

図3 全症例の累積生存率

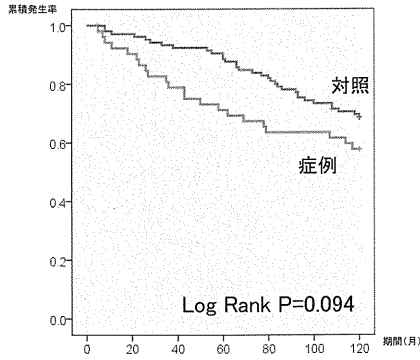


図7 消化管癌の累積発生率

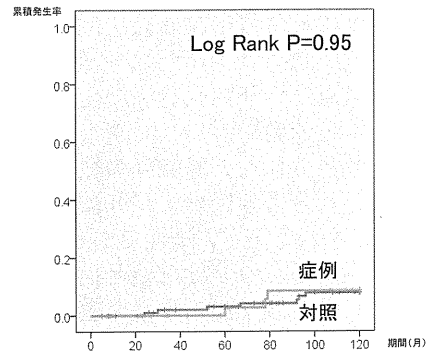


図4 胆道癌の累積発生率

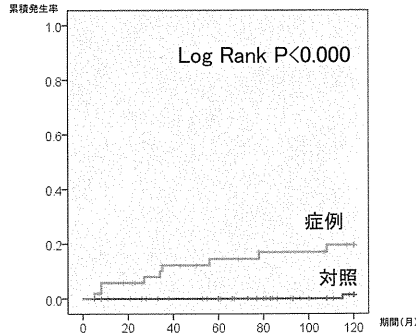


図5 肝内胆管癌の累積発生率

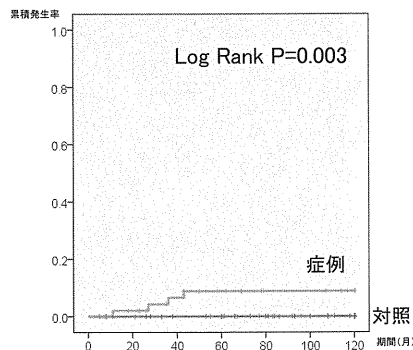
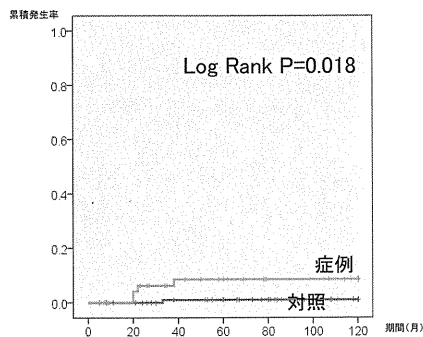


図6 肝細胞癌の累積発生率



で、差は認めなかった。(図7)

7) 胆道癌, 肝内胆管癌の発生リスク

胆道癌の5年発生率は症例15.1%, 対照0%, 10年発生率は症例19.8%, 対照0.9%であった。Cox 比例ハザード回帰分析による補正後の10年胆道癌の発生のハザード比は24.2であった。(表1)

肝内胆道癌の5年発生率は症例8.9%, 対照0%, 10年発生率も症例8.9%, 対照0%であった。Cox 比例ハザード回帰分析はできなかった。(表2)

表1 胆道癌の発症リスク

	5年発生率	10年発生率
研究コホート(症例)	15.1%	19.8%
比較コホート(対照)	0%	0.9%

ハザード比 24.2

表2 肝内胆管癌の発症リスク

	5年発生率	10年発生率
研究コホート(症例)	8.9%	8.9%
比較コホート(対照)	0%	0%

ハザード比 (-)

8) 胆石の発生について

対照において10年の間に胆石が発生した症例が2例認められた。2例とも胆のう結石で、肝内結石の発生は認めなかった。

D. 考 察

長崎県上五島地域は肝内結石症の多発地帯と知られ、これまで20数年にわたって疫学的調査を行ってきた。2001年~2002年の2年間に当地域の肝内結石症の成因究明のための症例対照研究で集計された症例55例、対照110例は、その後もほとんどが当地域で生活しており、生存、死亡の状況、死因、癌の合併、結石の発生について追跡調査を行ってきた。一方、肝内結石症患者には高頻度で肝内胆管癌を合併することが知られているが、全国的な疫学調査では、患者の高齢化が進み、胆道癌や消化管癌の合併も多いことが指摘されるようになってきた。そこで、今回、これらの癌合併について、その発生率、発生リスクを検討した。

死因は、症例で肝内胆管癌3例、肝門部胆管癌2例、下部胆管癌1例、胆嚢癌1例であり、胆道癌の頻度が高かった。全例の10年累積生存率は症例で長い傾向にあったが、有意差は認めなかった。各種癌別の累積発生率をみると、胆道癌、肝内胆管癌の発生率が症例で有意に高く、肝外胆管癌発症のリスクも今後検討すべき問題であると考えられた。肝臓癌の発生率も症例で有意に高かったが、発生3例全てが肝切除時に輸血を行われており、いずれもHCV陽性であったことから、肝内結石症に関与するものではないと推察された。また、消化器癌については、10年累積発生率がほぼ等しく差はみられず、関与はないと考えられた。症例の集積された胆道癌について、Cox比例ハザード回帰による分析を行ったところ、ハザード比は24.2であり、肝内結石症においては、肝内胆管癌のみならず、全胆道癌の合併のリスクも高いことが示された。

肝内結石症の診療に当たっては、肝内胆管癌のみならず、肝外胆道癌の合併のリスクも念頭において、診断、治療に当たる必要があると考えられた。

E. 結 論

研究コホート（症例）、比較コホート（対照）の10年の追跡によって、症例に肝内胆管癌ならびに全胆管癌の発症率の高いことが示された。肝内結石症の治療、フォローアップは、これらを念頭に置いて行うべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

肝門部胆管癌との鑑別が困難であった肝内結石症の検討

研究協力者 榑野 正人 名古屋大学大学院医学研究科腫瘍外科 教授

研究要旨：当科で過去11年間に、術前に肝門部胆管癌と診断して根治切除を施行した453例のうち、1.3%にあたる6例が、組織学的に肝内結石症と判明した。6例は男性3例、女性3例、平均年齢67.5歳であった。Bismuth分類にもとづく胆管狭窄の程度はⅠ型1例、Ⅲb1例、Ⅳ型4例であった。胆汁細胞診は6例中4例が疑陽性であり、胆管生検を4例に施行したが全例陰性であった。全例肝門部胆管癌と診断し、進展度に応じて肝右葉切除+肝外胆管切除を2例、肝左3区域切除+肝外胆管切除を4例施行した。術後経過は良好で、退院後は全例良好な社会生活を送っている。肝門部胆管癌との鑑別が困難な肝内結石症に対する、肝切除術+肝外胆管切除は妥当な治療法であり、安全な手術を心がけるべきである。

共同研究者

菅原 元 名古屋大学大学院医学研究科外科感染症学寄附講座講師

A. 研究目的

肝内結石症は良性疾患であるが、治療後も再発を繰り返すことが少なくない難治性疾患である。肝内結石症の予後に影響を与える合併症の一つとして、胆道悪性腫瘍が挙げられ、肝内結石症の診断においては、胆道悪性腫瘍の存在を念頭に置く必要がある。今回、術前肝門部胆管癌との鑑別に苦慮した肝内結石症手術症例を取り上げ、その鑑別について検討した。

