

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

肝内胆管癌偽陽性症例の調査研究

研究協力者 森 俊幸 杏林大学 消化器・一般外科 教授

研究要旨：術前に肝内胆管癌を強く疑い手術を施行し、術後の最終病理診断で癌を認めなかった症例を「肝内胆管癌偽陽性症例」と定義し、その臨床病理像を検討する。肝内結石症を背景に発生する肝内胆管癌は診断が困難であり、時に上記の様な肝内胆管癌偽陽性症例に遭遇する。また肝内結石症を背景としない肝内胆管癌偽陽性症例も少数ながら存在する。これらの症例を検討することにより、肝内結石の炎症像や線維化の癌診断への影響を把握し、肝内結石症治療成績の改善を目指す。

A. 研究目的

肝内結石症の有無を問わず肝内胆管癌偽陽性症例の臨床病理像を検討し、肝内結石の有無による炎症像や線維化、過形成、腺腫等の相違・特徴を把握することによって、肝内結石症を背景として発生する肝内胆管癌診断精度の向上をはかり、肝内結石症の治療成績改善を目指す。

B. 研究方法

厚生労働省難治性肝・胆道疾患に関する調査研究班肝内結石症分科会所属施設、及び日本胆道学会評議員所属施設を対象施設とし、肝内胆管癌偽陽性症例の詳細な臨床病理像に関する個別調査を行う。調査項目は、患者背景（年齢、性別、居住地、嗜好、既往歴）、肝内結石の有無・病状（診断日、臨床症状、分類（IE分類、LR分類）、胆管狭窄・拡張、肝萎縮の部位、結石種類）、合併症、術前肝内胆管癌診断根拠（画像・病理）、術式、病理像、治療後の症状、転帰。非肝内結石症例においても、結石に関する項目を除き同様の調査を行う。

これらの症例を比較検討し、肝内胆管癌偽陽性症例の特徴を把握する。

(倫理面への配慮)

本研究は後ろ向き観察研究であり被験者において健康被害が生ずることはないが、個人情報や情報開示に関する問題を抱えているため、説明文書作成し、被験者に対してインフォームド・コンセントを常に行える体制を整え、自由意思の確保を最優先する。

C. 研究結果

肝内胆管癌疑陽性症例の特徴

- ・高齢男性・左葉例が約70%
- ・肝内結石合併例・胆道治療歴・肝萎縮・腫瘍マーカー異常例は15~25%
- ・生検施行例6%, 細胞診施行例25%
- ・葉切除が約70%
- ・肝不全等の重大な合併症はなく、手術関連死亡も無し
- ・肝内結石の有無による特徴はなし

D. 考察

画像所見・病理所見を検討中

E. 結論

同上

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

同上。

2. 学会発表

横山政明 森俊幸 鈴木裕 中里徹矢

松岡弘芳 阿部展次 正木忠彦

杉山政則 中沼安二 肝内胆管癌偽陽性症例の調査研究 日本胆道学会 東京 2013

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

胆道再建術後肝内結石症に対する内視鏡的治療

研究協力者 露口 利夫 千葉大学大学院医学研究院 消化器・腎臓内科学 講師

研究要旨：近年原発性肝内結石症は減少傾向にあるものの2次性肝内結石症は従来と同様経験され原発性同様難治性であることが多い。胆道再建術後の肝内結石症に対しては従来経皮経肝胆道鏡（PTCS）による治療が行われてきた。近年ではダブルバルーン（DBE）もしくはシングルバルーン内視鏡による ERCP が普及してきており当科でも Roux-en-Y 吻合術後肝内結石症に対してダブルバルーン ERCP を導入している。2009年から2013年までに13症例に対して延べ27件のDBE-ERCPを施行した。胆道再建の背景疾患は良性疾患が9例、悪性疾患が4例であった。結石除去には成功しているが再発、胆管炎を繰り返す症例がありPTCS同様根治性には難点が認められた。良性疾患では先天性胆道拡張症術後例が多く吻合部狭窄だけでなく拡張胆管に結石が再発することが再発の要因と考えられた。

