMRCPではB4にも透亮像を認めた。デヒドロコール酸投与により、胆管全体の辺縁や吻合部も明瞭化し、肝内結石の描出は改善され、また

吻合部からの胆汁流出も良好であることが確認された(図5)。PTCSL後胆管炎症状を生じたのは3回で、いずれも内服薬で軽快したため経過観察としている。

症例3：56歳、女性

昭和38年16才時に胆管嚢腫切除術、肝門部空腸吻合術を施行。平成3年肝内結石に対し他院にて手術施行(詳細不明)。平成7年頃より黄疸出現。平成13年3月精査加療目的で当科入院。2次性胆汁性肝硬変、肝門部空腸吻合部狭窄、肝内結石の診断となり、PTCSLを4回施行し、PTCDチューブを内

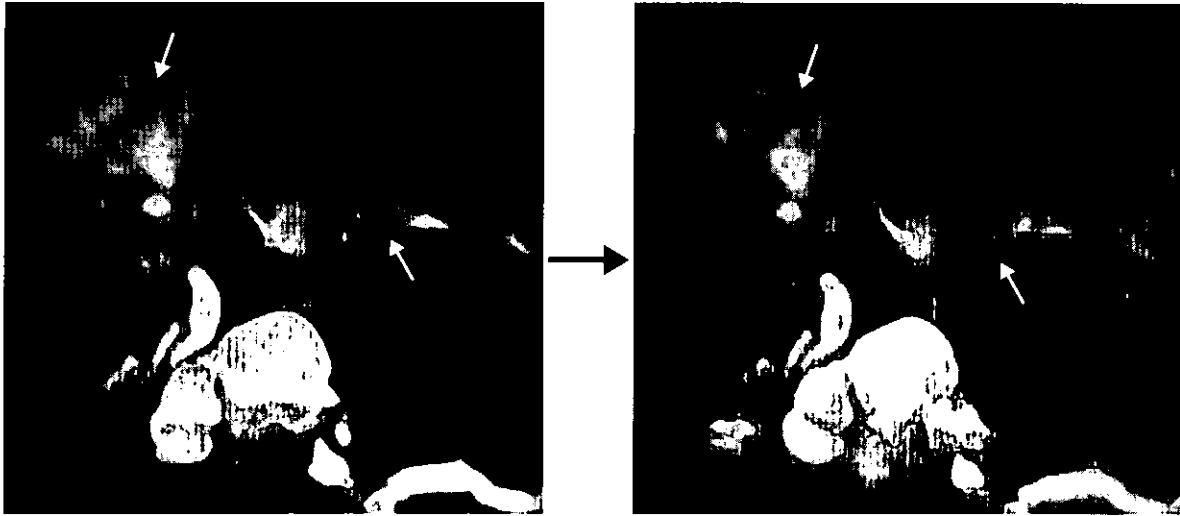


図5 平成15年12月のMRCP MIP (PTCSL後2年6ヶ月)

右図はデヒドロコール酸投与30分後である。肝硬変のためデヒドロコール酸を投与しても胆汁分泌量は増えず肝内胆管、吻合部、肝内結石の描出能は改善していない。

外瘻化したまま6月退院。PTCSL後は平成13年11月のエコーでB8に高エコー像を認めたが、チューブ造影、CTで石は確認されなかった。特に胆管炎の症状が無い為平成14年2月PTCDチューブを抜去した。黄疸高値は持続しているが、発熱等の症状は出ておらず2次性胆汁性肝硬変によるものと考えられた。その後のエコーでは明らかな肝内結石は認めない。平成15年12月のMRCPではB8と右枝に透亮像を認めた。肝硬変のためデヒドロコール酸を投与しても胆汁分泌量は増えず肝内胆管、吻合部、肝内結石の描出能は改善しなかった。

D. 考案

先胆道拡張症術後例では肝内結石を再発しても無症状であったり、肝胆道系酵素に異常が無いこともあるため定期的な画像診断が必須である。腹部超音波検査は非侵襲的であり定期的なスクリーニング検査としては第1選択であるが、吻合部の存在によるpneumobiliaによって肝内結石の診断にはしばしば難渋する。MRCPは非侵襲的であり肝内結石の局在および存在診断に有用であるが胆汁量が不足しやすい吻合部や肝内胆管枝では画像読影上不十分な情報が得られないことが多い。デヒドロコール酸は経静脈的に投与することで強力な利胆作用が得られる

ため超音波検査時に肝内胆管枝や胆嚢の描出を向上させることが知られておりMRCP撮像時にも同様の効果をみる事ができた。しかし胆汁性肝硬変例では胆汁分泌の増加が得られないことや肝内胆管が伸展しないことによって画像描出の向上は認められなかった。同様に胆管炎や結石による胆汁うっ滞を生じているような例ではデヒドロコール酸負荷による描出能改善効果は期待できない。今回の3例の経験では最もよい適応は結石と空気 (pneumobilia) の鑑別が困難な例であると考えられた。

また、吻合部からの胆汁の流出状況を確認でき吻合部狭窄の有無を臨床的に評価することができた。今後は胆汁流出量をMRCPの連続撮影により判定量化することができれば、結石存在診断のみならず生理的な肝胆汁の動きをみることのできるpharmacologic MRCPとして発展することも期待される方法である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

Ando T, Tsuyuguchi T, Okugawa T, Saito T, Ishi-

hara T, Yamaguchi T.

Saisho H : Risk factors for recurrent bile duct stones after endoscopic papillotomy Gut 2003 ; 52 : 116-121

露口利夫、税所宏光 胆石、胆道炎。(特集：高齢者の肝胆膵疾患診療の進歩) 老年消化器病 15 (1) : 21-24, 2003.

露口利夫、税所宏光 総胆管胆石症に対する内視鏡治療—外来診療は可能か? 成人病と生活習慣病33 (2) : 187-191, 2003.

露口利夫、福田吉宏、蓼沼寛、黒田泰久、税所宏光、横井英人 胆管胆石症に対する内視鏡的治療のクリ

ニカルパス 胆と膵24 (3) : 167-170, 2003

露口利夫、奥川忠博、石原武、山口武人、税所宏光 胆管胆石症に対する内視鏡的乳頭切開術の長期予後—術後再発例の検討—胆膵の生理機能19 (1) : 39-41, 2003

露口利夫、黒田泰久、福田吉宏、税所宏光術後良性胆道狭窄に対する内視鏡的胆道拡張術の長期予後 胆と膵24 (7) : 513-516, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

肝内結石症を背景とした胆管癌の検討

主任研究者 跡見 裕

杏林大学医学部第1外科

研究要旨

肝内結石症は胆管癌の前癌病変と考えられており、本症における慢性増殖性胆管炎は肝内胆管癌の発生・進展に促進的に関与すると考えられている。今回われわれは当科において、肝内結石症の診断にて肝切除術を施行した6例（男性2名、女性4名）と肝内結石症治療後に発症した胆管癌にて肝切除術を施行した1例を対象として、各症例での切除肝標本のパラフィン包埋切片を用いて結石存在部胆管、胆管周囲腺、非結石部胆管での粘液形質や細胞修復、細胞回転などの因子 [PAS-Alb重染色, MUC2, MUC5AC, MUC6, TFF1(pS2), MIB-1(Ki67), CA199, p53, HighMobilityGroupFamily=HMGA1, HMGA2)] を免疫組織学的染色にて組織学的性質や発現時期を同定しMalignant Transformationの獲得時期について検討した。MUC2, p53の発現はいずれの症例にもみられなかった。MUC5AC, MUC6, TFF1(pS2), CA19-9の発現は結石存在部、胆管周囲腺と胆管癌症例でも発現がみられた。また、MUC5AC, MUC6では発現に分布差異がみられた。MIB-1(Ki-67)の発現は結石存在部および胆管癌でみられた。HMGA1, HMGA2は結石存在部や胆管周囲腺で弱発現している症例がみられたが、胆管癌症例では強発現がみられた。これらの結果よりHMGA1の発現は胆管上皮の異形成変化がみられるころより徐々に発現がみられ、過形成から異形成へのMalignant potentialのTransformationに関与していると考えられた。また本症での胆管癌合併において、肝切除の切除範囲の合理的な検討および残肝再発の可能性についてHMGA1免疫染色による評価が期待され、HMGA1の発現は肝内結石症でのMalignant Transformationの獲得時期の指標として重要な役割を持つと考えられた。