B. 研究方法

2001年1月より2011年12月までの期間に、名古屋大学消化器外科Ⅰで経験した肝内結石症は73例であった。男性31例、女性42例であり、初診時の平均年齢は59歳（25-81歳）で、平均観察期間は5年（1-10年）であった。73例中19例（26%）に胆道系の悪性腫瘍を併発していた。そして73例中6例（8%）は、術前に肝門部胆管癌と診断して手術を施行し、組織学的に肝内結石と判明した症例であり、これらの症例の詳細や、肝切除術式、治療後の経過について検討した。

C. 研究結果

2001年1月より2011年12月までの期間に、当科で術前に肝門部胆管癌と診断して、肝切除+肝外胆管切除を施行した症例は453例で、術後組織学的に肝門部胆管癌であった症例は438例であり、15例 3.3%が組織学的に良性であった。7例が胆管炎で（IgG4関連胆管炎3例、原発性硬化性胆管炎2例、慢性胆管炎2例）、6例（1.3%）が肝内結石、2例が術後良性胆管狭窄であった。

肝門部胆管癌と術前診断して、根治手術を施行した6例の平均年齢は67.5歳（54-79歳）、男性3例、女性3例であった。初発症状は黄疸と肝機能異常があわせて5例であった。胆管狭窄をBismuth分類で表すと、Ⅰ型1例、Ⅲb1例、Ⅳ型4例であった。MDCTで胆管狭窄部に一致した造影効果を有する腫

瘍像を6例に認め、肝萎縮を3例に認めた。胆道疾患の既往歴として、胆嚢摘出を2例、肝内結石に対するPTCSを1例に施行していた。

胆道 drainage は全例に施行しており、PTBD 2例、ENBD 4例であった。胆汁細胞診も全例に施行しており、陰性1例、疑陽性4例、腺癌と診断したものが1例であった。胆管生検は4例に施行したが、全例良性であった。

それぞれ肝門部胆管癌と術前診断し進展度に応じて肝左3区域切除+肝外胆管切除を4例、肝右葉切除+肝外胆管切除を2例に施行した。術後経過は6例とも大きな問題なく経過した。術後経過観察期間は4カ月から7年で、それぞれ肝内結石・胆管炎の再燃なく経過しており、良好な社会生活を送られている。

D. 考 察

肝切除の安全性が確立し、肝内結石症に対する治療手段として肝切除術の適応となる症例が増えている。肝内結石症に対する肝切除術は結石生成の原因となる病変の確実な除去が主目的であり、その結果、肝内結石症の再発が少ないことが最大の利点である。

今回は術前に肝門部胆管癌と診断した肝内結石症について検討を行った。術前に肝門部胆管癌と診断した453例中、1.3%にあたる6例が肝内結石症であった。この数字をゼロに近づけるべく、我々は診断能を高める努力をしているが、完全にゼロにすることは困難である。

今回の6症例を肝門部胆管癌と鑑別する上で困難であった点について考察を加える。MDCTで胆管狭窄部に一致して、胆管壁が造影される所見や、腫瘍像を呈する所見が認められたこと、胆管像でBismuthⅣ型 type の狭窄を呈する症例が多かったこと、胆汁細胞診で疑陽性を示した症例が多かったことなどが挙げられる。故に胆管生検で癌と診断できなかつたにも拘わらず、肝門部胆管癌の存在を否定しきれず切除に踏み切った。術前診断の精度を上げるために、胆管生検を再度施行すべきであったかもしれないが、ERCPを再度施行するに当たってはリスクも存在するので、その適応については今後の課題となるであろう。

次に、術前に肝内結石症と診断できていたら、今回の6症例はどう治療すべきであったらうか？

全例肝門部胆管狭窄を呈しているため、肝萎縮を認めた3症例は肝切除+胆管切除が適切な治療法であると考えられる。肝萎縮がない症例に対しては、PTCSによる切石術も選択肢となりうる。ただし肝門部胆管癌の存在が完全に否定できない症例に対して、繰り返すPTCSは瘻孔再発のリスクとなることから、安全に肝切除が施行できるのであれば、肝切除も適切な選択肢となりうる。すなわち今回の6症例は、術前に肝内結石症と診断できていれば、肝門部リンパ節郭清を手控えた肝切除+肝外胆管切除が適切な治療法であったと考えられる。もしも肝機能が不良であれば、PTCSにより切石し、胆管生検を行い悪性疾患の存在を否定したうえで、経過観察するのもひとつの選択肢となるであろう。

E. 結 論

胆道狭窄を呈する肝内結石症は、肝門部胆管癌との鑑別が困難な症例が存在する。胆管生検を繰り返すことは肝門部胆管癌を鑑別する上で有効である可能性がある。肝門部胆管癌の存在を完全に否定することは困難なために、肝切除が必要となる可能性があり、安全な手術を心がけるべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

原発性硬化性胆管炎類似の画像を呈した肝内結石症 －新たな成因による肝内結石症の可能性について－

研究協力者 露口 利夫 千葉大学医学研究院腫瘍内科学 講師

研究要旨：原発性肝内結石症の典型的臨床像は繰り返す胆管炎が特徴とされる“pyogenic cholangitis”である。過去2年間に当科において診断・治療を行った肝内結石症21例中胆道再建術後例などの2次性肝内結石症を除く典型的原発性肝内結石症は5例であった。同時期に肝門部胆管癌様の画像を呈した高齢発症肝内結石症2例を経験し、原発性肝内結石症を対照として比較検討した。直接胆管造影上は多発癒痕狭窄像を特徴とし、結石除去後の胆管像は原発性硬化性胆管炎に類似した所見であった。従来分類には属さない新たなカテゴリーの肝内結石症の存在を示唆する所見として報告した。

A. 研究目的

近年、肝内結石症は減少傾向にあり、新規発症例は希とされている。当科でも70%程度が胆道再建術後肝内結石症など2次性肝内結石症に占められている。原発性肝内結石症の典型的臨床像は繰り返す胆管炎が特徴とされる“pyogenic cholangitis”である。過去2年間に当科において明らかな原因が不明の非典型的な肝内結石症2例を経験した。この2例は臨床経過、画像所見とも典型的ではなく、画像上は肝外胆管癌が疑われた。結石除去後の胆管像は多発狭窄と憩室様突出像など原発性硬化性胆管炎類似の所見を有しており、新たなカテゴリーの2次性肝内結石症として報告した。

B. 研究方法

最近2年間に当科で診断、治療した肝内結石症21例中胆管癌様の画像を呈した2例を他の典型的な原発性肝内結石症5例を対照として比較検討した。

C. 研究結果

肝門部胆管癌を疑われたがERCP、経口胆道鏡検査にて肝内結石および2次性の硬化性胆管炎であることが診断された2症例

症例1：84歳、女性。

腹痛などの臨床症状はなかったが近医にて肝障害、腹部エコー、CT、MRCPにて肝内胆管拡張と肝外胆管狭窄を指摘され入院。ERCPで中部胆管に狭窄を認めガイドワイヤー通過困難なため当科に紹介、入院となる。既往歴では高血圧症、脳梗塞のみ。入院時の血液生化学検査では肝障害は改善しておりALPが421IU/Lとやや高値である以外は正常であった。造影CTでは肝門部から肝外胆管まで壁肥厚と肝内胆管拡張を認め肝門部胆管癌が疑われる所見であった。入院後のERCPにて中部胆管狭窄を認め内視鏡的乳頭切開術を施行して経口胆道鏡で胆管内を観察した。多数の癒痕潰瘍と結石が充満しており結石を電気水圧衝撃波で破碎したところ肝内胆管までガイドワイヤー、ステントを留置することが可能となった。結石除去後の胆管像は憩室様突出や多発胆管狭窄像を呈しており原

