

表1 肝内結石症手術症例数

年代	症例数
1961~1970	51
1971~1980	59
1981~1990	51
1991~2004	32
計	193

表2 遠隔成績

有効回答	肝切群:54/84 例	非肝切群:67/109 例
遠隔時死亡例	16 例(21.9%)	30 例(30%)
死因	肝癌:5例 肝硬変:3例 胆管癌:2例 その他:6例	胆管癌:5例 肝癌:2例 肝硬変:2例 肝膿瘍:2例 食道静脈瘤破裂:2例 肝不全:2例 化膿性胆管炎:1例 その他:14例

Fig.1

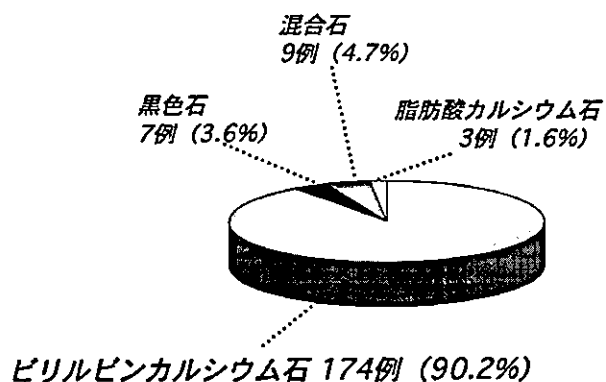


Fig.1 肝内結石症193例の結石種類

Fig.2

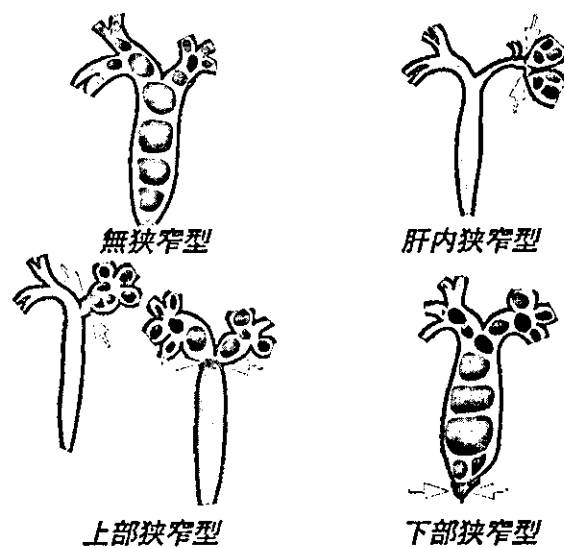


Fig.2 狭窄部位別による肝内結石症の病型分類

Fig.3

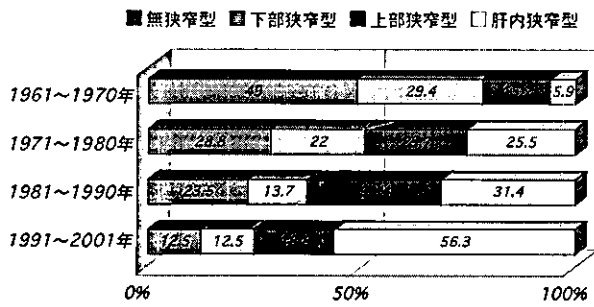


Fig.3 狭窄部位別による病型の時代変遷

Fig.4

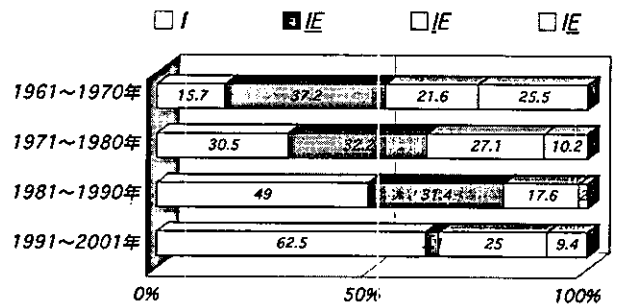


Fig.4 結石存在部位 (肝内外型) の時代変遷

Fig.5

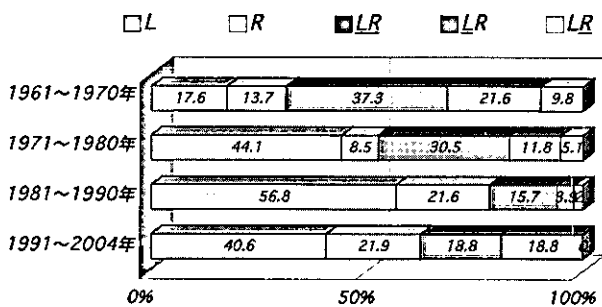


Fig.5 結石存在部位 (肝葉左右型) の時代変遷

Fig.6

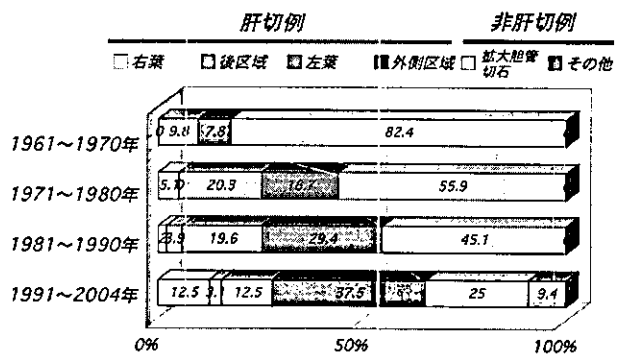


Fig.6 主術式の変遷

Fig.7

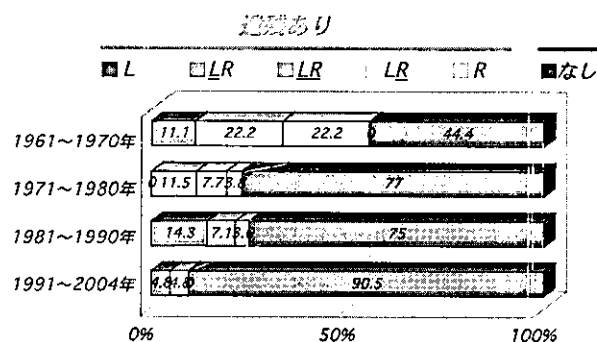


Fig.7 退院時遺残結石と所在部位 (肝切除例)