A. 研究目的

肝内結石症は胆管癌の前癌病変と考えられており、本症における

慢性増殖性胆管炎は肝内胆管癌の発生・進展に慢性持続性炎症が促進的に関与すると考えられている。われわれは当科での肝内結石症症例および肝内結石症治療後に発症した胆管癌症例での肝切除標本を用いて、粘液形質や細胞修復、細胞回転などの諸因子を免疫組織学的染色にて組織学的性質や発現時期を検索しMalignant Transformationの獲得時期について検討した。

B. 研究方法

当科において肝内結石症の診断にて肝切除術を施行した6例（男性2名、女性4名）と肝内結石症治療後に発症した胆管癌にて肝切除術を施行した1例を対象として、各症例での切除肝標本のパラフィン包埋切片を用いて、結石存在部胆管、胆管周囲腺、非結石部胆管での以下の項目を免疫組織学的染色にて検討した。

検討事項：PAS-Alb重染色、MUC2, MUC5AC, MUC6, TFF1(pS2), MIB-1(Ki-67), CA19-9, p53, HMGA1, HMGA2)

C. 研究結果

MUC2, p53の発現はいずれの症例にもみられなかった。MUC5AC, MUC6, TFF1(pS2), CA19-9の発現は結石存在部, 胆管周囲腺と胆管癌症例で発現がみられた。また、MUC5AC, MUC6では発現に分布差異がみられた。

MIB-1(Ki-67) の発現は結石存在部および胆管癌でみられた。HMGA1, HMGA2は結石存在部や胆管周囲腺で弱発現している症例がみられたが、胆管癌症例では強発現がみられた。

D. 考察

HMGFの発現は胆管上皮の異形成変化がみられるところより徐々に発現がみられ、過形成から異形成へのMalignant potentialのTransformationに関与していると考えられる。肝内結石症症例での胆管癌合併において、肝切除の切除範囲の合理的な検討および残肝再発の可能性についてHMGF免疫染色による評価が期待される。

E. 結論

MUCやTFF1やMIB-1は胆管上皮の脱落・再生を繰り返す慢性増殖性胆管炎の時期にも発現しておりCell cycleの指標でありMalignant Transformationよりもかなり前段階で発現が生じており、また発癌後にも発現形質が残っている。

HMGFの発現は肝内結石症でのMalignant Transformationの獲得時期の指標として重要な役割を持つと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 阿部展次, 鈴木裕, 森俊幸, 杉山政則, 跡見裕 肝・胆道手術後の胆汁漏出に対する内視鏡的胆管ドレナージ術の有用性 胆道17:300, 2003
2. 脱紅芳, 杉山政則, 中島正暢, 阿部展次, 森俊幸, 跡見裕 閉塞性黄疸とドレナージにおける肝機能と好中球機能の変化 胆道17:299, 2003
3. 杉山政則, 阿部展次, 跡見裕 総胆管結石に対する内視鏡的乳頭切開術後の長期合併症の危険因子 胆道17:211, 2003
4. 阿部展次, 杉山政則, 跡見裕 胆管癌外科治療の最近の進歩 Mebio 20:94-101, 2003
5. 森俊幸, 下位洋史, 杉山政則, 跡見裕, 篠崎優子, 常見藍 胆嚢摘出術のクリニカルパス 消化器外科26:415-422, 2003
6. 泉里友文, 阿部展次, 正木忠彦, 森俊幸, 杉山政則, 跡見裕 実験的肝内コレステロール結石の検討 杏林医学会雑誌34:39, 2003
7. 跡見裕, 阿部展次, 杉山政則 胆道癌の診療 日本医師会雑誌129:482-485, 2003
8. 佐々木秀雄, 跡見裕 胆石症 外科64:1547, 2002
9. 泉里友文, 杉山政則, 跡見裕 胆・膵 採石バスケット 消化器内視鏡14:1386, 2002
10. 森俊幸, 阿部展次, 杉山政則, 跡見裕 肝内結石症の成因をめぐって—肝内結石症の現況 胆と膵 24(11) 735-738, 2003
11. Mori T, Abe N, Sugiyama M, Atomi Y. Laparoscopic hepatobiliary and pancreatic surgery: an overview. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 9:710-22, 200

H. 知的財産権の出願登録状況

特になし

肝内胆管癌の発生に関わる遺伝子変異の検討 －肝内結石合併、非合併例の比較－

研究協力者 味岡 洋一

新潟大学医歯学総合研究科

研究要旨

肝内結石合併胆管癌7例、非合併胆管癌13例を対象として、これらの発生にAPC-Wnt signaling pathwayと replication error pathwayが関与しているかどうかを免疫組織学的に比較検討した。前者の指標である β -catenin蛋白異常蓄積の頻度は、結石合併例で0/7、非合併例で3/13（23.1%）であった。後者の指標であるミスマッチ修復遺伝子蛋白消失は、結石合併・非合併ともにhMLH1には認められなかったが、hMSH2では結石合併例の1/7（14.3%）、非合併例の4/13（30.8%）にみられた（いずれも蛋白部分消失）。APC-Wnt signaling pathwayは結石非合併肝内胆管癌の発生のみならず、replication error pathwayは結石合併・非合併肝内胆管癌の発生に共通して、関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝内結石症の重要な合併症に、肝内胆管癌がある。肝内結石症に合併する肝内胆管癌発生には、結石の存在による慢性持続炎症による胆管上皮の脱落・再生過程が関与していると想定されるが、その背景にどのような遺伝子異常があるのか、結石非合併例では遺伝子異常が異なるのかどうか、については解明されていない。本研究ではこれらの点を明らかにすることを目的とし、APC-Wnt signaling pathwayと、DNAミスマッチ修復遺伝子異常による replication error pathwayが肝内結石合併および非合併肝内胆管癌の発生に関与しているかどうかを検討した。

B. 研究方法

外科切除ホルマリン固定材料の肝内結石合併肝内胆管癌7例、結石非合併肝内胆管癌13例を対象とした。

APC-Wnt signaling pathwayの関与については、

APC癌抑制遺伝子異常により生じるとされる β -catenin蛋白の異常蓄積を、replication error pathwayの関与については、DNAミスマッチ修復遺伝子hMLH1とhMSH2の蛋白発現消失を指標とし、それぞれを免疫組織学的に検索した。 β -catenin蛋白の異常蓄積検索にはモノクローナル抗体17C2を、hMLH1とhMSH2の蛋白発現消失の検索にはモノクローナル抗体13291AとNCL-MSH2を用いた。