発性硬化性胆管炎様の像であった（図1）。胆管細胞診、生検を繰り返すも悪性所見なく炎症性腸疾患も合併ないため原因不明の2次性硬化性胆管炎と診断した。6ヶ月後に再入院しERCP再検したところ胆管狭窄は改善傾向を示しておりその後2年間経過良好である。



図1：結石除去後のERCP像；憩室様突出，多発狭窄など原発性硬化性胆管炎類似の胆管像所見である。

症例2：71歳、女性

症例1同様胆管炎症状なく肝障害と腹部エコー、造影CT、MRCPにより肝内胆管拡張、肝外胆管の狭窄を指摘され肝門部胆管癌を疑われ当科に紹介となった。入院時の血液生化学検査ではALPが543IU/Lと軽度高値を示す以外は正常域であった。入院後ERCP、経口胆道鏡検査を行ったところ症例1同様に胆管には癒痕狭窄，結石を認め生検，細胞診でも悪性

所見を認めなかった。現在外来経過観察中であるが増悪を認めない。

今回経験した原発性硬化性胆管炎類似の胆管像を呈した2症例と他の原発性肝内結石症5例（平均年齢60.6歳，54～66歳）を比較した。5例中4例は典型的な左葉型肝内結石症であり肝障害，胆管炎などの症状から3例は左葉切除が施行された。1例はうつ病併存のため当科初診時には胆汁性肝硬変による肝不全状態となっており2ヶ月後に死亡された。これら原発性肝内結石症5例は胆管狭窄を伴うものの原発性硬化性胆管炎類似の画像所見は認められず，臨床的にも胆管炎を繰り返していた。今回報告した2症例は1) 結石除去後の胆管像が原発性硬化性胆管炎に類似した像を呈すること，2) 胆管炎の合併なく経過良好であること，3) 高齢発症であること，などが共通しており，同時期に経験した典型的な原発性肝内結石症と著しく異なる臨床像を呈していた。なお，2例ともIgG4値は正常域であり，原発性硬化性胆管炎類似の胆管像を呈するが，高齢発症であること，炎症性腸疾患の合併がないこと，結石除去後の経過が良好であること，などより2次性硬化性胆管炎と診断した。

D. 考 察

原発性硬化性胆管炎類似の胆管像を呈した肝内結石症はこれまでに報告されていない新たなカテゴリーに属する疾病である可能性がある。肝内結石は胆管狭窄によって2次的に形成されたものであると考えられるが，初診時には肝門部胆管癌様の画像所見を呈しており，胆管癌として誤った治療を受ける可能性もありえる。今後このような特徴的な胆管像を呈するに至った病態の成因とその解析が必要と考えられる。

E. 結 論

特徴的な胆管像を呈した高齢発症肝内結石症2例を経験し，従来の分類には属さない胆管多発狭窄を特徴とする新たなカテゴリーの肝内結石症の存在を示唆する所見として報告した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

肝内結石における胆管狭窄部位別の手術治療とその遠隔成績

研究協力者 内山 和久 大阪医科大学 一般・消化器外科 教授

研究要旨：肝内結石症に対する手術療法の原則は結石の除去と胆汁鬱滞の解除であるが、術式を決定する際最も重要な因子として胆管狭窄の有無および部位があげられる。今回、教室における肝内結石症手術症例を胆管狭窄の部位別に病型分類し、術式と遠隔成績（QOL）につき検討した。

A. 研究目的

肝内結石症に対する外科治療のテーマに関して、教室の過去30年間の肝内結石症手術症例82例について、胆管狭窄部位別の術式および遺残結石の陽性率と遠隔成績について検討する。

B. 研究方法

外科治療は胆管切石術または肝切除術とした。PTCS症例は含まれていない。遠隔成績については従来の厚生労働省肝内結石症調査研究班で定められた「遠隔成績の判定基準」によった。

C. 研究結果

1. 無狭窄型（26例）について

術式は胆管切石術23例、肝切除術3例であった。遺残結石率は11.5%で、遠隔成績は21例が良好、5例がやや有効で、不良例はなかった。

2. 左肝内胆管狭窄型（36例）について

術式は胆管切石術3例、肝切除術33例であった。遺残結石率は2.9%で、遠隔成績は30例が良好、4例がやや有効、2例が不良であった。

3. 右肝内胆管狭窄型（9例）について

術式は胆管切石術8例、肝切除術1例であった。遺残結石率は33.3%で、遠隔成績は6例が良好、3例がやや有効、不良例はなかった。

4. 両側胆管狭窄型（4例）について

術式は胆管切石術4例、肝切除術はなかった。遺残結石率は100%で、遠隔成績は1例が良好、2例がやや有効、不良例が1例であった。

5. 上部胆管狭窄型（5例）について

術式は胆管切石術3例、肝切除術2例であった。遺残結石率は50%で、遠隔成績は2例が良好、やや有効例はなく、不良例が3例であった。そのうち2例は癌死している。

6. 下部胆管狭窄型（2例）について

術式は胆管切石術2例のみであった。遺残結石はなく、遠隔成績は2例とも良好であった。

D. 考察

今回の検討により肝内結石症の狭窄型別の治療方針として、無狭窄型に対してはESTまたはPTCSLを施行し、結石が取りきれない場合は胆管切石術を施行する。左胆管狭窄型は肝左葉または肝外側区域切除に

より良好な遠隔成績が得られるため、肝切除術が第一選択となる。右胆管狭窄型に対しては、肝萎縮のある症例には肝切除術が第一選択となるが、肝萎縮がない症例にはまずはPTCSLが第一選択と考える。結石がある程度除去出来れば、狭窄部を含めた肝切除も可能となる。両側肝内胆管狭窄型ではどの治療法を選択しても結石遺残率が高く、予後不良例が多いため、まずはPTCSLのアプローチが第一選択と考えている。

E. 結論

今回の検討により以下のことが判明した。

1. 無狭窄型、下部胆管狭窄型では総胆管切石術により良好な遠隔成績が得られた。
2. 左胆管狭窄型は肝切除により良好な遠隔成績が得られた。
3. 右胆管狭窄型に対する胆管切石術における結石遺残率は高率であり、術後に内視鏡加療を要する例が多かった。
4. 両側肝内胆管狭窄型では結石遺残率が高く、予後不良例が多かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ueno M, Uchiyama K, Ozawa S, Hayami S, Shigekawa Y, Tani M, Yamaue H. Adjuvant chemolipiodolization reduces early recurrence derived from intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(13):3624-31.
2. Uchiyama K, Ueno M, Ozawa S, Kiriyaama S, Shigekawa Y, Hirono S, Kawai M, Tani M, Yamaue H. Combined intraoperative use of contrast-enhanced ultrasonography imaging using a sonazoid and fluorescence navigation system with indocyanine green during anatomical hepatectomy. *Langenbecks Arch Surg*. 2011;396(7):1101-7.
3. Kiriyaama S, Uchiyama K, Ueno M, Ozawa S, Hayami S, Tani M, Yamaue H. Triple positive tumor markers for hepatocellular carcinoma are useful predictors of poor survival. *Ann Surg*. 2011

;254(6):984-91.