外型) が用いられるが、我々は以前より胆管狭窄の有無による分類を提唱してきた。すなわち図2に示されるように、狭窄所見が見当たらずびまん性に胆管が拡張した無狭窄型、肝内胆管に狭窄がその末梢が限局性に拡張している肝内狭窄型、左右肝管もしくは総肝管に狭窄が有り1側の肝内胆管あるいは両側の肝内胆管がびまん性に拡張している上部狭窄型、

下部胆管特に肝内胆管および十二指腸乳頭部に狭窄がある下部狭窄型の4型に分類している。

この4型に分類し、年次推移を検討してみると図2に示したように、無狭窄型や下部狭窄型などのいわゆる「積み上げ型」の肝内結石症症例が1960年代には51%と過半数を占めていたのに対し、近年は著明に減少した。その一方で、近年は肝内狭窄型、上

部狭窄型が増加し、特に1991年以降では肝内狭窄型が56.3%を占めるようになった。

結石所在部位別を肝内外別に見てみると、1960年代には肝内外型が84.3%を占めていたが、徐々に減少し、1990年代には肝内型が63.5%を占めていた。

肝葉左右別で検討すると、1960年代は左右両葉型(LR)が37.3%を占めていたが、1970年以降では左葉型(L)が44.1%と著明に増加し、1980年代には56.8%、1990年代には40.6%となった。L型、R型の片葉型は1960年代には31.3%、1970年代には52.6%、1980年代には78.4%、1991年以降では62.5%と増加傾向を示した。

4. 術式の変遷

術式の時代変遷についてみると、肝切除例は1960年代には17.6%と少数であったのに対し、1970年代では44.1%、1980年代では54.9%、1990年代では65.6%と著明に増加した。肝切除術の内訳をみると外側区域切除術が最も多く、次いで左葉切除と肝切除術は左葉に関連したものが大部分を占めていた。これらの結果は時代とともに片葉型あるいは肝内狭窄型が増加していることを反映していると思われた。一方、肝切除術の増加と逆相関して拡大胆管切開による切石術は減少傾向を示しているが、これには肝切除を必要としない症例においては内視鏡的切石術が多用されるようになってきたことも一因と考えられる。

5. 遺残結石と局在部位

肝切除術施行例における退院時の遺残結石の推移をみると、1970年代には過半数の症例に遺残結石が見られたが、時代とともに遺残結石の頻度は減少し、1991年以降はわずかに2例(9.5%)にみられたのみであった。これは、片葉型や肝内狭窄型の増加のみならず、診断技術あるいは内視鏡的切石術などの治療法の進歩によるところが大であると考えられる。

6. 遠隔成績

当科で手術を行った肝内結石症に対し遠隔成績の調査を行ったところ、121例(肝切除例54例、非肝切

例67例)から回答が得られた(有効回答率63%)。遠隔時死亡例は肝切除例で16例(21.9%)、非肝切除例で30例(30.0%)であった。死因は肝胆道系疾患によるものが60%程度を占めており、肝切除例では肝癌5例、肝硬変3例、胆管癌2例、その他6例であり、非肝切除例の死因は胆管癌が5例と最も多く、次いで肝癌、肝硬変、肝膿瘍、食道静脈瘤破裂、肝不全が各々2例、化膿性胆管炎1例、その他14例であった。肝切除例での肝癌による死亡例5例はいずれも手術時の輸血が原因と思われるウイルス性肝炎を基盤とする肝細胞癌の発生例であった。また遠隔時の胆管癌の合併頻度は5.8%であり、肝切除例では2例のみであったのに対し、非肝切除例では5例と胆管癌の発生が多く見られた。

また、本症における肝癌、胆管癌以外の胆道系疾患に起因する遠隔時死亡例の多くは、肝硬変またはそれに伴う肝不全によるものであり、その80%以上は70年代以前の症例であった。この時代は両葉型が多く、拡大胆管切石術に頼らざるを得ず、その結果十分な切石と胆汁鬱滞の解除が充分ではなかった可能性と、当時は肝切除成績が不良で肝切除施行に躊躇した症例も少なからず存在したことが、遠隔時の胆汁性肝硬変の原因となった可能性が考えられた。

D. 考察

肝内結石症はその結石種類の大部分がビリルビンカルシウム石であり、胆汁うっ滞に伴う細菌感染が成因であると考えられる。今回検討した1960年代から2004年にかけて、その症例数は若干減少しているが、最近の症例は他院で治療を行なった後の再発症例など特殊な症例が多く占めるようになってきている。

1960年代、1970年代には、いわゆる「積み上げ型」の肝内結石症症例が多く見られたが、最近になり著明に減少している。この原因として、積み上げ型肝内結石が完成する前に診断・治療を受ける症例が増加したこと、またESTなどに代表される経乳頭の治療法や、PTCSに代表される胆道鏡治療などの内視鏡治療が導入され、早期に切石術が施行され

るようになったことがあげられる。最近では胆管狭窄が無い症例や、ESTにより乳頭部狭窄が解除される症例に関しては、多くが内視鏡治療により完全切石され、外科治療が必要な症例が減少したものと考えられる。その一方で、1990年代以降の肝内結石症の半数以上は肝内型、片葉型であり、その治療法も肝葉切除が大部分を占めるようになってきた。その結果、遺残結石の割合も減少し、現在では遺残結石のある症例は10%以下となっている。