なお、個人識別情報秘守のため、対象症例は全て通し番号として表記した。また対象は外科切除標本であり、本研究により対象者の健康および生命に対する危険性は全くない。

C. 研究結果

① β -catenin蛋白の異常蓄積

APC異常による β -catenin蛋白の異常蓄積は、免疫組織学的には同蛋白の核内染色陽性として同定される。核内染色陽性例は、肝内結石合併例で0/7、非合併例で3/13（23.1%）であり、両者に有意差はなかった。

②ミスマッチ修復遺伝子蛋白の消失

結石合併・非合併例ともに、hMLH1蛋白の消失例はなかった。hMSH2蛋白の部分消失は、結石合併例の1/7 (14.3%)、非合併例の4/13 (30.8%) にみられたが、両者間に有意差はなかった。

D. 考察

APC-Wnt signaling pathwayとreplication error pathwayは、大腸癌の発生に関わる2つの遺伝子経路として知られている。肝内結石合併肝内胆管癌の発生と同様に慢性持続性炎症粘膜を背景に発生する潰瘍性大腸炎合併癌では、炎症性腸疾患非併存大腸癌に比べAPC-Wnt signaling pathwayの関与が低いと報告されている。

本研究結果では、検討症例数が少数であることもあり統計的有意差は得られなかったが、結石非合併肝内胆管癌の発生にはAPC-Wnt signaling pathwayが関与している可能性が示唆されたのに対し、結石合併例での同経路の関与はきわめて低いと推定される。一方、replication error pathwayは結石合併・非合併例に共通してhMSH2異常が関与している可能性が推定される。今後は、ミスマッチ修復遺伝子異常をMSIで確認すると同時に、hMSH2蛋白の消失がgeneticなものかepigeneticなものかを明らかにするため、hMSH2遺伝子のpromoter領域のmethylationの有無を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

肝内結石合併・非合併に関わらず、肝内胆管癌の発生にはミスマッチ修復遺伝子hMSH2の異常が関与している可能性がある。APC-Wnt signaling

pathwayの関与は結石合併・非合併例で異なり、後者のみに関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Tanabe T, Ajioka Y et al
Immunohistochemically detected micrometastasis in lymph nodes from superficial esophageal squamous cell carcinoma
J Surg Oncology 82 : 153-159, 2003

Wakai T, Ajioka Y et al
Depth of subserosal invasion predicts long-term survival after resection in patients with T2 gallbladder carcinoma
Ann Surg Oncology 10 : 447-454, 2003

Komori K, Ajioka Y et al
Proliferation kinetics and apoptosis of serrated adenoma of the colorectum
Pathology Int 53 : 277-283, 2003

Nishikura K, Ajioka Y et al
Carcinogenesis of gastric endocrine cell carcinoma : analysis of histopathology and p53 gene alteration
Gastric Cancer 6 : 203-209, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

胆汁酸トランスポーターの発現と転写調節機構、 発癌・癌細胞増殖・浸潤への関与

分担研究者 海野倫明

東北大学病院 肝胆膵外科

研究要旨

我々はこれまで胆汁酸のトランスポーター研究を進めてきており、多くの新規有機アニオントランスポーターを世界に先駆け単離、報告してきた。その一つHuman Liver Specific organic anion Transporter-2 (LST-2/OATP8/SLCO1B3) は、胆汁酸をはじめ、ホルモン、エイコサノイド、抗癌剤Methotrexate (MTX) 等多様な基質を細胞内に輸送する。正常では肝細胞類洞側膜に限局して発現しているが、さらに単離されたクローンが肝臓のみならず各種臓器での多様な基質認識性、ホルモン分泌への関与など、全身において多様な役割を果たしていることを明らかにした。近年、胆汁酸はこれまでその基質や機能が不明であったFXR (farnesoid X receptor) 等核内受容体と結合し、自らの輸送・合成に関与する遺伝子群の転写調節を行うことが明らかとなり、胆汁酸の生理活性物質としての役割が注目されている。

肝内結石症に伴う、胆汁うっ滞、胆管癌発生機序の解明を目指し、LST-2の肝細胞における転写調節機構、臨床検体を用いて胆管癌での発現を明らかにした。癌細胞における増殖・浸潤への関与、さらには胆汁酸発癌のメカニズムにせまる最近の知見を含め、本年度の研究成果として報告する。

A. 研究目的

胆汁酸研究は肝臓における胆汁酸の取り込みの研究からスタートしたといっても過言ではなく、胆汁酸を輸送するトランスポーターの発見により、勢力的に行われてきた。肝臓は生体内で最も多様な代謝機能と血中から内因・外因性物質を胆汁へ排除する機構を司り、生体内の恒常性維持に欠くべからざる重要な役割を果たしている。この排出機能は胆汁酸や各種薬物を含む有機アニオンとある種の有機カチオンの排出にも深く関与している。胆汁酸は消化管のトランスポーターにより血中に効率よく再吸収され、再び肝細胞に吸収されるという、いわゆる「腸肝循環」を受けている。この第一段階として血中からの胆汁酸の取り込み機構が肝類洞側の肝細胞膜上に存在しており、近年の分子生物学の進歩によりその機構が各種トランスポーターによって構成されて

いることが解明されてきた。申請者らは長年にわたり、この胆汁酸トランスポーターを数多く単離し報告してきた。(Proc. Natl. Acad. Sci. USA2004, J. Bio. Chem. 1998 / 1999 / 2002, Gastroenterol. 1999 / 2001 / 2002, BBRC 2000, FEBS Lett. 1999, Endocrinol. 2001, Mol. Endocrinol. 2003, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001-1/2001-2/2001-3, 総説：蛋白質核酸酵素2001, Trend in Endocrinol Metabolism)

さらに単離されたクローンが肝臓のみならず各種臓器での多様な基質認識性、ホルモン分泌への関与など、全身において多様な役割を果たしていることを明らかにした。近年、胆汁酸はこれまでその基質や機能が不明であったFXR (farnesoid X receptor) 等核内レセプターと結合し、自らの輸送・合成に関与する遺伝子群の転写調節を行うことが明らかとなり、胆汁酸の生理活性物質としての役割が注目されている。一方、cyclooxygenase-2(COX-2) は各種

サイトカインなどの生理活性物質の刺激により誘導され、癌細胞の発生・増殖・進展との関係も示唆されている。

近年、我々が単離したヒト肝臓のみに限局して発現し、肝臓の多様な代謝機能を反映するように胆汁酸をはじめステロイドホルモンやエイコサノイド等多様な基質認識性を有する有機アニオントランスポーター liver-specific organic anion transporter-1 (LST-1/OATP-C/*SLCO1B1*) に相同性を有するサブタイプLST-2/OATP8/*SLCO1B3*は、正常臓器では中心静脈周囲肝細胞類洞側膜に限局しておりLST-1の数十分の1程度の発現量であるが、多くの消化器癌細胞で著明に発現している特徴を持つ。

今回、このLST-2の肝細胞における転写調節機構、癌細胞での発現を明らかにし、現在、癌細胞増殖・浸潤への関与、さらに胆汁酸発癌のメカニズムを探索しており、これまでの研究成果をここに報告する。

B. 研究方法

研究方法は次項「C. 研究結果と考察」とともに記す。

また、各遺伝子の正常臓器での分布・発現を分子生物学的に検討するにあたり、市販の調整済サンプルを用いた。臨床検体はすべて東北大学倫理委員会に申請し承認を受け（承認番号：2001-002）、かつ患者様から同意書を得たもので、個人が特定できないように配慮され、プライバシーは厳重に管理されており、倫理的な問題は発生しない。