A. 研究目的

日本消化器病学会・胆石症診療ガイドラインにおいて胆道再建術後肝内結石症は経皮経肝胆道鏡（PTCS）の適応とされている。しかし近年ではダブルバルーン（DBE）もしくはシングルバルーン（SBE）内視鏡による ERCP が普及してきており PTCS の臨床的位置づけも再考する必要がある。当科では2009年よりDBE-ERCPを導入しており肝内結石症に対する成績を検討した。

B. 研究方法

2009年3月より2013年7月まで当科で経験した13例（延べ27回の検査）の胆道再建術後肝内結石症を対象とした。男女比9対4，平均年齢51.8歳，道再建術例はいずれもRoux-en-Y法であり，背景疾患は先天性胆道拡張症術後3例，IgG4関連疾患術後2例，良性疾患術後4例，悪性疾患術後4例であった。4例ではPTCSによる治療歴を有していた。

本研究では内視鏡的治療時に文書による検査同意が得られており，臨床研究に関する倫理指針，医薬品の臨床試験の実施基準（GCP）を準用するものとした。また，ヘルシンキ宣言の精神に基づいて実施した。

C. 研究結果

延べ27回のDBE-ERCPが行われ目的とするドレナージ，結石除去（不完全切石を含む）に25回（92.6%）で成功した。2回の不成功理由は1) DBEが消化管癒着のため乳頭部に到達できなかった，2) 十二指腸乳頭部進行癌のためスコープの通過ができなかった2件であった。結石再発のため複数回DBE-ERCPを施行した例は13例中5例であり，3例では延べ3回以上DBE-ERCPを施行した。頻回再発した3例の背景疾患はいずれも良性疾患であった（IgG4関連疾患，先天性胆道拡張症術後，黄色肉芽腫性胆管炎術後）。結石再発，狭窄悪化に対してのDBE-ERCPは初回同様に成功している。

なお，PTCSの治療歴を有する4例の患者さんに次回はDBE-ERCPとPTCSのどちらを選択するか質問

したところ4例ともDBE-ERCPを希望された（表1）。

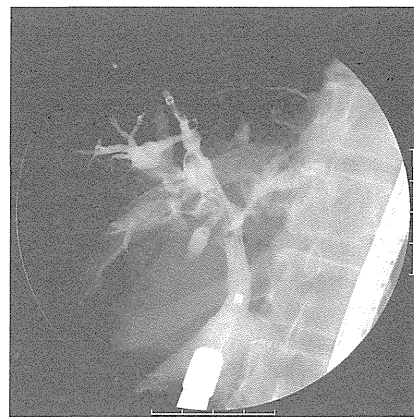


図1a 初回のDBE-ERCP

47歳女性。先天性胆道拡張症術後肝内結石症のためPTCSにより繰り返し治療していたがDBE-ERCPにより結石除去した（図1a）。



図1b 結石再発に伴う5回目のDBE-ERCP

結石再発をその後も繰り返すためDBE-ERCPをその都度施行している。5回目（初回から2年後）の検査時の像である（図1b）。

表1. GRADE システムからみた DBE-ERCP と PTCS の比較

	DBE-ERCP	PTCS
エビデンスの質	C (very low)	C (low)
技術的難易度	Very difficult	Relatively easy
患者の価値観と好み	Good	No
コスト	Good (short hospital stay)	Bad