今回、遠隔成績を調査したところ、1960年代、1970年代の症例では、輸血に起因すると思われる肝炎、肝硬変、肝細胞癌の発生が、肝切群で5例、非肝切群で2例と多く見られた。当時の肝切除術の際にはほぼ全例が輸血を受けていたことから、輸血後肝炎から肝硬変、肝細胞癌の発症する症例が少なからず存在することが明らかとなった。当時は輸血後肝炎の実態が不明で、また肝切除術に伴う出血量が多かったため輸血はやむを得ないものであったと考えられるが、肝内結石症は良性疾患で長期生存が期待できる疾患であることから、輸血後肝炎に対する治療と肝細胞癌の早期発見に向けたきめ細かいフォローアップが今後も必要である。

一方、肝内結石症に高頻度で合併するといわれている胆管癌は、肝切除例で2例、非肝切除例では5例、計7例に見られた。肝内結石症は胆管癌、特に肝内胆管癌の好発群であることが判明しており、当科の成績も5.8%と高率であった。肝切群ではその頻度が低かったことから、肝内結石を有する萎縮した肝葉に対する積極的な肝切除の1つの根拠と考えられる。

また非肝切群では、食道静脈瘤破裂や肝不全などの肝硬変に起因する死亡が多く見られた。1960年代、1970年代の症例は、両葉型が多いため、拡大胆管切開術による切石に頼らざるを得なかった症例が多く、これらの症例が完全切石を得ることが出来ず、再発や胆汁うっ滞、胆管炎等により胆汁性肝硬変に移行

したものが多かった。

これらの結果から、肝内結石症に対する治療方針として、肝内狭窄型や上部狭窄型など、片葉型でかつ肝実質の萎縮が見られるものに対しては、胆管癌の発生母地を切除する肝切除術を積極的に施行することが、良好な遠隔成績をもたらすと考えられる。一方、現在では少なくなってきた両葉型、積み上げ型などは、まず内視鏡治療を先行させ、内視鏡的に完全切石が困難な場合、胆管狭窄が明らかな症例には、狭窄部切除を含めた肝切除術や拡大胆管切開術などの手術を考慮する方針としている。

E. 結論

1961年から2004年までの44年間に当科で経験した肝内結石症193例の病型・手術法・遠隔成績を年代別に検討した。年代の推移に伴い、両葉型、肝内外型が減少し、その一方で片葉型、肝内型の症例が増加しており、治療法として肝切除を選択する症例が著明に増加していた。遠隔調査では、胆道癌の合併が5.8%に見られた他、輸血に起因すると思われる肝細胞癌の合併、および肝硬変に関連する疾患により死亡する症例が多かった。本症の長期予後の改善には、結石の完全除去と積極的な肝切除による胆汁うっ滞肝の除去が必要不可欠であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

胆管癌に対する oncolytic gene therapy と double suicide gene therapy の同時応用

研究協力者 本田和男

愛媛大学医学部第一外科

研究要旨

肝内結石症の胆管癌合併頻度は約5%と報告されており、胆管癌が肝内結石症患者の主たる死因となっている。我々はアデノウイルスベクターを用いて胆管癌に対する遺伝子治療の可能性を検討した。

ヒト胆管癌細胞株HuCCT1に対してアデノウイルスAxCAUTを用いてuracil phosphoribosyltransferase (UPRT) 遺伝子とHSV-thymidine kinase (HSV-tk) 遺伝子を発現させ、培養細胞系と動物担癌モデルを使用して、5-FU、ganciclovir (GCV) の抗腫瘍効果を検討した。さらに癌選択的増殖型ウイルスに両遺伝子を組み込み (AxE1CAUT)、抗腫瘍効果を検討した。

培養胆管癌細胞では、5-FU、GCVの薬剤感受性はアデノウイルスAxCAUTのMOI数が増加するに伴い増強していた。さらに5-FU、GCVは単独投与よりも併用投与で、より薬剤感受性が増加していた。癌選択的増殖型ウイルスAxE1CAUTはMOI数の増加に伴い抗腫瘍効果を示した。

アデノウイルスAxCAUT投与皮下担癌モデルにおいても5-FU、GCVは単独投与群と比較して併用投与で抗腫瘍効果を示した。さらに腹膜播種モデルにおいて、AxE1CAUT投与群はAxCAUT投与群に比べより強力な抗腫瘍効果を示した。

胆管癌に対する自殺遺伝子療法の可能性は、UPRT/5-FU、HSV-tk/GCV等を複数組み合わせることにより、より有効な治療となる可能性が示された。

さらに癌選択的増殖アデノウイルスベクターAxE1CAUTを用いると、ウイルス自体の腫瘍融解作用に加えて薬剤感受性遺伝子を発現させることにより強力な抗腫瘍効果を示した。腹膜播種モデルで有効であったことから、ウイルスベクターを直接腫瘍内に投与しなくても臨床的に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝内結石症は東アジアではcommon diseaseのひとつであるが、胆管癌の合併率が高く、厚生省の特定疾患「肝内結石症調査研究班」によると肝内結石症患者の肝内胆管癌の合併頻度は約5%と報告されている。これは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。

胆管癌は胆管壁内に浸潤増殖し、自覚症状に乏しく早期に発見されるのは患者の約10%である。従って、発見時には根治手術困難な場合が多く、胆管癌

に対する化学療法や放射線療法の効果も乏しいため、5年生存率は10%、平均生存期間は1.5年と予後は不良である。

我々は前回の肝内結石症調査研究班において肝内結石症の治療抵抗因子の一つである胆管の良性狭窄に対して、アデノウイルスベクターを胆汁中に投与することによる遺伝子治療の可能性を検討した。今回我々は肝内結石症の予後規定因子の一つである胆管癌に対する、ウイルスベクターの胆汁中投与による遺伝子治療の可能性を検討した。

我々は、5-FUの感受性を高める大腸菌由来の

uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) 遺伝子と、ガンシクロビル (GCV) をリン酸化させDNA合成阻害薬として作用させる単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSV-tk) 遺伝子との作用機序の異なる2種類の遺伝子を、アデノウィルスベクターを用いて同時にヒトの胆管癌細胞株に導入し、細胞培養系と動物実験モデルで、5-FU、GCV投与による薬剤感受性を比較検討した。