C. 研究結果 D. 考察 E. 結論

1. ヒト肝臓におけるLST-2の転写調節機構

肝臓は生体内で最も多彩な代謝機能を有し、生体のホメオスターシスに極めて重要な働きをしていると考えられることから、多彩な物質を細胞内に輸送するトランスポーターの各種病態時における発現の変化とその意義は極めて興味深い。

これまでの我々の検討にて、ヒト肝臓特異的有機アニオントランスポーターLST-1 (Abe T, et al. *J.*

Bio. Chem. 1999) のラットにおけるカウンターパートrlst-1/oatp4/*slco1b2*の胆管結紮モデルでの発現の経時的变化をNorthern blot法にて検討したところ、rlst-1のmRNAは胆管結紮後、著明に減少することが示された。このことより、胆汁うっ滞時、血中胆汁酸が高濃度の環境下でrlst-1の発現はmRNAレベルで抑制されていることを報告した。

そこで我々は今回、臓器特異的発現を有し、肝臓の機能に重要な役割を担っていると考えられるLST-2の転写調節機構を探るとともに、胆汁うっ滞といった病態時にその発現がどのように変化するのか、また、一連の胆汁酸代謝のなかでどのような役割を担うのか探るべく研究を遂行した。

LST-2 5'上流域を単離し、プロモーター領域の詳細な検討をおこなった。LST-2の転写活性には、転写開始点より上流域に存在する、farnesol X receptor (FXR)、hepatocyte nuclear factor 3 β (HNF3 β)、hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α)の認識配列それぞれがきわめて重要であることを明らかにした。LST-2の転写活性化機構の中で、FXR、HNF3 β 、HNF1 α の3つの転写因子がきわめて重要な役割を担っていることを示した。肝臓での、臓器特異的な遺伝子の発現に、数種類の肝臓に豊富に存在する転写因子 (Liver Enriched transcriptional families; LETFs) が深く関与することがいわれている。HNF1 α 、HNF3 β はいずれもLETFsの転写因子とされており、これら2つの転写因子が、LST-2の肝臓における特異的な発現に極めて重要であると考えられた。さらに、胆汁酸のLST-2転写におよぼす影響を調べるため、各種胆汁酸を添加した際の転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイで検討した。ケノデオキシコール酸 (CDCA)、デオキシコール酸 (DCA) を100 μ Mで加えるとルシフェラーゼ活性が著明に上昇するが、vector上でFXRの結合配列にmutationを入れると、活性の上昇は認められなくなることから、LST-2は胆汁酸によりFXRを介して転写が活性化されることを証明した。正常肝細胞における胆汁酸の、LST-2の発現に及ぼす影響を検討するため、正常肝細胞由来細胞株をもちい、Northern blot法、およびWestern

blot法を行った。胆汁酸の細胞培養液中への添加により、LST-2の発現がmRNAレベル、タンパク質レベルで増加することを確認した。この結果は、肝特異的有機アニオントランスポーター LST-2の臓器特異的発現のメカニズムにひとつの可能性を見いだした。さらにその輸送基質の一つであるCDCAやDCAにより、転写が活性化することを明らかにし、肝細胞における胆汁酸代謝においてLST-2がきわめて重要な役割を果たしている可能性を考察した。

前述の如く、胆汁酸代謝に関わる様々な遺伝子発現が各種核内レセプターを介し胆汁酸自身により調節をされているとの報告が散見される。取り込み側のトランスポーターであるNa⁺/taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) はFXRによりdown regulateされ、排泄側のトランスポーターbile salt export pump (BSEP) はup regulateされると考えられている。また、胆汁酸生合成における律速酵素であるCYP7A1やCYP27A1は胆汁酸によりdown regulateを受けると報告されている。また、FXRの関与は不明であるが、ヒトLST-1のラットカウンターパートであるrlst-1の胆管結紮モデルにおける発現は著明に低下する。以上より細胞外に胆汁酸が高濃度に存在する環境下においては、胆汁酸の生合成と取り込みは抑えられ、排泄は促進される。これは胆汁酸の持つ細胞内毒性を考えると合目的な転写調節といえる。しかしながら、LST-2は、取り込み側のトランスポーターでありながら、CDCAやDCAといった胆汁酸の存在下で、mRNAレベルで発現が増加することが明らかとなった。すなわち、胆汁うっ滞時、細胞外胆汁酸濃度が高い環境下でLST-2の発現は増加し、これは取り込み側のトランスポーターとして極めて特徴的なLST-2の性質と考えられる。他の取り込み側のトランスポーターがdown regulateされる中で、LST-2の発現は増加することがどのような意味をもつのか、大変興味深い。(Otsuka H, et al. in press)

2. LST-2の癌特異的発現と癌細胞における増殖・浸潤への関与

LST-2は、正常臓器では中心静脈周囲肝細胞類洞

側膜に局限しておりLST-1の数十分の1程度の発現量であるが、多くの消化器癌細胞で著明に発現している特徴を持ち、さらには抗癌剤MTXはLST-2の輸送基質となり、in vitroにおいてLST-2が消化器癌におけるMTXに対する感受性を決定しているトランスポーターであることを報告した (Unno M, Onogawa T, et al. Gastroenterol 2001)。さらに臨床の場でMTXを用いる乳癌に着目し、乳癌細胞株でのin vitro及びマウス皮下腫瘍モデルでのin vivoの実験にて同様の感受性があることを証明し、アデノウイルス強制発現系による遺伝子治療の可能性を報告した。しかしながら、各種癌細胞におけるLST-2発現の意義やメカニズムは不明である。

そこで、まず動物実験でMTX感受性が証明された、乳癌臨床検体を用いてLST-2の癌特異的発現と臨床病理学的因子との相関を検討した。

予後の明らかな (平均観察期間106か月) 本学乳癌症例102例にLST-2特異的抗体で免疫組織化学を施行、浸潤部での陽性細胞10%以上を陽性とした。

102例中51症例の癌細胞膜に陽性、正常乳腺は陰性であった。LST-2陽性症例は有意に生存率が高く (p=0.0004)、再発も少ない (p=0.0138) ことが明らかになった。またLST-2 immunoreactivityは、臨床病理学的因子のうち腫瘍径や増殖関連抗原Ki-67、リンパ節転移と逆相関を示した。さらに他の乳癌予後因子との単多変量解析にてLST-2 immunoreactivityはリンパ節転移と並びかつHER2/neuや腫瘍径等を越える独立予後規定因子になりうる事が判明した。(p=0.0031)

よって、LST-2は癌細胞増殖進展を何らかの局面で制御する可能性があり、新たな分子標的治療の可能性が示唆された。

これまで胃癌・大腸癌・膵癌等各種消化器癌にてLST-2を確認しているが、今回、胆管癌についても約半数の症例に発現を認めた。現在、胆管癌症例約100例に関して臨床病理学的因子の検討を進めている。

(Onogawa T et. al. in press)