D. 考 察

胆道再建術後肝内結石症に対しては PTCSL で結石除去を行うことが標準的治療とされてきた。しかし、PTCS では結石除去に成功しても肝内胆管狭窄や肝葉萎縮があれば結石再発、肝内胆管癌を発症するリスクが高く長期的には肝葉切除の予後が良好であることが知られている。胆道再建術後の手術は多次手術となるため患者本人が手術を希望しないことも多い。PTCS は瘻孔作成に伴う胆汁の漏れやチューブの逸脱の問題など無視できない問題であり患者さんの嗜好からは好ましくない。診療ガイドライン作成に用いられることが多くなった GRADE システムではエビデンスの質だけでなく患者の価値観と好みも評価して推奨度を決定するようになっている。DBE-ERCP と PTCS を比較するとエビデンスの質や技術的難易度では PTCS が優れているものの患者の嗜好では DBE-ERCP が勝っている。当科でも 4 例は PTCS による治療歴があり DBE-ERCP と比較したところ全員が DBE-ERCP が好ましいと答えられた。また、PTCS では瘻孔作成に時間を要するため入院期間が長くなるが DBE-ERCP では一回の内視鏡治療で済めば約 1 週間での退院が可能となる。コスト面からも DBE-ERCP が優れていると考えられる。DBE-ERCP は技術的に難しいことや装置自体が普及していないこと、また、結石除去に必要な専用の処置具や狭窄拡張用バルーンなどが整っていないことなど周辺機器の開発が必須である。従って現時点では DBE-ERCP と PTCS のどちらを選んでも間違いではなく各施設において得意とする方法を選択すべきである。

DBE-ERCP は臨床応用されて間もない治療法であり肝内結石症治療におけるエビデンスは今後を待たなくてはならない。今回の報告でも結石除去後の結石再発が 13 例中 5 例（3 例では再々治療）に生じている。結石除去を行っても根治性には乏しく再発を来しやすいことは PTCS 同様である。胆管狭窄や肝葉萎縮があれば結石除去にこだわる必要はなく肝切除を含めた外科的治療を考慮すべきである。

E. 結 論

胆道再建術後例に対する DBE-ERCP は結石除去に有効であり、患者への負担の少ない新しい治療法である。しかし、結石再発の頻度は PTCS と変わりなく胆管狭窄や肝葉萎縮に対しては従来どおり肝切除を考慮すべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

露口利夫, 杉山晴俊, 酒井裕司, 他: 無症状肝内結石症の予後と治療適応について. 胆と膵 34(11), 1139-1142, 2013

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

研究要旨：肝内結石症は胆管癌の確立された危険因子であり、5%前後の症例に肝内胆管癌を合併するとされる。近年、癌とオートファジーの関連性が指摘されているが、胆管癌におけるオートファジーの役割についてはいまだ報告がない。また、癌の悪性度において EMT の関与が報告されており、オートファジーとの関連性も想定される。今回われわれは胆管癌におけるオートファジー分子発現と EMT の関連性について検討した。胆管癌細胞株で TGF- β を用いて EMT を誘導し、オートファジー阻害剤の添加の有無による EMT 関連遺伝子の発現量を real time PCR にて比較検討したところ、オートファジー阻害剤添加群での EMT 関連遺伝子 (vimentin) の発現低下が有意に認められた。また、65例の胆管癌手術検体を用いてオートファジーおよび EMT 関連分子の発現を免疫組織化学的に検討したところ、オートファジー関連分子 ambra-1 と EMT 転写因子の snail に有意な関連性を認めた。以上より、胆管癌においてオートファジーと EMT の相互関連性が示唆され、胆管癌の発癌・進展にはオートファジーの関与が考えられた。

A. 研究目的

肝内結石症では5%前後の症例に胆管癌を合併する。近年、癌の発癌・進展に関して Epithelial Mesenchymal transition (EMT) の関与が報告されている。EMT は、腫瘍の浸潤癌形成に際して上皮細胞が間葉系細胞へとその形態・機能に移行させる現象を指し、様々な癌における発癌・進展に関与することが報告されている。以前にわれわれは胆管癌細胞株および胆管癌手術材料を用いた *in vitro/in vivo* の実験系で胆管癌における EMT の関与について検討を行っており、他癌腫と同様に、胆管癌の悪性度には TGF- β 経路による EMT が密接に関わるとの知見を得ている (Sato Y. et al. AJP 2010)。