これに加えて、さらに新しいoncolytic gene therapyの手法を応用した。胆管癌はp53、p16などの遺伝子の異常を示すことが多い。P53機能に障害を有する癌に対する治療として、tumor-specific replication能力を持つmutant virus (ONYX-015) を用いたoncolytic gene therapyが現在注目を浴びている。ONYX-015は、E1 B55K領域を欠如した変異アデノウィルスでありp53機能が正常な細胞では増殖しないが、p53機能異常を有する癌細胞内では増殖を繰り返し、癌細胞を破壊するreplication-selective oncolytic adenovirusである。我々はこのONYX-015と構造が類似したAxE1 AdBにUPRT、HSV-tk遺伝子を組み込んだアデノウィルスAxE1 CAUTを使用し、ヒト胆管癌細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。

B. 研究方法

1. Cell lines

ヒトの胆管癌細胞株であるHuCCT1は、Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) より入手した。このHuCCT1はmutated p53を持っており、5%CO₂下、10% Fetal Bovine Serum (FBS) 入りのRPMI 1640で継代培養した。ウィルスの増殖に必要なHuman embryonic kidney 293 cells (HEK-293) はthe American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手し、5%CO₂下、10% FBS入りのDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で継代培養した。

2. Recombinant Adenovirus

AxCAUTはコスミドベクター pAdex1cwのSwaI

のクローニングサイトに大腸菌のuracil phosphoribosyl transferase (UP)、HSVのthymidine kinase (tk) のcDNAを含むpCAUTとCAGプロモーター (cytomegalovirus enhancer, chicken β -promoter, rabbit β -globin polyA シグナル) を挿入し、AxCALacZは同様にコスミドベクター pAxcwitのSwaIのクローニングサイトに大腸菌の β ガラクトシダーゼのcDNAとCAGプロモーターを挿入して作製した。

AxE1 CAUTはpSK (Xh) E1 AdBのSalI/HindIIIにCAUTを挿入しpSKd (Xh) E1 AdB-CAUTを作製した。このDNAクローンをコスミドベクター pAdex1cwのSwaIのクローニングサイトに挿入して作製した。

3. In vitro 5-Fu and GCV sensitivity

ヒトの胆管癌細胞株であるHuCCT-1を96穴プレートに2x10³cell/wellの濃度で5%FBS入りのRPMI 1640培地にまき、AxCALacZ、AxCAUT、AxCAE1 UTをそれぞれ0.1、1、10、100 MOIで感染させた。24時間後に培地を0.001から1000 μ Mまでの様々の濃度の5-FU、GCVを含んだRPMI 1640 with 5% FBSに交換し、5%CO₂、37°Cで5日間培養した。

生細胞数はWST-1 assayを用いて測定した。WST-1 (Takara, Shiga, Japan) はテトラゾリウム塩の一種であり、ミトコンドリアの呼吸鎖に存在して、生存細胞にだけ活性のあるsuccinate-tetrazolium reductaseよりホルマザン色素に分解される。このホルマザン色素をELISAリーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより生細胞を定量した。

4. 胆管癌細胞株 (HuCCT1) におけるUPRT遺伝子とHSV-tk遺伝子の定量解析

胆管癌細胞株 (HuCCT1) に対して、AxCAUTとAxE1 CAUTを0.1~100 MOIで感染させ5% FCS入りのRPMI 1640培地で24時間培養した。その後培地を交換し、さらに4日間培養した。細胞を回収しTRIzol (GIBCO) によりtotal RNAを抽出した。

Total RNAをSYBR RT-PCR Kit (TaKaRa) を用いRT反応を行った。RT反作用プライマーはrandom 6 mer を使用した。検量線を作成し検量線の範囲内で、検体の大腸菌UPRT遺伝子、HSV-tk遺伝子および標準遺伝子hGAPDの発現相対定量を行った。定量PCRにはSmart Cycler version 2 (TaKaRa) およびSYBER RT-PCR Kit (Perfect Real Time) を用いて、増幅された2本鎖DNA中に入り込んだSYBER Green 1 を検出しCt値 (Threshold Cycle) を算出した。検出Ct値を検量線にあて発現相対量を算出した。各検体をそれぞれ標準遺伝子hGAPDで補正し、さらにAxCAUT 0.1 MOI感染群を1として発現相対量を比較検討した。

5. Animal studies

5週齢の雌のBALB-c nu/nu マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) を使い皮下担癌モデルと腹膜播種モデルを作製した。

FBS無しのRPMI 1640培地 100 μ lに懸濁したHuCCT1 1 x10⁷個をヌードマウスの右側腹部に皮下注射して皮下担癌モデルを作製した。約3週間後 Tumor volume (TV) が200~250mm³に達したときに、これらのマウスをランダムに以下の5グループに分類した。TVは次の式で計算した。(TV= 0.4 x diameter x width)

- 1) intratumor (it.) injection of PBS (100 μ l)、
- 2) it. injection of AxCAUT followed by intraperitoneal (ip.) 5-FU、
- 3) it. injection of AxCAUT followed by ip. GCV、
- 4) it. injection of AxCAUT followed by ip. 5-FU and ip. GCV、
- 5) it. injection of AxE1CAUT followed by ip. 5-FU and ip. GCV

Adeno-vector (2 x10⁸PFU) またはPBS投与3日後にALZET Osmotic Pumps (DURECT, CA) を腹腔内に埋め込み5-Fu (10mg/kg/day)、GCV (5 mg/kg/day) を14日間持続投与した。腹腔内投与開始日より3、7、10、14日に腫瘍体積を測定した (n= 5)。薬剤腹腔内投与開始時の腫瘍体積を1とし相対的な比を求め、その変化を投与