3. 胆汁酸発癌機構の解析～COX-2の転写調節機

構～

cyclooxygenase-2(COX-2) は各種サイトカインなどの生理活性物質の刺激により誘導され、癌細胞の発生・増殖・進展との関係が示唆されている。LST-2は大腸癌・膵癌・胃癌・胆管癌に発現しており、COX-2同様、癌細胞の増殖・進展への関与が示唆されている。また胆汁酸による発癌や癌の進展が示唆されているが、胆汁酸の輸送や標的分子などの機序は不明である。そこで、LST-2の輸送する胆汁酸によるCOX-2遺伝子の転写調節への関与を検討した。LST-2、COX-2を発現しているヒト大腸癌細胞由来培養細胞株HCT116を解析に用いた。ルシフェラーゼアッセイにて各種胆汁酸添加およびトランスポーター発現の有無によるCOX-2遺伝子転写活性化機構を検討した。CDCA、DCA、リトコール酸(LCA)添加でCOX-2遺伝子転写活性の上昇を認めた。一方、タウロコール酸(TCA)、コール酸(CA)では転写活性は上昇しなかった。LST-2非発現細胞にLST-2強発現アデノウイルスにてLST-2を発現させた場合、胆汁酸添加後のCOX-2遺伝子転写活性の有意な上昇を認めた。Northern blot法で胆汁酸濃度依存性のCOX-2のmRNAの増加を認め、LST-2の発現も認められた。胆汁酸反応性転写因子にてGel shift assay施行し胆汁酸濃度依存性のDNA binding proteinの存在が示唆された。PPARモノクロナール抗体添加によるsuper shift assay施行にてspecific bandの消失を認めた。PPAR α の特異的合成Ligand(WY14643)添加にてルシフェラーゼ活性の上昇を認め、特異的阻害剤(BADGE)添加にてLCA添加によるCOX-2ルシフェラーゼ活性の上昇を阻害剤濃度依存的に抑制した。

以上より、胆汁酸トランスポーターLST-2は、胆汁酸を細胞内に輸送することによりCOX-2の転写活性を上昇させる重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに細胞内に輸送されたLCAは核内レセプターPPAR α と直接結合することにより、生理活性物質として自身がCOX-2転写誘導に関与していると考えられた。よって、これらの基序により胆汁酸トランスポーターLST-2は大腸癌の胆汁酸発癌や癌の進展に関与すること、さら

にはPPAR α をtargetとする遺伝子治療への応用の可能性が示唆された。

(Ohshio et. al. in press)

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, Chaki T, Masuda S, Tokui T, Eto N, Abe M, Satoh F, Unno M, Hishinuma T, Inui K, Ito S, Goto J, Abe T. Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 101 (10) : 3569-74. 2004
- 2) Sasaki T, Katayose Y, Suzuki M, Yamamoto K, Shiraso S, Mizuma M, Unno M, Takeuchi H, Lee CT, Matsuno S. Adenovirus expressing mutant p27^{kip1} enhanced apoptosis against cholangiocarcinoma than adenovirus-p27^{kip1} wild type. *Hepatogastroenterology.* ; 51 (55) : 68-75. 2004
- 3) Yamamoto K, Katayose Y, Suzuki M, Unno M, Sasaki T, Mizuma M, Shiraso S, Ohtuka H, Cowan KH, Seth P, Matsuno S. Adenovirus expressing p27^{kip1} induces apoptosis against cholangiocarcinoma cells by triggering Fas ligand on the cell surface. *Hepatogastroenterology.* ; 50 (54) : 1847-53. 2003
- 4) Hayashi H, Asano R, Tsumoto K, Katayose Y, Suzuki M, Unno M, Kodama H, Takemura SI, Yoshida H, Makabe K, Imai K, Matsuno S, Kumagai I, Kudo T. A highly effective and stable bispecific diabody for cancer immunotherapy: cure of xenografted tumors by bispecific

- diabody and T-LAK cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2003
- 5) Adachi H, Suzuki T, Abe M, Asano N, Mizutamari H, Tanemoto M, Nishio T, Onogawa T, Toyohara T, Kasai S, Satoh F, Suzuki M, Tokui T, Unno M, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T. Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 285 (6) : F1188-97. 2003
- 6) Ito A, Yamaguchi K, Tomita H, Suzuki T, Onogawa T, Sato T, Mizutamari H, Mikkaichi T, Nishio T, Suzuki T, Unno M, Sasano H, Abe T, Tamai M. Distribution of rat organic anion transporting polypeptide-E (oatp-E) in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 44 (11) : 4877-84. 2003
- 7) Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, Abe M, Satoh F, Unno M, Nunoki K, Suzuki M, Hishinuma T, Goto J, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T. Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol Endocrinol.*; 17 (7) : 1203-15. 2003
- 8) Yoshida H, Katayose Y, Unno M, Suzuki M, Kodama H, Takemura S, Asano R, Hayashi H, Yamamoto K, Matsuno S, Kudo T. A novel adenovirus expressing human 4-1BB ligand enhances antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.*; 52 (2) : 97-106. 2003
- 9) Sato K, Sugawara J, Sato T, Mizutamari H, Suzuki T, Ito A, Mikkaichi T, Onogawa T, Tanemoto M, Unno M, Abe T, Okamura K. Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta. *Placenta.*; 24 (2-3) : 144-8. 2003
- 10) Unno M, Abe T Similarity and dissimilarity of LST-1/OATP 2/OATP-C (*SLC21A6*) and OATP8/LST-2(*SLC21A8*) *J Gastroenterol.*; 138 : 108-109. 2003
- 11) 大塩 博, 鈴木正徳, 海野倫明, 片寄 友, 力山敏樹, 竹内丙午, 柿田徹也, 小野川徹, 水間正道, 白相 悟, 竹内丙午, 松野正紀: 直接膵浸潤が術前MPR-CT画像上確認された中下部胆管癌の1切除例. *胆と膵*; 24 (6) : 465-469 2003
- 12) 海野倫明: 新しい視点 特集: 「胆汁酸トランスポーターの最新情報」 肝胆道疾患における異常様相. *たんじゅうさん*; 2 (1) : 12-13 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 許取取得

- 1) 特許出願番号 平11-156750 : 肝臓に発現している新規トランスポーター遺伝子 (LST-1)
 - 2) 特許出願番号2002-227543 : 癌細胞内部への抗癌剤の選択的輸送組成物
 - 3) 特許出願番号2002-228131 : 腎臓の薬物排泄機能に関する有機アニオントランスポーター
- 以上

ラット胆管上皮に対するアデノウイルスベクターを用いたp53遺伝子導入

研究協力者 本田和男

愛媛大学医学部 第一外科

研究要旨

肝内結石症の治療抵抗因子の一つである胆管狭窄に対してアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入療法の可能性を検討した。ラット胆管炎モデルを作成しヒトp53遺伝子を過剰発現させ胆管の増殖性変化を比較検討した。

ラット胆管炎モデル作成時に経乳頭的に胆管にアデノウイルスベクター（AxCAhp53, AxCALacZ）を 3×10^8 P.F.U.投与した。投与後3、7日目にラットを犠牲死させ胆管組織を採取した。抗ヒトp53抗体を用いて免疫染色を行うと、AxCAhp53投与群では胆管上皮にヒトp53蛋白の発現が認められた。

術後7日目の胆管壁を測定すると、AxCAhp53投与群は、AxCALacZ投与群、生理食塩水投与群と比較して有意に胆管壁の増殖抑制効果が認められた。Ki-67 Labeling Indexはそれぞれ20.7%、34.4%、37.4%とAxCAhp53投与群が有意に低値であった。

アデノウイルスベクターにより導入されたp53は、ラット胆管炎モデルにおいて胆管の増殖性変化を有意に抑制した。

A. 研究目的

肝内結石症における増殖性胆管炎により胆管壁が肥厚し結石周囲において相対的に胆管が狭窄している状態では、慢性の胆汁うっ滞や胆道の細菌感染が反復していると考えられている。このようなストレス下では、胆管上皮細胞のDNAが傷害され胆管上皮が変性し、過剰な増殖が起こり、さらには発癌へとつながる可能性が示唆されている。事実、厚生省特定疾患「肝内結石症調査研究班」¹⁾の肝内結石症の全国疫学調査（平成7年度報告書）において肝内結石症患者の肝内胆管癌の合併頻度は約5%と報告されていて、健常人に比して著しく高率であり、肝内結石症患者の主たる死因となっている。