最近、EMT とオートファジーの関連性が指摘されている。オートファジーは細胞内分解システムの総称であり、細胞質内の不要な物質を除去すると同時に、その分解産物を栄養素として細胞に供給するという2つの役割を持つ。オートファジーはその役割の二面性と分解基質の幅広さから、数多くの生命現象に関わることが明らかになってきており、腫瘍との関連性についても指摘されている。癌細胞は活発な増殖を続けるため栄養需要が高く、オートファジーによって栄養を確保している可能性が指摘されており、この観点から癌の発癌・進展に関与する EMT との相互関係性 (分子間の crosstalk) が示唆されてきている。現在、欧米を中心として癌細胞のオートファジー依存性を標的とした癌治療 (オートファジー阻害剤による癌治療) が臨床試験の段階で進行しているが、オートファジーの発癌・浸潤における役割についてはいまだ不明な点が多く残されており、実地臨床への適応には副作用などの点からもハードルが高くなっている。癌の発癌・浸潤メカニズムにおけるオートファジーの役割を解明することは、こういった癌におけるオートファジーの臨床応用の進展に結びつく可能性がある。よって本研究は、胆管癌におけるオートファジーと EMT の相互関係性を検討することでオートファジーの発癌・浸

潤における役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

まず、胆管癌細胞株 (CCKS-1 と HuCCT-1) を用いた *in vitro* の実験系として、飢餓条件下でのオートファジー誘導の証明を Western blotting と免疫蛍光染色にて検討した。飢餓条件としては Earle's balanced salt solution (EBSS; 無血清・無アミノ酸培地) を使用した。オートファジー誘導の証明としては、オートファジーフラックスアッセイを行い、オートファジーの代表的マーカーである LC3B とリソソーム分解酵素阻害剤のクロロキンを使用して LC3B の蛋白発現変化量の検討を行った。また、LC3B を標的とした免疫蛍光染色を行い、細胞質のドット状シグナルの検出を行った。

次にオートファジーと EMT の関連性について、invasion assay と real-time PCR の手法を用いて検討を行った。オートファジーの浸潤能への影響として、matrigel invasion chamber を用いた浸潤能評価を行った。コントロールと、TGF- β によって EMT を誘導した群と、TGF- β にオートファジー阻害剤 (クロロキン・3MA) を投与した群の3つで48時間後の浸潤腫瘍細胞数の比較検討を行った。また、同様に TGF- β とオートファジー阻害剤を組み合わせた群で72時間後に RNA を回収して real-time PCR を行い、EMT 関連分子の遺伝子発現量に変化が生じるかを検討した。結果の統計学的解析には Mann-Whitney's U test を使用した。

組織学的検討としては、1998年から2012年の14年間に金沢大学および関連病院外科にて切除された胆管癌 (浸潤癌) 65症例を対象として、代表的なオートファジーと EMT マーカーを標的とした免疫染色を行った。オートファジーマーカーとしては、LC3B, beclin-1, Bif, ambra-1, EMT マーカーとしては、snail, CK19, vimentin, E-cadherin, S100A4 に対する1次抗体を使用した。染色結果は染色強度 (3段階)

と染色割合（5段階）の両者を踏まえた半定量的評価を行い、Fisher's exact test ないしは Chi-square test による統計学的解析を行った。

C. 研究結果

胆管癌細胞株（CCKS-1とHuCCCT-1）にてEBSSでの飢餓条件（6時間）でオートファジーマーカーであるLC3B（type II）の増加が認められた（図1）。