4. Uchiyama K, Yamamoto M, Yamaue H, Ariizumi S, Aoki T, Kokudo N, Ebata T, Nagino M, Ohtsuka M, Miyazaki M, Tanaka E, Kondo S, Uenishi T, Kubo S, Yoshida H, Unno M, Imura S, Shimada M, Ueno M, Takada T. Impact of nodal involvement on surgical outcomes of intrahepatic cholangiocarcinoma: a multicenter analysis by the Study Group for Hepatic Surgery of the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2011;18(3):443-52
5. 内山和久, 山上裕機: 血管支配に基づいた系統的肝切除のための工夫. 外科治療 2011;105(4):376-382.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

肝内結石症からの発癌過程における S100ファミリータンパク質の発現動態

研究分担者 中沼 安二 金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 教授

研究要旨：本研究は、(1) 胆管癌の多段階発癌過程における S100ファミリータンパク質の発現動態を免疫染色で検討し、発癌への関与を明らかにすること、および (2) S100ファミリータンパク質の免疫染色が biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) の組織学的グレード分類に有用かどうかを明らかにすることを目的とした。肝内結石症の外科的切除材料40例（うち浸潤癌合併20例）の肝門部を含むホルマリン固定パラフィン包埋切片に対し、S100A2, S100A4, S100A6, S100P に対する 1 次抗体を用いた免疫染色を行った。これら 4 つの分子の細胞質もしくは核における発現は、BilIN-1,2,3から浸潤癌へと異型度が増すにしたがって増加する傾向を示した。染色強度を半定量的に評価した結果、S100P は細胞質と核の両方における発現が、BilIN-2・BilIN-3の群において、反応性異型・過形成・BilIN-1の群より有意に高かった。以上より、肝内結石症からの発癌過程における S100ファミリータンパク質の関与が示唆され、検討した分子のうち、S100P の免疫染色が BilIN の組織診断における診断補助マーカーとして最も有用と考えられた。

A. 研究目的

肝内結石症からの発癌の多くは、慢性胆管上皮傷害を基盤として胆管上皮層内腫瘍 (biliary intraepithelial neoplasia, BilIN) から浸潤癌が発生する多段階の過程を経る。BilIN は上皮の細胞異型、構造異型の程度により BilIN-1 (low-grade), BilIN-2 (intermediate-grade), BilIN-3 (high-grade) にグレード分類される。BilIN のグレード分類は HE 染色標本で行われるが、しばしば分類困難な病変があり、グレード分類に補助的に使用しうる組織染色マーカーの同定が望まれる。

S100ファミリータンパク質は細胞種特異的に発現するカルシウム結合性タンパク質であり、現在まで20種類のサブファミリーが確認されている。その機能は複雑で多岐にわたり、未解明の部分が多く残されているが、例えば S100P は乳癌を含む様々な癌細胞株で発現が亢進しており、RAGE を介して ERK や NF-κB を活性化し、細胞の不死化に関与することが報告されている。

S100ファミリータンパク質のうち、胆管癌や膵管癌では S100A2 や S100A4, S100A6, S100A11, S100P の発現亢進があることが文献的に報告されているが、胆管癌の多段階発癌過程 (BilIN) に着目した研究は少ない。

本研究は、(1) 胆管癌の多段階発癌過程における S100ファミリータンパク質の発現動態を免疫染色で検討し、発癌への関与を明らかにすること、および (2) S100ファミリータンパク質の免疫染色が BilIN の組織学的グレード分類に有用かどうかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

肝内結石症の外科的切除材料40例（浸潤癌合併20例、浸潤癌非合併20例）、および組織学的正常肝（病理解剖例）10例を使用した。肝門部を含むホルマリン固定パラフィン包埋切片に対し、S100A2, S100A4,

S100A6, S100P に対する 1 次抗体を用いた免疫染色を行った。免疫染色で得られた上皮の染色強度を 3 段階で半定量的に評価した。細胞質における染色強度は 2+ (強い発現あり), 1+ (弱～中程度の発現あり), 0 (発現なし)、核における染色強度は 2+ (400倍視野で10%以上の細胞核が陽性), 1+ (400倍視野で10%未満の細胞核が陽性), 0 (発現なし) とした。総計学的検討は Spearman rank correlation によった。

C. 研究結果

正常肝の大型胆管上皮において、細胞質における S100A2, S100A6, S100P の発現はほとんどみられず、S100A4は半数以上の症例が弱く陽性を示した。正常大型胆管上皮の核における発現は、検討した4つの S100ファミリータンパク質のいずれについてもほとんど認めなかった。

肝内結石症では、S100A2, S100A4, S100A6, S100P の細胞質もしくは核における発現は、BilIN-1,2,3から浸潤癌へと異型度が増すにしたがって増加する傾向を示した (図1)。

肝内結石症症例での免疫染色結果の半定量的評価は、大型胆管上皮にみられる反応性異型・過形成と BilIN-1を一つの群、BilIN-2・BilIN-3を一つの群として、この2群間で比較検討した。細胞質における S100A2, S100P の発現、および核における S100A4, S100A6, S100P の発現は BilIN-2・BilIN-3において、反応性異型・過形成と BilIN-1の群より有意に高かった (図2)。

D. 考 察

肝内結石症からの発癌過程において、S100ファミリータンパク質は発現が増加する傾向を示した。これら分子の機能に関する解析は行っていないが、胆管癌の発生過程における S100ファミリータンパク質の関与が示唆された。

検討した4つの S100ファミリータンパク質のうち、

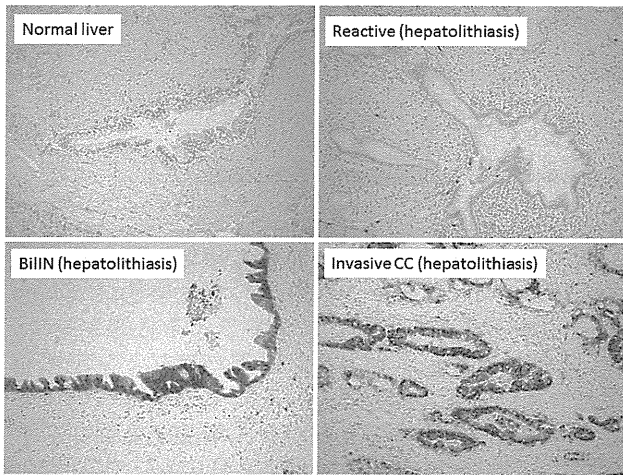


図1 肝内結石症からの発癌過程におけるS100Pの発現(免疫染色)

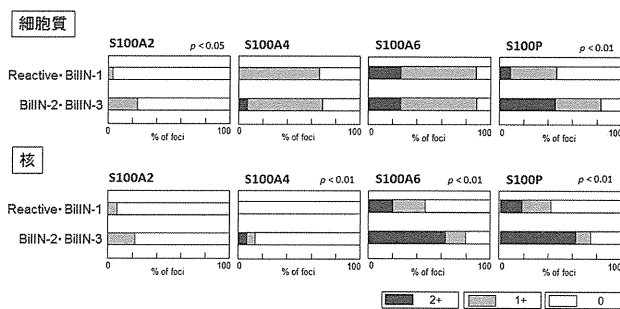


図2 免疫染色の半定量的評価結果

S100Pは細胞質と核の両方における発現が、BiIN-2・BiIN-3群において、反応性異型・過形成・BiIN-1群より有意に亢進していた。このことから、S100ファミリータンパク質の免疫染色をBiINの組織学的グレード分類に応用する場合、S100Pが最も有用と考えられた。

実際のS100Pの免疫染色標本では、BiINではなく明らかに反応性異型とみなされる胆管上皮でも、細胞質や核における強い発現を認める症例が、頻度は高いものの存在していた。この点は実際の病理診断に応用する際、注意する必要がある。

これまでにわれわれは、肝内結石症からの発癌過程において、BiINの異型度の増加とともに上皮におけるp16の発現が低下し、それに相反してEZH2の発現が亢進することを報告している。この結果も加えて、今後、BiINの組織学的な診断基準を作成したい。