癌抑制遺伝子として知られているP53は正常細胞においてはごく微量の発現のみであるが、DNA損傷、ウイルス感染、サイトカイン刺激、低酸素状態

などの各種の生体ストレスにさらされた場合には、転写活性をもつようになり、ある場合にはp21などの発現を誘導してRBのリン酸化を阻害することにより細胞をG1期に止め、別の場合にはアポトーシスを誘導して細胞死をおこす。

遺伝子導入のために開発されたアデノウイルスベクターは、その他のベクターに比較して導入効率が良いことが知られているが、血中に投与された場合には肝細胞に親和性が高く、特にマウスやラットでは発現の95%以上は肝臓で起こり、他の臓器での発現はほとんどみられない。

遺伝子導入のためベクターを目的とする局所に導入するには、直接注射法、血管内投与して一定時間血行遮断し局所に感染させるなどの方法が取られるが、直接胆汁中に投与し胆管に遺伝子導入した報告は、活性型のヒトRb遺伝子を組み込んだAdRbベクターを使用²⁾した例を認めるのみで非常に少ない。

我々は、肝内結石症の治療抵抗因子である増殖性胆管炎を抑制することを目的として、アデノウイルスベクターを用いてラット胆管炎モデルの胆管にヒトp53遺伝子を選択的に導入し、その発現したp53の胆管増殖抑制効果を定量的に解析した。

B. 研究方法

1. ラット胆管炎モデルの作製

体重230~250グラムの雄のWistarラットを使用した。ラットをエーテルで麻酔し正中切開創から十二指腸を露出した。十二指腸壁に小切開をおき、経乳頭的に5-0ナイロン糸を胆管に挿入し、このナイロン糸をガイドとして胆管にポリエチレンチューブ (inner diameter, 0.28mm ; Becton Dickinson, Sparks, MD) を挿入した。このポリエチレンチューブよりアデノウイルスベクター、および生理食塩水を注入した。その後、ナイロン糸を再度挿入しチューブを抜去、ナイロン糸の片方を十二指腸壁に固定し胆管内にナイロン糸を留置した。切開した十二指腸を縫合閉鎖し腹壁に固定した。その結果、異物の物理的刺激と乳頭の機能不全のため、胆管壁の肥厚と腺の増生を示す組織像をもつ胆管炎モデル^{3) 4)}が作成された。

2. アデノウイルスベクターによる遺伝子の導入と発現

本実験で使用したアデノウイルスベクターはCOS-TPC法⁵⁾により作製されたAxCAhp53、AxCALacZの2種類を使用した。

AxCAhp53はアデノウイルス5型のウィルスゲノムのE1A、E1B、E3の遺伝子領域を削除しCAGプロモーターとヒトのcDNAよりつくられたp53遺伝子を組み込んでいる。一方AxCALacZはp53遺伝子の代わりにBeta-galactosidaseを組み込んでありコントロールとして使用した。AxCAhp53は札幌医科大学医学部分子医学研究部門の濱田洋文教授、AxCALacZは東京大学医科学研究所の斎藤泉教授より供与を受け、理化学研究所遺伝子材料開発室より分譲された。

このウィルスを大量調整し、RCA⁶⁾混入が無いことを確認、精製、力価を測定し⁷⁾使用した。

さらにp53蛋白が発現されていることを確認するため、胆管炎モデル群、AxCAhp53投与群、AxCALacZ投与群のラット胆管を術後7日目に採取し抗ヒトp53抗体 (DO-7、Mouse Monoclonal Anti-Human、DAKO) を用い、ダコLSAB法 (希釈倍率 1:50) を用いて免疫染色を施行した。

3. p53遺伝子導入による胆管壁増殖抑制効果の検討

ラット胆管炎モデル作成時に十二指腸から経乳頭的に直接胆管 (胆汁) 内にアデノウイルスベクター (AxCAhp53, AxCALacZ) を 3×10^6 plaque-forming units (PFU)、0.3ml注入し15分間静置した。アデノウイルス投与後は5-0ナイロン糸を再挿入、留置固定した。投与されたアデノウイルスベクターにより、それぞれAxCAhp53投与群、AxCALacZ投与群に分類した。さらにコントロールとしてアデノウイルスベクターの代わりに生理食塩水を投与したグループを生理食塩水投与群とした。

アデノウイルス投与後3、7日目にラットを犠牲死させ肝臓と総胆管を採取しHE染色を行った。Water乳頭から2.5、5.0、7.5、10.0、12.5mmの5つのスライスでラット胆管壁の厚さをOlympus BX50とImage-Pro Plusを用いて測定した。

この5つのスライス標本での胆管壁の最大の厚さの部位の平均値をMaxとした。

胆管壁は壁の厚さが均一ではないため、まず壁の最大の厚さの部位を決めその対角線上の壁の厚さと、その対角線上で内腔の中心に直角に交わる線上の壁の厚さ計4カ所の平均値を求めMeanとし、3群間で比較検討した。

4. Ki-67 Labeling Index

細胞の増殖マーカーであるKi-67抗原に対する抗Ki-67抗体 (Mouse Monoclonal Anti-Rat、DAKO) を用い、ダコLSAB 2キットを用いて免疫染色を施行した。

胆管内皮細胞をそれぞれ約1000個数え、その陽性

率をlabeling indexとして求め、胆管内皮細胞の増殖をAxCAhp53投与群、AxCALacZ投与群、生理食塩水投与群で比較検討した。

C. 研究結果 D. 考察

1. p53の免疫組織学的染色

抗ヒトp53抗体による免疫組織化学的染色検査では、図1cに示すようにAxCAhp53投与群において、主に胆管上皮ならびに増生粘液腺の腺上皮の細胞質にヒトp53蛋白の発現が認められた。生理食塩水投与群(図1a)、AxCALacZ群(図1b)においてはp53蛋白の発現は認められなかった。

2. p53遺伝子導入による胆管壁増殖抑制効果の検討

生理食塩水投与後1週間ナイロン糸を留置されたラット胆管の上皮は正常胆管と比較して粘液腺と胆管付属腺の著しい増生をきたし、胆管壁自体も線維芽細胞の増殖により著しい肥厚をきたしていた。(図2)

AxCAhp53投与群(図4)では生理食塩水投与群、AxCALacZ投与群(図3)と比較して胆管上皮の増殖が抑制され増生粘液腺が減少していると思われた。

術後3日目の胆管壁の厚さの平均値(Mean)はAxCAhp53投与群、AxCALacZ投与群、生理食塩水投与群の三群間でそれぞれ $203.5 \pm 26.6 \mu\text{m}$ 、 $224.7 \pm 52.5 \mu\text{m}$ 、 $272.0 \pm 48.9 \mu\text{m}$ でAxCAhp53投与群と生理食塩水投与群との間に有意差を認めるのみであった($p < 0.05$)。胆管壁の最大の厚みの平均値(Max)は、それぞれ $261.8 \pm 36.6 \mu\text{m}$ 、 $296.7 \pm 52.5 \mu\text{m}$ 、 $337.7 \pm 13.1 \mu\text{m}$ で三群間に有意差は認められなかった(図5)。