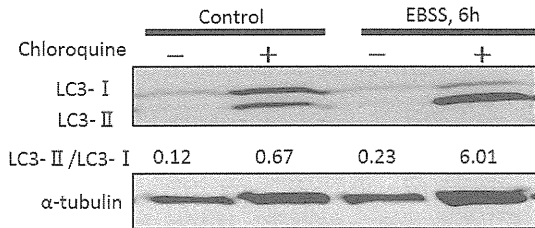


図1 Autophagy flux assayの結果

また、免疫蛍光染色でもEBSSの飢餓条件下でLC3Bのドット状シグナルの増加が統計学的有意に認められた（図2）。

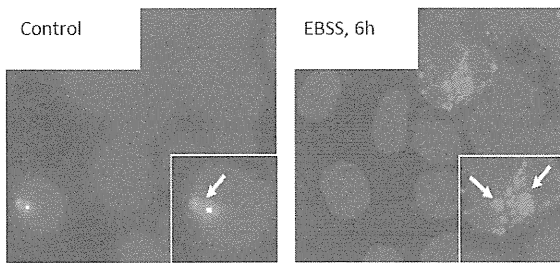


図2 LC3B免疫蛍光染色の結果
(矢印：LC3Bドット状シグナル)

Invasion assayでは胆管癌細胞株においてTGF- β 投与群で浸潤能の明らかな亢進があり、クロロキンと3MAのオートファジー阻害剤にて浸潤能の低下を認めた（図3）。

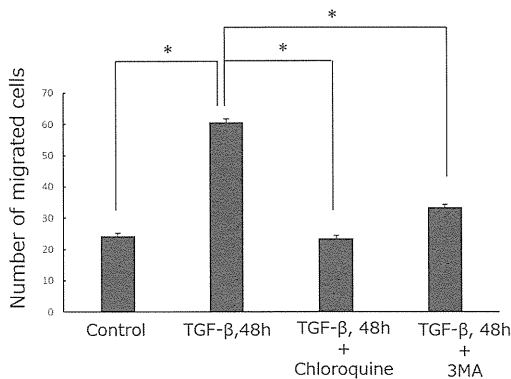


図3 Invasion assayの結果（*：p<0.05）

Real-time PCRでは、TGF- β によりEMTが誘導され上昇したvimentinがオートファジー阻害剤のクロロキンにより低下を示す結果が得られた（図4）。

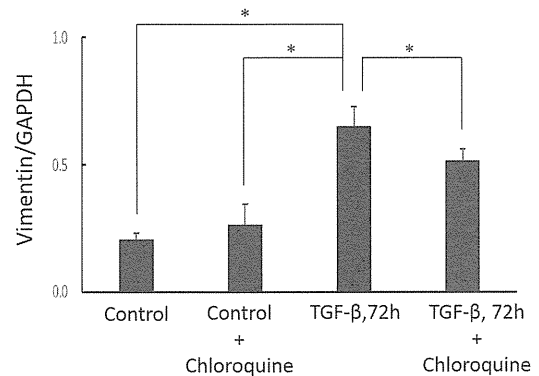


図4 Real-time PCRの結果（*：p<0.05）

胆管癌（浸潤癌）手術材料65症例を用いた免疫染色では、オートファジー関連マーカーはいずれも細胞質に陽性に染色された（図5）。

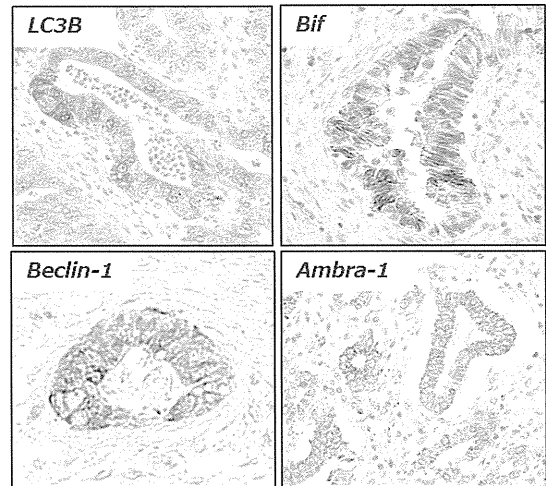


図5 オートファジー関連マーカー免疫染色の結果

オートファジーマーカーとEMTマーカー発現の関連性について分割表分析にて検討したところ、オートファジーマーカーのambra-1とEMT誘導転写因子のsnailの発現が統計学的有意に関連性を示した（p=0.0315）。