E. 結論

肝内結石症からの発癌過程におけるS100ファミリータンパク質の関与が示唆された。S100ファミリータンパク質のうち、S100Pの免疫染色がBiINの組織診断における診断補助マーカーとして最も有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakanuma Y, Sato Y. Cystic and papillary neoplasm involving peribiliary glands: A biliary counterpart of branch-type IPMN? *Hepatology* 2012 (in press)
- 2) Harada K, Shimoda S, Kimura Y et al. Significance of IgG4-positive cells in extrahepatic cholangiocarcinoma: Molecular mechanism of IgG4 reaction in cancer tissue. *Hepatology* 2012 (in press)
- 3) Sato Y, Harada K, Sasaki M et al. Heat shock proteins 27 and 70 are potential biliary markers for the detection of cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 2012;180:123-30
- 4) Sugiyama H, Onuki K, Ishige K et al. Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J Gastroenterol* 2011;46:779-89
- 5) Xu J, Sato Y, Harada K et al. Intraductal papillary neoplasm of the bile duct in liver cirrhosis with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011;17:1923-6
- 6) Nakanuma Y, Xu J, Harada K et al. Pathological spectrum of intrahepatic cholangiocarcinoma arising in non-biliary chronic advanced liver diseases. *Pathol Int* 2011;61:298-305
- 7) Lim JH, Zen Y, Jang KT et al. Cyst-forming intraductal papillary neoplasm of the bile ducts: description of imaging and pathologic aspects. *AJR Am J Roentgenol* 2011;197:1111-20
- 8) Nakanishi Y, Nakanuma Y, Ohara M et al. Intraductal papillary neoplasm arising from peribiliary glands connecting with the inferior branch of the bile duct of the anterior segment of the liver. *Pathol Int* 2011;61:773-7
- 9) Xu J, Sasaki M, Harada K et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma arising in chronic advanced liver disease and the cholangiocarcinomatous component of hepatocellular carcinoma share common phenotypes and cholangiocarcinogenesis. *Histopathology* 2011;59:1090-9
- 10) Yamaguchi J, Sasaki M, Nakanuma Y. The role of histone deacetylase (HDAC) and EZH2 in oncogenesis: epigenetic silencing of tumor suppressors. In: *Cancer, etiology, diagnosis and treatments*. Nova Science Publishers, Inc. New York 2011, PP. 1-27
- 11) 中沼安二, Marylee Hsu, 佐々木素子. 肝内胆管, 胆道, 膵の腫瘍分類: WHOの新たな試みを

含めて、病理・発癌の観点から、肝胆膵 2011;62:17-28

- 12) 中西喜嗣, 近藤哲, 中沼安二. 胆管周囲付属腺と胆管腫瘍発生 - 胆管内乳頭状腫瘍の発生に注目して -. 肝胆膵 2011;62:127-31
- 13) 中沼安二, Hsu Malyee, 佐々木素子ほか. 胆道の病理 (胆嚢を除く) - 膵カウンターパートとの比較を中心に -. 画像診断 2011;31:266-77
- 14) 中沼安二. 胆道の臨床病理 - BilIN を中心として -. 胆道 2011;25:31-42
- 15) 中沼安二, 山口淳平, 佐々木素子ほか. 胆嚢発癌と病理 (合流異常を含む). 外科 2011;73:473-8
- 16) 中沼安二, 佐々木素子, 佐藤保則ほか. 肝門部 ~ 肝内胆管癌の病理. 臨床消化器内科 2011;26:1691-7

2. 学会発表

- 1) Nakanuma Y. Intraductal papillary neoplasia of bile duct. The 7th Asian Pacific IAP Congress
- 2) Harada K, Nakanuma Y. Cholangiocarcinoma and IgG4 reaction. The 7th Asian Pacific IAP Congress
- 3) Nakanuma Y. Intraductal papillary neoplasia of bile duct. Hong Kong IAP
- 4) Nakanuma Y. New classification of intrahepatic cholangiocarcinoma. APASL-STC
- 5) Nakanuma Y, Xu J, Harada K et al. Characteristics of intrahepatic cholangiocarcinoma arising in chronic advanced liver disease and cholangiocarcinoma of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. USCAP
- 6) Igarashi S, Hsu M, Sasaki M et al. Aberrant expression of pancreatic stem cell markers in the biliary tree relates to intrahepatic cholangiocarcinogenesis in hepatolithiasis. USCAP
- 7) Hsu M, Sasaki M, Harada K et al. Sonic hedgehog (SHH) expression in biliary intraepithelial neoplasia (BilIN), peribiliary glands, and intrahepatic cholangiocarcinomas. USCAP
- 8) Harada K, Igarashi S, Hsu M et al. Expression of embryonic development-related molecules and stem cell markers in the biliary intraepithelial neoplasm (BilIN). AASLD
- 9) 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子ほか. 肝内結石症の肝門部・肝内胆管における上皮内癌の出現様式に関する検討. 第100回日本病理学会総会
- 10) 池田博子, 原田憲一, 佐藤保則ほか. 表層進展を示す胆管癌の病理組織学的検討. 第100回日本病理学会総会
- 11) 正田純一, 川本徹, 中沼安二ほか. 糖鎖プロファイリング解析による肝内胆管癌の新規糖蛋白質マーカーの開発. 第47回日本肝臓学会総会
- 12) 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子ほか. 肝内結石症の肝門部・肝内胆管における上皮内癌の出現

様式に関する病理学的検討. 第47回日本肝臓学会総会

- 13) 佐々木素子, 松原崇史, 中沼安二. 粘液産生からみた胆管内乳頭状腫瘍の臨床病理学的検討. 第47回日本胆道学会学術集会
- 14) 五十嵐紗耶, Maylee Hsu, 佐々木素子ほか. BilIN における胎児期関連因子, 幹細胞関連マーカーの発現. 第47回日本胆道学会学術集会
- 15) 佐藤保則, 佐々木素子, 原田憲一ほか. 肝内結石症の肝門部・肝内胆管での上皮内癌の出現様式に関する病理組織学的検討. 第47回日本胆道学会学術集会
- 16) 中西喜嗣, 中沼安二, 大原正範ほか. 肝前区域上行枝と下行枝合流部門脈域内の胆管壁外付属腺から発生した胆管内乳頭状腫瘍の一例. 第47回日本胆道学会学術集会
- 17) 五十嵐紗耶, Maylee Hsu, 佐々木素子ほか. 胆管癌, BilIN における変異型 p53 の発現と K-RAS 遺伝子変異. 第47回日本胆道学会学術集会
- 18) 佐々木素子, 中沼安二. 胆管癌早期診断へのアプローチ. 第52回日本組織細胞化学会総会・学術集会
- 19) 佐々木素子, 松原崇史, 中沼安二. 画像と病理の対比からみた嚢胞形成性胆管内乳頭状腫瘍の臨床病理学的検討. 第39回日本肝臓学会西部会