ウイルス、投与薬剤の違いで比較検討した。

次にHuCCT1を 1 x10⁷個、BALB-c nu/nu マウス腹腔内に投与し、10日間飼育して腹膜播種モデルを作製した。HuCCT1投与後10日目に、これらのマウスをランダムに以下の3グループに分類した (n = 5)。1) PBS単独 (200 μ l) ip.、2) ip. injection of AxCAUT (2 x10⁸PFU) in PBS (200 μ l)、3) ip. injection of AxE1CAUT (2 x10⁸PFU) in PBS (200 μ l)

ウイルス又はPBS投与3日後より、5-FU 10mg/kg/dayとGCV 5 mg/kg/dayを同時にsingle shotで連日7日間腹腔内投与した。最初の癌細胞腹腔内投与から5週間目にヌードマウスを犠牲死させ、すべてのdisseminated tumorを鋭的に採取し総重量を測定した。

C. 研究結果

ウイルス非感染時は、5-FU/GCV併用投与時の薬剤濃度と細胞生存率の関係は5-FU単独投与時と比較して違いを認めなかった (図1)。AxCAUTのMOI数と5-FU、GCVそれぞれの薬剤に対する細胞生存率の関係は、アデノベクターのMOI数を増加させるに従って5-FU、GCVとも細胞生存率が低下していた (図2、図3)。