一方、術後7日目においては平均値(Mean)はAxCAhp53群 $343.2 \pm 14.0 \mu\text{m}$ 、AxCALacZ群 $446.5 \pm 25.3 \mu\text{m}$ 、生理食塩水投与群 $447.1 \pm 53.4 \mu\text{m}$ で、AxCAhp53投与群は有意に胆管壁の増殖が抑制された($p < 0.05$)。胆管壁の最大の厚さの平均値(Max)においてもAxCAhp53投与群 $408.0 \pm 23.9 \mu$

m、AxCALacZ投与群 $650.0 \pm 49.3 \mu\text{m}$ 、生理食塩水投与群 $590.0 \pm 64.3 \mu\text{m}$ でAxCAhp53投与群は最大値においても有意に胆管壁の増殖抑制が認められた($p < 0.05$) (図6)。

3. Ki-67 Labeling Index

術後7日目に胆管を採取し抗ki-67抗体で免疫染色を行った(図7)。

AxCAhp53投与群 $20.7 \pm 5.6\%$ 、AxCALacZ投与群 $34.3 \pm 4\%$ 、uninfected group $37.4 \pm 3.9\%$ であり、AxCAhp53投与群は他の二群と比較して有意に低値であった($p < 0.05$) (図8)。

外来遺伝子を発現させるためにアデノウイルスベクターを用いる利点は、以下のとおりである。(I) 高力価のウイルスを調製でき、in vivoでの遺伝子導入が可能で目的細胞への高い導入効率を実現できる。(II) 外来遺伝子を発現させるために標的細胞の分裂増殖を必要とせず、増殖細胞だけでなく静止期の細胞にも導入できる。(III) ウィルスゲノムはほとんどが染色体外に存在するため、外来遺伝子の発現は一時的である。(IV) CAGプロモーター等の適切なプロモーターを用いて高い発現量を得られる。

アデノウイルスベクターを用いて細胞の増殖を抑制し狭窄を予防する試みは、血管における血管平滑筋細胞増殖抑制療法としてとして研究され、1995年にはChang等⁸⁾、ラット頸動脈、ブタ大腿動脈損傷モデルにヒトの活性型Rb遺伝子⁸⁾やヒトp21遺伝子を導入し細胞増殖抑制効果の有効性を報告⁹⁾しており、その他様々な遺伝子が導入され動物実験モデルに対しては良好な結果が得られている。

我々は正常ではほとんど発現が認められないp53遺伝子を過剰発現させることにより、ラット胆管炎モデルにおける胆管壁増殖抑制効果と発現を検討した。今回の実験において、胆管壁増殖抑制効果は投与後7日目では最大値、平均値とも有意差を認め、AxCAhp53投与による胆管壁増殖抑制効果を示した。しかし投与後3日目ではAxCAhp53投与群と生理食塩水投与群の胆管壁最大値でのみ有意差が認められた。これは術後3日目では胆管炎モデルにおいて胆管壁の増殖が軽度のため有意差が認められな