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

胆汁中の遺伝子発現解析と胆道系悪性腫瘍における発現プロファイルの検討

研究協力者 本多 政夫 金沢大学大学院先端医療技術学講座 教授

研究要旨：肝内結石症は肝内胆管癌の高危険群であるが早期発見に有用な診断法はない。胆汁における microRNA (miRNA) に着目し、腫瘍マーカーとしての可能性を検討した。腫瘍群13例、非腫瘍群11例の胆汁中における380種の miRNA を TaqMan-PCR 法を用いて測定した。クラスター解析により、腫瘍群と非腫瘍群で概ね群別され、胆汁中における miRNA 発現が腫瘍群と非腫瘍群で異なることが明らかとなった。有意変動の大きい miRNA から腫瘍群と非腫瘍群を分ける15個の miRNA が同定できた。さらに、これらの miRNA を用いて新たに腫瘍群17例、非腫瘍群9例の胆汁を用いて検証した。教師付学習法による予測アルゴリズムでは81%の予測率であり、ROC 曲線による AUC も0.94と良好であった。以上より、胆道系腫瘍に特異的な miRNA を同定し、腫瘍マーカー候補を抽出できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝内胆管結石は悪性腫瘍、特に肝内胆管癌の高危険群として認知されている。そのため嚴重な経過観察がなされるが、近年進歩の著しい各種画像診断法によっても早期診断が困難なため、早期発見が難しく進行した状態で発見される症例も多い。従来、腫瘍マーカーとなる蛋白や遺伝子発現の解析には血液もしくは組織サンプルが用いられてきたが、前者には特異的なマーカーが存在せず、後者は採取に侵襲を伴うため汎用可能とは言い難い。肝内胆管癌は肝内胆管より発生する悪性腫瘍であり、胆管に露出していると考えられることから、胆汁中に有用なマーカーが存在する可能性がある。そこで血液中でも安定とされる microRNA (miRNA) に着目し、胆汁中の miRNA の遺伝子発現を解析した。

B. 研究方法

凍結保存されていた胆汁を遠心後得られた上清より、mirVana™ PARIS™ (Ambion, Inc.) を用いて miRNA を抽出した。

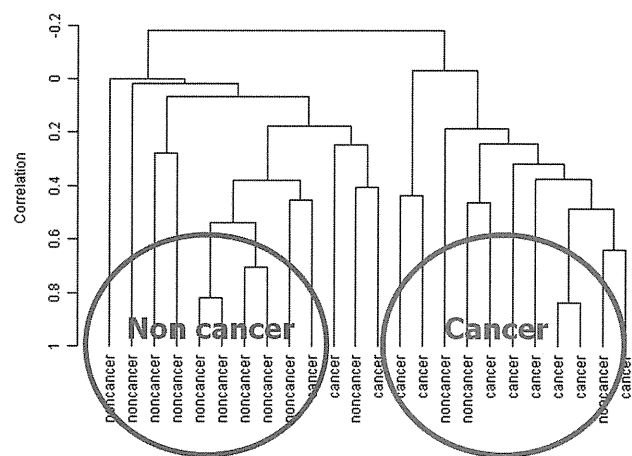
肝内胆管癌を含む胆道系悪性腫瘍13例（腫瘍群）、良性疾患11例（非腫瘍群）より得られた胆汁サンプルを用いて miRNA を抽出し、Megaplex™ Primer Pools (Ambion, Inc.) による逆転写・増幅後、TaqMan™ MicroRNA Array (同) を用いて380種の miRNA に関し発現解析を行った。両群を比較することで胆道系悪性腫瘍における miRNA の発現を検討した。

C. 研究結果

まず、腫瘍群13例、非腫瘍群11例において、380種の miRNA を一期的に発現解析した。380種の miRNA のうち半数以上の症例で発現が認められた miRNA は204個であった。そのうち各症例間で、5倍以上の発現変動を認める miRNA は90個であった。これらの miRNA を用いてクラスター解析を行うと腫瘍群と非腫瘍群で概ね群別され、胆汁中における miRNA 発現が腫瘍群と非腫瘍群で異なることが明らかとなった。

更に、有意変動の大きい miRNA から腫瘍群と非腫瘍群を分ける15個の miRNA が同定できた。うち7個の miRNA が非腫瘍群で増加し、8個の miRNA が腫瘍群で増加していた。

これらの miRNA の中には既報の報告より胆管癌で上昇する miRNA をはじめ、他の癌腫で増加する



miRNA が含まれていた。教師付学習法による予測アルゴリズムでは88%の予測率であった。

さらに、腫瘍群と非腫瘍群を分ける15個の miRNA を用いて新たに腫瘍群17例、非腫瘍群9例の胆汁を用いて検証した。教師付学習法による予測アルゴリズムでは81%の予測率であり、ROC 曲線による AUC も0.94と良好であった。15個の miRNA のうち、腫瘍群と非腫瘍群を分ける有用な2つの miRNA を同定した。

D. 考察

胆汁は血液や体組織とは pH や組成が大きく異なり、また析出物も多く、通常の total RNA は胆汁中に流出した時点で速やかに崩壊するものと考えられる。これに対し、miRNA は通常の total RNA とは異なり非常に短い塩基配列を有する non-coding RNA であり、通常は崩壊するような環境下においても安定し存在し

うるとされている。

胆道系悪性腫瘍合併症例より得られた胆汁を解析し、非腫瘍群の発現プロファイルと比較したところ、腫瘍群と非腫瘍群で miRNA の発現が異なることが明らかとなり、腫瘍群と非腫瘍群を分ける15個の miRNA を同定した。これらの miRNA 用による対照サンプル（腫瘍群13例、非腫瘍群11例）及び検証サンプル（腫瘍群17例、非腫瘍群9例）の判別はそれぞれ、88%、81% と良好であった。さらに2つの miRNA が腫瘍群で増加しており、それぞれ単独で腫瘍群と非腫瘍群の判別に有用であった。

E. 結 論

悪性腫瘍群と非腫瘍群の miRNA を比較検討することで、胆道系悪性疾患に特異的な miRNA を同定し、腫瘍マーカー候補を抽出できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

LC-MS/MSを用いた肝細胞トランスポーター発現の解析

研究協力者 海野 倫明 東北大学消化器外科 教授

研究要旨：肝内結石症の発症には、細菌感染などの胆道感染とそれによる胆管の粘膜障害とともに、肝における胆汁の生成異常、コレステロール合成の亢進と胆汁酸生合成の低下、これらの肝細胞内での輸送や分泌機構の異常など、胆汁酸代謝が深く関与するとされる。我々はLC-MS/MS同時絶対定量法を利用した胆汁酸代謝に関与するトランスポーター、および代謝酵素群の定量法を確立した。今後、本手法を用いて肝内結石症や胆管炎などの各種胆道疾患におけるこれらの発現量の解析を行い、その病態・発症への関与などについて検討をしていきたい。

A. 研究目的

肝内結石症の発症には、細菌感染などの胆道感染とそれによる胆管の粘膜障害とともに、肝における胆汁の生成異常、コレステロール合成の亢進と胆汁酸生合成の低下、これらの肝細胞内での輸送や分泌機構の異常などが関与するとされる。近年、胆汁酸生合成に関与する酵素群や、肝細胞からの分泌に関与するトランスポーターの異常について報告がみられる。

高速液体クロマトグラフィー接続型タンデム質量分析装置（LC-MS/MS）を用いたタンパク質同時絶対定量法は、特異的イオン化ペプチドプローブを用いることにより、微量資料から高感度で複数のトランスポーター及び代謝関連酵素蛋白群を網羅的同時絶対定量することを可能にする。

本研究は、LC-MS/MS同時絶対定量法を胆汁酸に関与するトランスポーターや代謝酵素に応用し、肝切除術後や、閉塞性黄疸、胆道感染などさまざまな病態のなかで、胆汁酸に関与するトランスポーターや代謝酵素がいかに変化するかを網羅的かつ鋭敏に定量し、それらの機能、各種疾患への関与を検討する。さらに、それらの病態の治療や肝機能改善について検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

従来、コール酸の経口投与は肝障害を惹起することが知られていたが、近年マウス実験モデルにおいて、コール酸経口投与が肝細胞増殖を促進する効果が報告され、肝再生に肝での胆汁酸シグナルが深く関与していることが示唆された。（Science.vol312,233-236:2006）

1%コール酸（CA）を5日間経口投与した胆汁酸投与マウスにおいて肝細胞に発現するトランスポーター・胆汁酸合成酵素のタンパク質発現量をLC-MS/MSを用いて定量し、トランスポーターの発現プロファイルを明らかにするとともに、その肝再生メカニズムについて詳細な検討を行うこととした。