AxCAUTを100 MOIで感染させたときの細胞の生存率を示す (図4)。コントロール (非感染) 群と比較して5-FU、GCV単独投与群では薬剤濃度

図1. Drug sensitivity of HuCCT1 cells

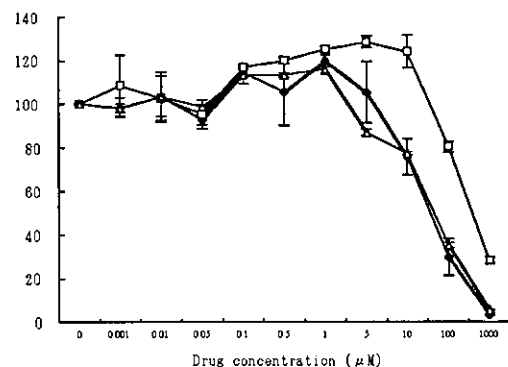


図2. Drug sensitivity of AxCAUT-infected HuCCT1 cells to 5-Fu

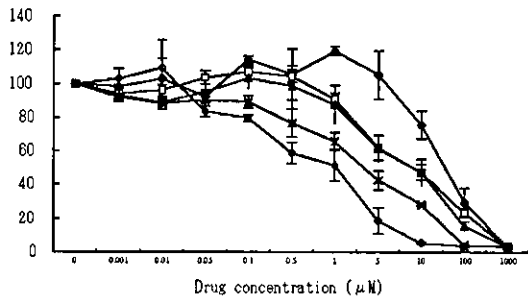


図3 Drug sensitivity of AxCAUT-infected HuCCT1 cells to GCV

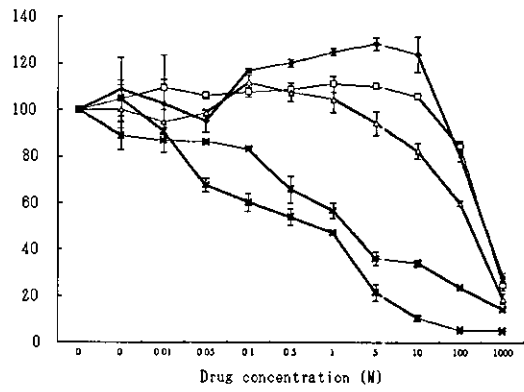


図4. Sensitivity of AxCAUT-infected HuCCT1 cells (100MOI) to 5-FU, GCV

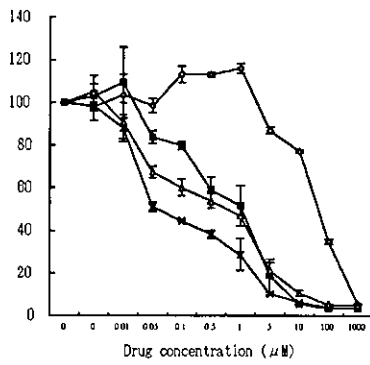


図5. Sensitivity of AxE1CAUT-infected HuCCT1 cells to 5-Fu, GCV

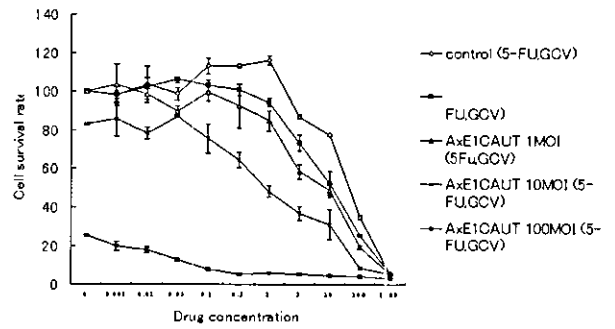


図6. UPRT遺伝子、HSV-tk遺伝子の相対的発現量

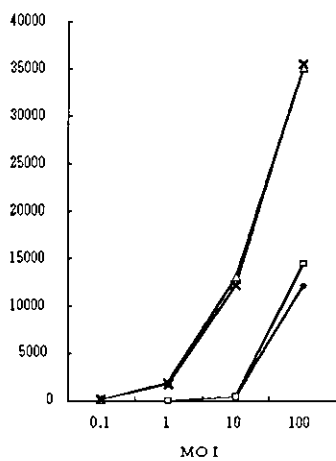


図7. 担癌マウスモデルに対する抗腫瘍効果

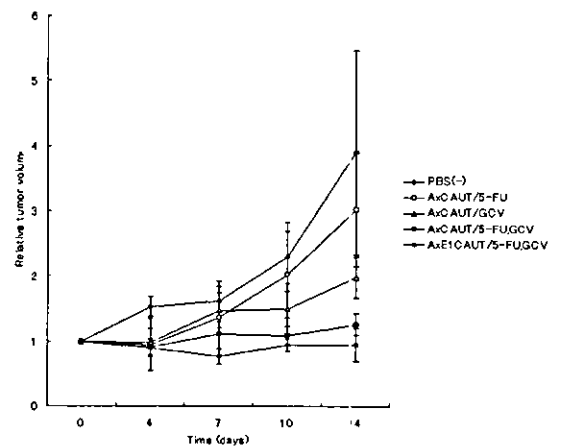


図8. 腹膜播種モデルに対する抗腫瘍効果

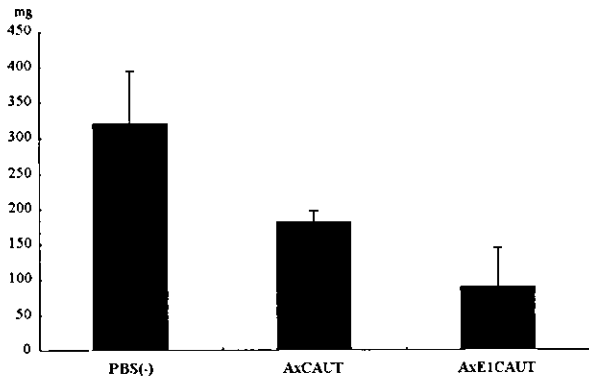


表1. Transduction efficiency, IC50 of 5-FU and GCV in AxCAUT-infected HuCCT1 cells

	5-FU	GCV	5-FU.GCV
control	30	377	36
0.1MOI	8	340	9
1 MOI	8	153	3.3
10MOI	2.9	1.6	0.41
100MOI	0.41	0.709	0.056

表2. UPRT遺伝子、HSV-tk遺伝子のmRNA相対発

	0.1MOI	1 MOI	10MOI	100MOI
AxCAUT/UPRT	1	17.58	409.9	12170
AxCAUT/HSV-tk	1.65	21.41	443.2	14480
AxE1CAUT/UPRT	163.2	1884	13090	35180
AxE1CAUT/HSV-tk	133	1736	12180	35553

に対する細胞の生存率は低下していた。さらに 5-FU/GCV併用投与群では 5-FU、GCV単独投与群と比較して薬剤濃度に対する細胞生存率は低下していた。

AxCAUTを感染させた時の50%細胞阻害濃度(IC50)は、アデノウイルスのMOI数が増加するにつれて感受性が増強していた。胆管癌細胞に対する薬剤の感受性(IC50)は、非感染細胞でAxCAUT(100 MOI)では5-FU単独投与群で0.41、GCV単独投与群で0.71であった。一方、5-FUとGCVの併用投与群でIC50は0.056と併用投与でより効果が認められた(表1)。

腫瘍融解作用を持つAxE1CAUTを感染させたときの細胞生存率は、MOI数が増加するにつれて低下しており、100 MOI感染時では約23%であった(図5)。薬剤濃度が0の時、AxCAUTはそれ自体での細胞融解作用が認められないため細胞生存率はほぼ100%であったが、AxE1CAUTでは細胞生存率がすでに低下していた。

アデノウイルスのHuCCT1細胞での遺伝子発現量を検討するため、種々のMOIでアデノベクターを感染させリアルタイムPCRで導入遺伝子の発現量を測定した。UPRT遺伝子、HSV-tk遺伝子のmRNAはほぼ1対1であった。AxCAUTを種々のMOI数で感染させた場合、MOI数が増加するに伴いUPRT遺伝子、HSV-tk遺伝子のどちらもmRNAの発現が増加していた。

AxE1CAUTはAxCAUTと比較して同じMOI数感染させてもUPRT遺伝子、HSV-tk遺伝子のmRNA発現は増加していた(図6、表2)。

皮下担癌モデルのPBS投与マウスでは、TVが約200mm³に達した時点から急速に増大し、2週間後には約3.9倍になった。AxCAUT投与群において5-FU、GCV単独投与群の2週間後のTVはそれぞれ3.02、1.98倍に増大した。一方AxCAUT/5-FU、GCV併用投与群の2週間後のTVは1.26倍で、AxE1CAUT/5-FU、GCV併用投与群の2週間後のTVは0.95倍であった(図7)。単独投与群と比較して併用投与群では有意にTVは低下していた。皮下担癌モデルでは、AxCAUT/5-FU、GCV投与群とAxE1CAUT/5-FU、GCV投与群間で有意差は認められなかった。

腹膜播種モデルに対するウイルス投与量と腹膜播種の総重量を示す(図8)。PBS単独投与群と比較してAxCAUT群とAxE1CAUT群では有意に腫瘍の縮小を認めた。さらに皮下担癌モデルとは異なり、AxCAUT投与群と比較しAxE1CAUT群では有意に腫瘍の縮小を認めた。

D. 考察

アデノウイルスAxCAUTでHuCCT1細胞に遺伝

子導入した場合、real time PCRによるとUPRT遺伝子、HSV-tk遺伝子のmRNAはほぼ1対1であり、MOI数が増加するに伴いUPRT遺伝子、HSV-tk遺伝子のどちらもmRNAの発現が増加していた。またウィルスのMOI数と細胞生存率の関係において、低いMOI数では薬剤感受性も低かった。AxCAUTのMOI数を増加させると薬剤感受性も増加し、100 MOI感染時では5-FU単独投与ではコントロールと比較して約70倍であった。このことから5-FU/UPRT, GCV/HSV-tkを利用した遺伝子治療を行うには、目的遺伝子の十分な発現が必要であると考えられた。

一方、AxCAUT感染細胞に対する投与薬剤の違いでみると、AxCAUT (100 MOI) では5-FU、GCV単独投与と比較して5-FU/GCV併用投与ではそれぞれ薬剤感受性が約7倍、約12倍と単独投与より併用投与時においてIC50の低下が認められた(図5)。胆管癌培養細胞に対する薬剤の感受性(IC50)は、AxCAUT (100 MOI) 感染時において5-FU単独投与群で0.41、GCV単独投与群で0.71であった。一方、5-FUとGCVの併用投与群でIC50は0.056と併用投与でより効果が認められた。さらに皮下担癌モデルにおいても5-FU/GCV併用投与群が単独投与と比較して有意に抗腫瘍効果を示した。