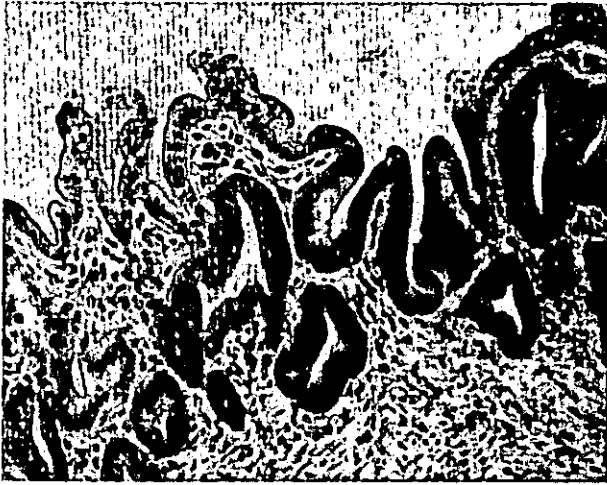


図 1 a

p53の免疫組織化学染色：生理食塩水投与群

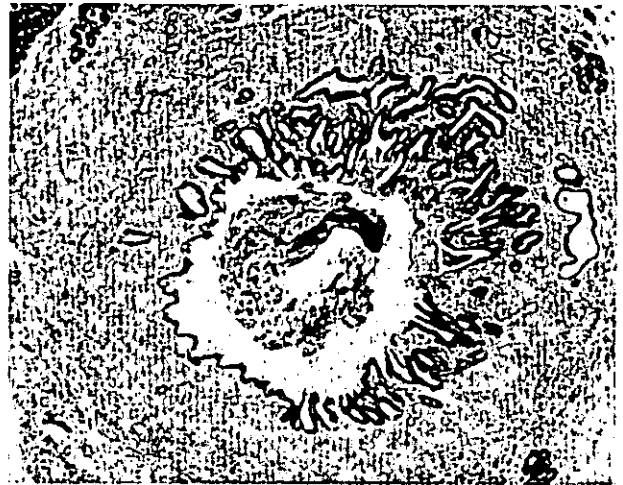


図 2

ナイロン糸留置1週間後の胆管壁

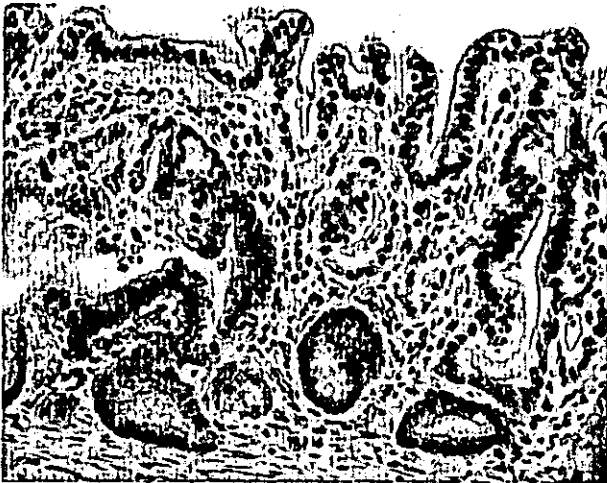


図 1 b

p53の免疫組織化学染色：AxCALacZ投与群



図 3

AxCALacZ投与群の胆管壁

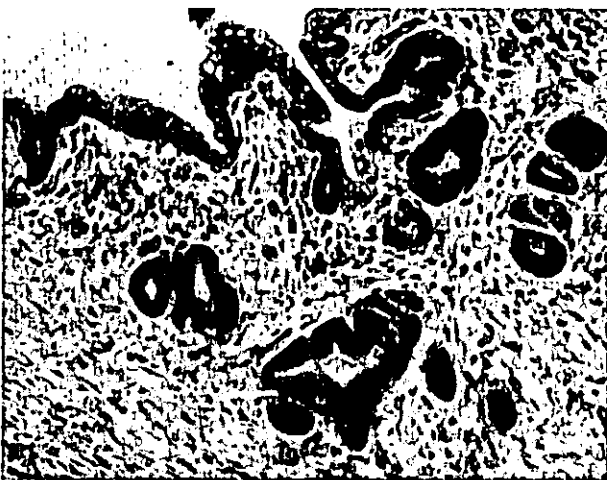


図 1 c

p53の免疫組織化学染色：AxCAhp53投与群

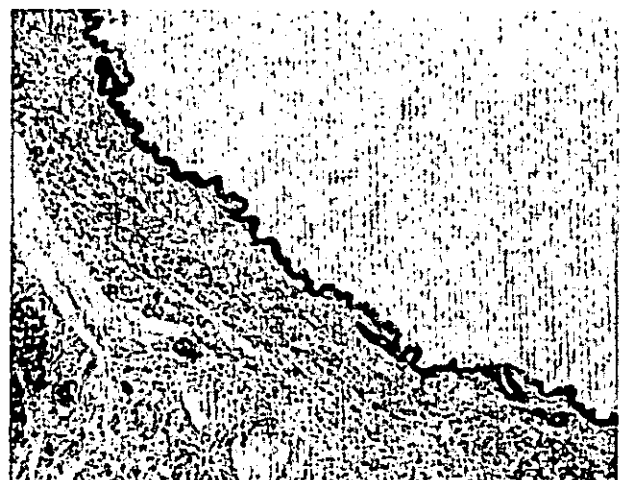


図 4

AxCAhp53投与群の胆管壁

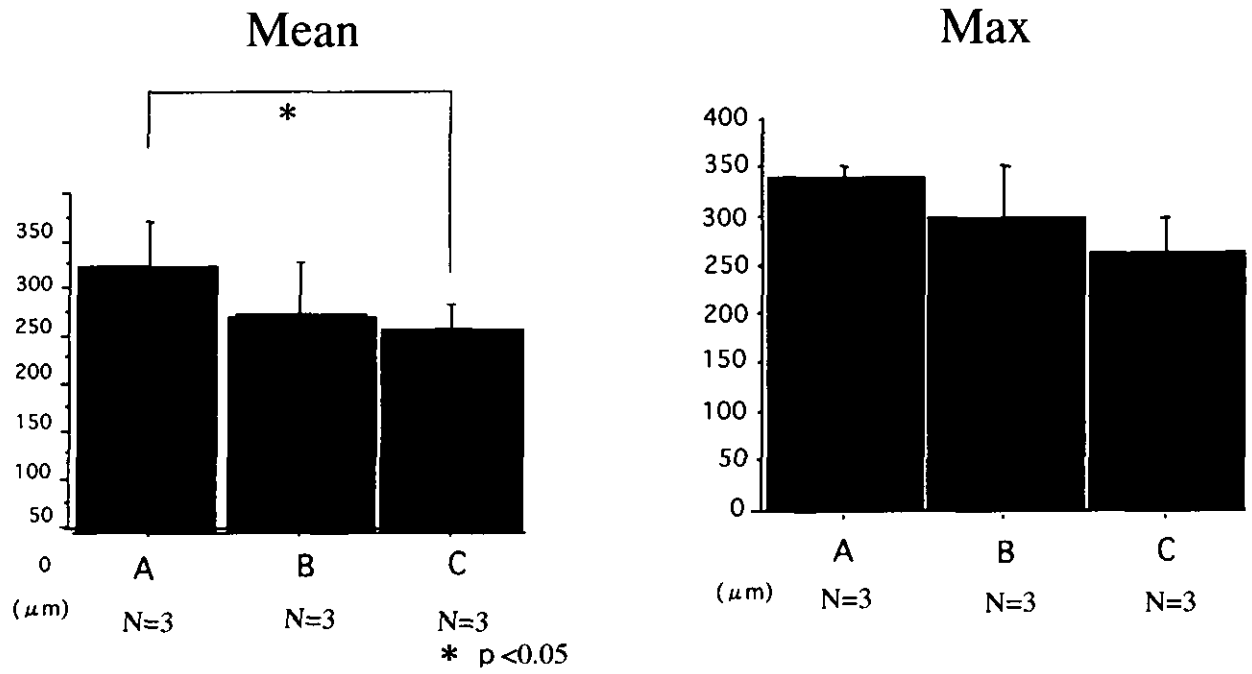


図 5

術後 3 日目のラット胆管壁の厚さの平均値 (Mean) と最大値 (Max)
 A: 生理食塩水投与群、B: AxCALacZ 投与群、C: AxCAhp53 投与群

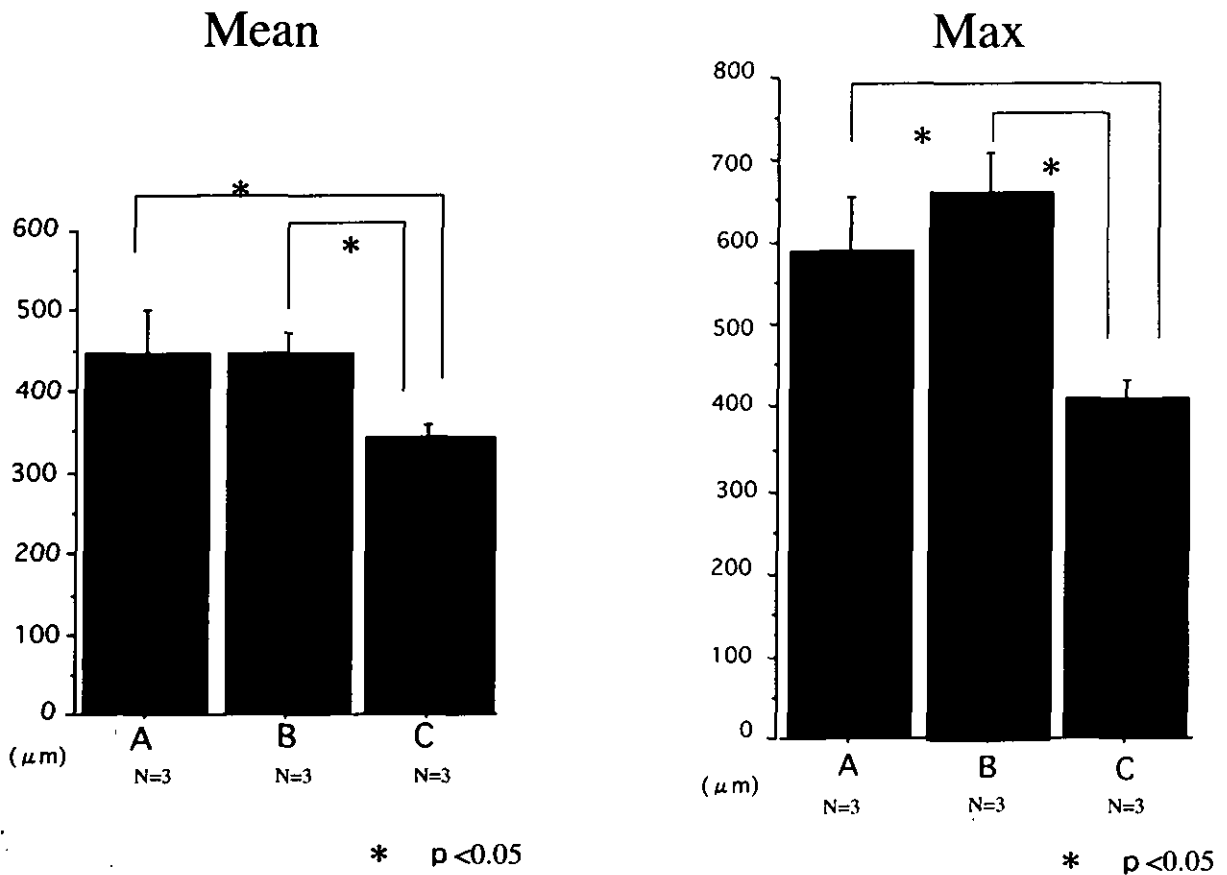


図 6

術後 7 日目のラット胆管壁の厚さの平均値 (Mean) と最大値 (Max)
 A: 生理食塩水投与群、B: AxCALacZ 投与群、C: AxCAhp53 投与群