C. 研究結果

トランスポーター42種、代謝酵素4種を含む計49分子を標的分子として内部標準ペプチドを設計・作成し、測定を行った。22種の蛋白質について定量を行う

ことができた。

1%コール酸（free feeding）投与群とコントロール群における蛋白質の発現を定量化した。

膜蛋白トランスポーターでは、コール酸投与群でOatp1, Ntcp, Bcrpなどの有意な低下を認めた。また、Mrp2, Bsepではその発現の増加を認めた。代謝酵素では、コール酸投与群でcyp7a1の発現が著明に低下していた。

さらに、1%コール酸（free feeding）投与群では肝容量の増加、肝細胞の分裂像をみとめた。コントロール群に比較し、細胞内GSHの上昇を認め、肝細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

胆汁酸トランスポーター、および代謝酵素群の発現量の変化は従来の報告のように核内レセプターであるFXRの活性化とそれによるターゲット遺伝子の発現変化と考えられた。

胆汁酸を投与した肝臓では細胞自体は増殖を認めたが、血管側膜トランスポーターはその発現が低下しており、基質薬剤の輸送は下がることが予想されることから、薬剤の効果に影響を与える可能性が示唆された。

胆汁酸投与による肝再生促進には合成酵素誘導による肝内GSH濃度の上昇とoatp1の発現減少が寄与している可能性があると考えられた。肝内GSH増加作用のある薬剤は肝再生促進に作用する可能性がある。今後、胆汁酸投与による肝細胞の障害機序、再生促進効果、あるいはGSH合成酵素誘導のメカニズムについて詳細に検討を行っていきたい。

E. 結論

今回、マウス実験モデルにおいて、胆汁酸代謝に関与するさまざまなトランスポーター、代謝酵素について発現の検討を行った。

今後、これらの研究をヒト臨床検体に応用し、肝内結石症や胆管炎などの胆道感染症、先天性胆道拡張症、肝内胆管癌などさまざまな肝胆道系疾患において、細胞膜上に発現するトランスポーターや胆汁酸合成酵素の発現量を定量化し、その病態・発症への関与

について検討していきたいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

三浦孝之, 海野倫明, ほか. 定量標的プロテオミクスを用いた胆汁酸投与によるマウス肝再生促進効果へのトランスポーター発現制御の関与の解明 (第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

肝内胆管障害と G タンパク共役型受容体

研究分担者 田妻 進 広島大学病院 総合内科・総合診療科 教授

研究要旨：肝内結石症において胆汁中で上昇している lysophosphatidylcholine (lysoPC) はアポトーシスを主体とする胆管上皮細胞障害を惹起した。さらに lysoPC は G タンパク質共役型受容体 G2A の発現を誘導し、G2A リガンド9-HODE を併用することで lysoPC による胆管上皮障害の増強を認め、細胞障害の病態への関与が示唆された。

共同研究者

菅野 啓司 広島大学病院 総合内科・総合診療科
大屋 敏秀 中国労災病院 消化器内科

A. 研究目的

肝内結石症において肝内胆管癌の発症が高率であるが、その機序は不明である。同疾患では胆汁中の lysoPC 濃度が有意に上昇していることから、肝内胆管癌発症の病態に寄与していることが推測される。

B. 研究方法

胆管癌細胞株 HuCCT-1 に lysoPC を *in vitro* で添加し、その影響について検討した。

C. 研究結果

lysoPC は 100 μ M の濃度で細胞障害を認め、アポトーシスを誘導を惹起した。アポトーシス経路の検討では extrinsic pathway および intrinsic pathway の両者が関与していた。lysoPC 関連受容体で酸化遊離脂肪酸をリガンドとする G2A に着目して検討したところ、lysoPC の添加は有意に G2A の発現を誘導した。lysoPC と G2A リガンド9-HODE を同時添加すると、lysoPC 単独に比較して有意に細胞障害性が増強した。

D. 考 察

肝内結石症において、胆汁中の phospholipase A2 (PLA2) および lysoPC が上昇していることを勘案すると、胆汁中に豊富に存在する phosphatidylcholine を基質として PLA2 が lysoPC と遊離脂肪酸に加水分解し、前者が G2A の発現誘導に、後者が慢性炎症で酸化され酸化遊離脂肪酸となり G2A のリガンドとして機能し、胆管上皮障害に寄与していることが考えられた。

E. 結 論

肝内結石症において胆汁中で上昇している lysoPC は G タンパク質共役受容体 G2A の発現を誘導し胆管上皮細胞障害を惹起する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

大年加純, 藤田啓子, 埜越崇範, 木村康浩, 木平健治, 岸川暢介, 松田聡介, 生田卓也, 菅野啓司, 田妻進, Lysophosphatidylcholine によるヒト胆管上皮癌細胞株でのアポトーシス誘導機構, 胆道, 2011;25: 637-644

2. 学会発表

Keishi Kanno, Miki Saito, Keiya Nagata, Keiko Fujita, Nobusuke Kishikawa, Takuya Ikuta, Susumu Tazuma, Lysophosphatidylcholine induces apoptotic cell death in biliary epithelial cell: Implication to biliary oncogenesis based upon cholangitis and/or pancreaticobiliary maljunction, American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

胆管癌を標的とするハイブリッドペプチドによる新しいバイオ療法の開発

研究協力者 正田 純一 筑波大学医学医療系 スポーツ医学 教授

研究要旨：胆管癌の治療成績の向上には、新しい有効な治療の開発が必要である。胆管癌細胞に対する新しいバイオ療法として、膜融解性ハイブリッドペプチド IL-4-lytic の抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* モデルにおいて検討した。IL-4-lytic は用量依存性に胆管癌細胞の増殖を抑制した。また、皮下腫瘍モデルにおいても、IL-4-lytic の腫瘍内投与により容量依存性に腫瘍の増大を抑制した。これらの結果より、IL-4-lytic は胆管癌に対する新しいバイオ治療薬として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

本邦ならびに欧米諸国では肝内胆管癌が増加している。また、B型やC型の慢性肝炎に末梢型肝内胆管癌が発生することしばしば報告されるようになった。本腫瘍は早期発見が困難であり、また、進行癌では化学療法や放射線療法に対して抵抗性を示す難治性の消化器癌と位置付けられている。その治療成績の向上には、新しい有効な治療手段を開発していく必要がある。近年、細胞殺傷能力を有するペプチドや強力な抗腫瘍効果を有するペプチドが複数報告されている。川上らは癌細胞表面分子と結合する特異的な「弾頭ペプチド」と癌細胞膜融解による細胞殺傷効果を有する「爆薬ペプチド」を精力的に組み合わせ、抗癌活性を有する「ハイブリッドペプチド」の作製に成功した。そこで、本研究では、胆管癌に対する新しいバイオ療法を確立する目的で、胆管癌の表面分子である IL-4 受容体を標的とし、IL と抗癌ペプチドとの組み合わせにより新規ハイブリッドペプチドを作製した。本ハイブリッドペプチド (IL-4-lytic) の抗癌効果について検証した。

B. 研究方法

5種のヒト胆道癌由来細胞株を用いて *in vitro* 実験を行った。胆道癌細胞株に対する IL-4-PE の細胞障害効果を検討するために、IL-4-lytic を 0-1000 ng/ml の濃度で 24 時間反応させ、WST アッセイ法にて評価した。