AxE1CAUTはウィルスの感染初期に発現する遺伝子のうちE1B-55Kを欠失させている。E1B-55Kはp53と結合することによりp53の機能を抑制する。従ってp53の機能が正常な細胞ではこのウィルスは複製せず、p53変異あるいは欠失のある細胞では複製し細胞を傷害する。この制限増殖型アデノウイルスAxE1CAUTにおいて検討を行うと、real time PCRではAxCAUTと比較して同じMOI数を感染させた場合でもUPRT遺伝子、HSV-tk遺伝子の発現はMOI数が増加するに従い増加していた。さらに薬剤濃度が0の時、AxCAUTは細胞融解作用が認められないためMOI数を増加しても細胞生存率はほぼ100%であったが、AxE1CAUTはMOI数が増加するにつれて細胞の生存率は低下しており100 MOI感染時では約23%であった。培養細胞系で

は制限増殖型アデノウイルスAxE1CAUTを使用した場合は、MOI数を増加させるに伴い腫瘍融解作用と薬剤感受性増強作用により、AxCAUTと比較してより強力に抗腫瘍作用を示した。

さらに、アデノベクターを腫瘍に直接注入しないで腹腔内に投与した腹膜播種モデルで検討すると、AxE1CAUT/5-FU, GCV投与群はAxCAUT/5-FU, GCV投与群と比較して有意に抗腫瘍効果を示した。

胆管癌では胆管壁内に浸潤性に腫瘍が増殖し、また解剖学的にもベクターの腫瘍内への直接投与が困難な場合が多い。我々は従来胆管壁の良性の増殖性変化が起こる時に壁内に直接アデノベクターを注入しなくても、胆汁中投与により胆管壁に遺伝子導入され増殖が抑制されることを報告してきた。腹膜播種モデルでの腹腔内投与でAxE1CAUTが有効であったことから、胆汁中投与による胆管癌の遺伝子治療への応用の可能性が示唆された。

E. 結論

我々は今回の研究で胆管癌に対して、double suicide gene therapyとoncolytic gene therapyの同時併用の可能性を検討した。

癌選択的増殖型アデノウイルスベクターAxE1CAUTを用いるとウィルス自体の腫瘍融解作用と2種類の薬剤感受性遺伝子の発現により、強力な抗腫瘍効果を示し、癌性腹膜炎モデルでアデノベクターを直接腫瘍内に投与しなくても有効であったので、胆汁中投与による胆管癌の治療への応用の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

児島洋、本田和男、横山和尚、串畑史樹、小林展章
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
胆道 18 : 2 : 174-81 : 2004

Yoh Kojima, Kazuo Honda, Hiroshi Kotegawa, Fumiki Kushihata, Nobuaki Kobayashi, Kazunari K. Yokoyama, Hirofumi Hamada.
Adenovirus-mediated gene transfer to the rat bile

duct
Journal of Surgical Research in press

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

網羅的遺伝子解析に基づく胆管癌分子標的治療法の開発

分担研究者 二村雄次

名古屋大学大学院 医学系研究科 器官調節外科

A. 研究目的

肝内結石症の治療成績の向上により以前のような感染性合併症で死亡する症例が減少して、長期生存例が増えてきた。その一方で、経過中に肝内胆管癌を発症する症例の報告が増加し、現在では、肝内胆管癌発生の有無が肝内結石症の重要な予後規定因子と考えられている。肝内胆管癌は手術以外有効な治療法のない難治癌であるが、その治療成績は満足のものではなく、治療成績向上のためには新たな本疾患の治療方法の開発が必要とである。

本研究班の平成13年度研究で我々は、肝内結石症にともなう肝内胆管癌発生に関与する遺伝子を同定することを目的としてcDNAアレイ法を用いた網羅的な遺伝子解析を行い、肝内結石症に発生する肝内胆管癌に特異的に発現する遺伝子としてNek2 (NIMA related kinase 2) を同定した。

最近の分子生物学の進歩により、あらたな癌治療の一つとして分子標的治療が注目されている。我々は肝内結石症の予後因子である肝内胆管癌の治療成績の向上を目的として、Nek2を標的に作成したsiRNA (small interfering RNA) による胆管癌の分子標的治療の開発を試みた。

B. 対象と方法

1. ヒト胆管細胞癌細胞株HuCCCT1、TFK1、HuH2におけるNek2の発現を半定量RT-PCR、western blottingにて検討した。
2. Nek2を標的にしたsiRNA Nek2をHuCCCT1に導

入し、Nek2の発現および増殖能をwestern blotting、MTTアッセイにて解析した。

3. 動物モデルとしてBalb/cマウスにHuCCCT1を大腿皮下に注入し、腫瘍形成後siRNA Nek2、siRNA luciferaseGL2、PBSをそれぞれ直接腫瘍に週1回3週連続投与し、抗腫瘍効果を判定した。またHuCCCT1を腹腔内に注入した腹膜播種マウスにおいてNek2 siRNAの腹腔内投与後の生存期間について検討した。

C. 結果

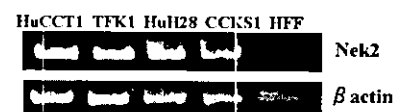
1. 胆管癌細胞株におけるNek2の発現

Nek2は胆管癌細胞株に高発現しており、また免疫染色にて中心体に局在が確認された (Fig.1)。

2. Nek2 siRNAの胆管癌細胞株HuCCCT1への導入

Nek2 siRNAの胆管癌細胞株HuCCCT1への導入Nek2タンパク発現が47.8%と減少し、増殖能も50.6%に要請された (Fig.2)。

Fig.1 Semi-quantitative RT-PCR



Western blot analysis

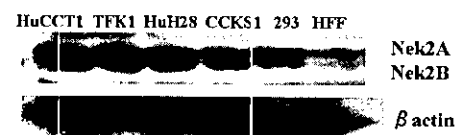
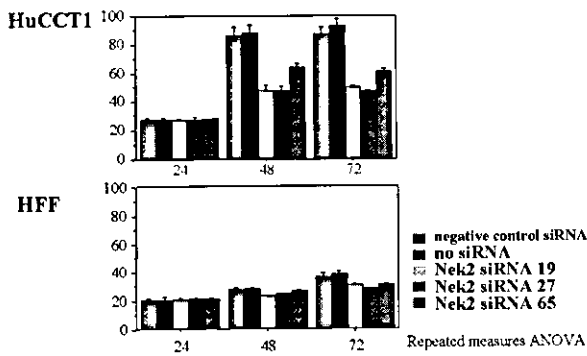