また、皮下腫瘍マウスモデルにおける IL-4-lytic の抗腫瘍効果の検討胆嚢癌細胞株を 4 週齢のヌードマウスの皮下に注入し、皮下腫瘍を形成させることにより担癌モデルを作成した。IL-4-lytic の腫瘍内局注群、vehicle の腫瘍内局注群、のモデルマウスで皮下腫瘍の volume を計測し、抗腫瘍効果を評価した。

C. 研究結果

IL-4-lytic を用いて行った細胞障害性実験では、5種の細胞株すべてにおいて IL-4-lytic 濃度依存性に細胞増殖の低下が見られた。一方、IL-4 を欠く lytic のみでは細胞障害性は殆ど認められなかった。本 IL-4-lytic の抗腫瘍効果は IL-4 受容体を介するものと考えられた。

胆道癌細胞株を用いた皮下腫瘍モデルでは、IL-4-lytic の腫瘍内投与により、有意な腫瘍の縮小効果が観察された。また、容量依存性も確認された。

D. 考察

ヒト胆道癌細胞株を用いた IL-4-lytic の抗腫瘍効果の検討では、IL-4-lytic の良好な細胞障害が 5 種中 5 種で認められた。また、皮下腫瘍モデルにおいても、I IL-4-lytic の良好な抗腫瘍効果が観察された。

E. 結論

胆管癌をはじめとする胆道癌においては、IL-4 受容体を標的とするハイブリッドペプチド療法 (IL-4-lytic) は、胆管癌に対する新規バイオ治療としての有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shoda, J., Kawamoto T, Yamamoto, M.: Gallbladder Cancer Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options. In: Gallbladder Cancer, Christopher V Aiello, ed. NOVA Science Publishers, New York, 2012, In press.

Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Tokushige K, Ueda T, Harada N, Taguchi K, Hashimoto E, Itoh K, Ishii T, Utsunomiya H, Yamamoto M, Shoda J: Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. J Gastroenterol 2012, In press.

Yamanashi Y, Takada T, Shoda J, Suzuki H.: Novel Function of Niemann-Pick C1-Like 1 as a Negative Regulator of Niemann-Pick C2 Protein. Hepatology 2012, In press.

Shoda, J., Ishige, K., Sugiyama, H., Kawamoto, T.: Biliary tract carcinoma: clinical perspective on

molecular targeting strategies for therapeutic options. JHBPS 2012, In press.

Kishida M, Ishige K, Horibe K, Tada N, Koibuchi N, Shoda J, Kita K, Kawakami K. Orexin 2 receptor as a potential target for the immunotoxin and antibody-drug conjugate cancer therapy. *Oncology Letters* 3 : 525-529, 2012.

Yamanashi, Y., Takada, T., Yoshikado, T., Shoda, J., Suzuki, H.: Biliary NPC2 regulates biliary cholesterol secretion via stimulation of ABCG5/G8-mediated cholesterol transport. *Gastroenterology* 140:1664-1674, 2011.

Sugiyama, H., Onuki, K., Ishige, K., Baba, N., Ueda, T., Matsuda, S., Takeuchi, K., Onodera, M., Nakanuma, Y., Yamato, M., Yamamoto, M., Hyodo, I., Shoda, J.: Potent In Vitro and In Vivo Antitumor Activity of Sorafenib Against Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cells. *J Gastroenterol* 46:779-789, 2011.

2. 学会発表

岡田浩介, 正田純一, 藤 栄治. 転写因子 Nrf2はメチオニンコリン欠乏食誘発脂肪性肝炎の発症を抑制する. 第97回日本消化器病学会総会 (東京), 2011.

岡田浩介, 正田純一, 山本雅浩. インチンコウ湯は転写因子 Nrf2を活性化し, 生体の抗酸化ストレス応答機構を賦活する. 第97回日本消化器病学会総会 (東京), 2011.

岡田浩介, 正田純一, 山本雅浩. インチンコウ湯は転写因子 Nrf2を活性化し, 生体の抗酸化ストレス応答機構を賦活する. 第97回日本消化器病学会総会 (東京), 2011.

岡田浩介, 杉本浩一, 正田純一, 堀江正樹, 藤 栄治, 石井哲郎, 山本雅之. 動脈硬化+高脂肪食誘発脂肪性肝炎における転写因子 Nrf2の役割. 第47回日本肝臓学会総会 (東京), 2011.

正田純一, 川本 徹, 中沼安二, 山本雅一, 大河内信弘, 松田厚志, 久野 敦, 池原 譲, 平林 淳, 成松 久. 糖鎖プロファイリング解析による肝内胆管癌の新規糖蛋白質マーカーの開発. 第47回日本肝臓学会総会 (東京), 2011.

小貫建一郎, 川本 徹, 太田岳洋, 山本雅一, 杉山弘明, 石毛和紀, 三善英知, 正田純一. 胆嚢癌における糖転移酵素 N-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT-V) 発現とその生物学的意義. 第47回日本胆

道学会学術集会 (宮崎), 2011.

岡田浩介, 正田純一, 藤 栄治. 転写因子 Nrf2は動脈硬化+高脂肪食誘発脂肪性肝炎の脂肪酸代謝修飾による肝脂肪蓄積を抑制し, 肝病変の発症と進展を防御する. 第15回日本肝臓学会大会 (福岡), 2011.

岡田浩介, 正田純一, 徳重克彦. 転写因子 Nrf2はメチオニンコリン欠乏食誘発脂肪性肝炎の発症を抑制する. 第15回日本肝臓学会大会 (福岡), 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 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

書籍

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
阿部雅則, 恩地森一	自己免疫性肝炎	高橋信一	消化器診療ガイドライン第2版	総合医学社	東京	2011	174-177
石橋大海, 下田慎治, 中村 稔	原発性胆汁性肝硬変	高橋信一	消化器診療 最新ガイドライン第2版	総合医学社	東京	2011	168-173
石橋大海, 下田慎治, 中村 稔	第6章 自己免疫性肝障害の診断と治療, 原発性胆汁性肝硬変の成因と発症機序.	戸田剛太郎 他	消化器疾患の最新医療, 先端医療シリーズ42「消化器疾患の最新医療」	(株) 寺田 国際事務所 ／先端医療 技術研究所	東京	2011	114-117
鈴木義之	⑤ B型慢性肝炎の治療 b) ラミブジン	虎の門病院 肝臓センター	これだけは知っておきたい B型慢性肝炎の診断と治療	医薬ジャーナル社	東京	2011	54-62
宮本康弘, 吉田雄一, 小野寺美緒, 片岡晃二郎, 柿坂啓介, 及川寛太, 熊谷一郎, 黒田英克, 宮坂昭生, 滝川康裕, 鈴木一幸	劇症肝炎に対する人工肝補助療法の有効性と再生治療の必要性	市田隆文	第37回日本急性肝不全研究会 急性肝不全 今, 何が討論され, 問題になっているのか	アークメディア	東京	2011	33-37
藤原慶一, 横須賀收	難治性急性肝不全の診断・内科的治療に関する考察.	市田隆文	急性肝不全 - 今, 何が討論され, 問題になっているのか	アークメディア	東京	2011	24-32
井上和明	急性肝不全・劇症肝炎での対応	真弓俊彦	レジデントノート増刊「知りたい」に答える! ICUでの重症患者管理	羊土社	東京	2011	1862-1866
田妻 進	胆石症・胆道炎・胆道がんMAP図表で見る胆石症・胆道炎・胆道がん	田妻 進	新しい診断と治療のABC71	最新医学	東京	2011	別冊
正田純一	胆石症 概念・定義と疫学	田妻 進	胆石症・胆道炎・胆道がん	最新医学社	大阪	2011	13-25
Shoda J, Kawamoto T, Yamamoto M	Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options	Christopher V Aiello	Gallbladder Cancer	NOVA Science Publishers	New York	2011	In press