Fig.2 Proliferation assay

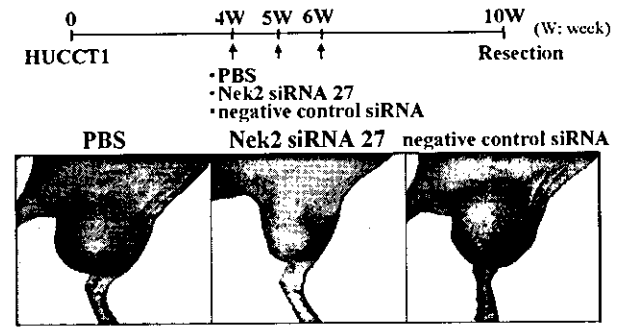


3. HuCCT1皮下発癌マウスにおけるNek2 siRNA 腫瘍の大きさはNek 2 siRNA投与群 (1.1cm³)、negative control siRNA (4.9cm³)、PBS (5.4cm³) とNek 2 siRNA投与群では腫瘍は有意に縮小 (p< 0.05) した。Nek2 siRNAの腹腔内投与により生存期間の延長を認めた (Fig.3)。

D. 考察

siRNAは21から23基程度の二重鎖RNAであり、標的遺伝子の発現を特異的に抑えることができ、癌治療をはじめとした臨床への応用が期待されている⁴。胆管癌に対するsiRNAの臨床応用に関する報告は未だされていないが、本研究結果は、siRNA Nek 2がすくなくとも動物実験においては癌の縮小、生存期間の延長に極めて有効であることを示しており、また、特記すべき副作用も認められなかった。

Fig.3 The effect of Nek2 siRNA in BALB/c mouse inoculated subcutaneously with HuCCT1



siRNAの作用機序についてはまだ十分に解明されていず、また標的遺伝子であるNek2のさらなる機能解析も必要であるが、Nek2を標的にした分子標的治療は肝内結石症に合併する胆管癌に対する新たな治療法の1つとして有望であると考えられた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

IV 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

執筆者氏名	論文題名	雑誌名	巻	頁	年
佐田尚弘、小泉大、永井秀雄他	Multi-detector row CT (MD-CT) による肝内結石症の術前診断	胆道	43	513-519	2004
Ishikawa A, Sasaki M, Nakanuma Y, et al	Aberrant expression of CDX2 is closely related to the intestinal metaplasia and MUC2 expression in intraductal papillary neoplasm of the liver in hepatolithiasis	Lab Invest	84	629-638.	2004
Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y, et al	Expression of trefoil factor family 1, 2, and 3 peptide is augmented in hepatolithiasis	Peptides	25	763-770	2004
露口利夫、税所宏光	胆石症	診断と治療	92	227-231	2004
露口利夫、税所宏光	原発性硬化性胆管炎の画像診断	消化器科	39 (1)	58-63	2004
児島洋、本田和男、横山和尚他	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	胆道	18 (2)	174-81	2004
Sasaki M, Tsuneyama K, Nakanuma Y, et al	Site-characteristic expression and induction of trefoil family 1,2 and 3 and malignant brain tumor-1 in normal and diseased intrahepatic bile duct relates to biliary pathophysiology	Liver International	24 (2)	29-37	2004
Tsuneyama K, Sasaki M, Nakanuma Y, et al	Expression MAGE-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its precursor lesions	Pathol Int	54 (3)	181-186	2004
Harada K, Ohba K, Nakanuma Y	Peptide antibiotic human beta-defensin-1 and -2 contribute to antimicrobial defense of the intrahepatic biliary tree	Hepatology	40 (4)	925-932	2004
全陽、宮山士朗、中沼安二他	肝内結石症に伴う肝内胆管癌	肝胆臓	49 (5)	773-779	2004
甲斐真弘、千々岩一男、土屋和代他	腔内超音波検査 (IDUS) が肝門部胆管癌の skip lesion 診断に有用であった一例	胆道	18 (4)	531-539	2004
Sato Y, Harada K, Nakanuma Y, et al	Activation of the MEK5/ERK5 cascade is responsible for biliary dysgenesis in a rat model of Caroli's disease	Am J Pathol	166 (1)	49-60	2004
Ishikawa A, Sasaki M, Nakanuma Y, et al	Frequent p16INK4a inactivation is an early and frequent event of intraductal papillary neoplasm of the liver arising in hepatolithiasis	Human pathology	35	1505-14	2004

執筆者氏名	論文題名	雑誌名	巻	頁	年
Shoda J, Inada Y, Tanaka N, et al	Bezafibrate stimulates transport and secretion of phosphatidylcholine in human HepG2 cells by a novel mechanism of redistribution of multidrug-resistance 3 P-glycoprotein in the bile canaliculi.	J Lipid Res	45	1813-1825	2004
Kaneko K, Ando H, Seo T, et al	Bile infection contributes to intrahepatic calculi formation after excision of choledochal cysts	Pediatr Surg Int	21	37113	2005

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

肝内結石症調査に関する調査研究班

主任研究者 跡見 裕

事務局 森 俊幸、大島かずみ

〒181-8611 東京都三鷹市新川6-20-2
杏林大学外科学教室内

TEL.0422-47-5511、FAX.0422-47-9926