D. 考察

今回の検討結果から、胆管癌細胞株にてオートファジーの誘導が証明され、オートファジー阻害剤を用いて胆管癌細胞株でのオートファジーをブロックすると、EMTの特徴である腫瘍細胞浸潤能の低下、および間葉系マーカーvimentinの低下を認めた。これはオートファジーをブロックすることでEMTを抑制できることを示唆しており、EMTとオートファジーの

関連性を示すひとつの結果と考えられた。また、胆管癌手術材料を用いた免疫染色の結果から、オートファジーマーカーと EMT マーカーの発現には統計学的有意な関連性が認められ、組織学的検討からも EMT とオートファジーの関連性が想定された。

E. 結 論

胆管癌においてオートファジーと EMT 現象には相互関連性があり、胆管癌の発癌・進展にはオートファジーの関与が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hsu M, Sasaki M, Igarashi S, Sato Y, Nakanuma Y. KRAS and GNAS mutations and p53 overexpression in biliary intraepithelial neoplasia and intrahepatic cholangiocarcinomas. *Cancer* 2013;119:1669-74.
2. Sasaki M, Matsubara T, Yoneda N, Nomoto K, Tsuneyama K, Sato Y, Nakanuma Y. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 and MUC1 may be related to malignant behaviour in intraductal papillary neoplasm of the bile duct. *Histopathology* 2013;62:446-57.
3. Sato Y, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y. Histological characteristics of biliary intraepithelial neoplasia-3 and intraepithelial spread of cholangiocarcinoma. *Virchows Arch* 2013;462:421-7.
4. Gandou C, Harada K, Sato Y, Igarashi S, Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y. Hilar cholangiocarcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma share similar histopathologies, immunophenotypes, and development-related molecules. *Hum Pathol* 2013;44:811-21.
5. Sato Y, Sasaki M, Harada K, Aishima S, Fukusato T, Ojima H, Kanai Y, Kage M, Nakanuma Y, Tsubouchi H. Pathological diagnosis of flat epithelial lesions of the biliary tract with emphasis on biliary intraepithelial neoplasia. *J Gastroenterol* 2013 Apr 25. [Epub ahead of print].
6. Sato Y, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y. Clinicopathological significance of S100 protein expression in cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:1422-29.
7. Igarashi S, Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y. Participation of peribiliary glands in biliary tract pathophysiology. *World J Hepatol* 2013;5:425-32.
8. Sato H, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Hirano K,

Nakanuma Y. Metachronous intracystic and intraductal papillary neoplasms of the biliary tree. *World J Gastroenterol* 2013;19:6125-6.

9. Sasaki M, Matsubara T, Nitta T, Sato Y, Nakanuma Y. GNAS and KRAS mutations are common in intraductal papillary neoplasms of the bile duct. *PLoS One* 2013;8:e81706
 10. 中沼安二, 佐々木素子, 佐藤保則. 早期胆道癌 (胆嚢と胆管) の分子病理. *肝胆膵* 2013;66:171-80.
 11. 佐々木素子, 中沼安二. K-ras. *臨床検査* 2013;57:256-61.
 12. 佐藤保則, 中沼安二. 胆管内乳頭腫瘍 (IPNB) と胆管上皮腫瘍性病変 (BiIN) の診断と意義. *病理と臨床* 2013;31:237-44.
 13. 中西喜嗣, 中沼安二, 河上洋, 松本譲, 新田健雄, 佐藤保則, 平野聡. IPMN と IPNB : 前腸由来臓器に発生する乳頭状腫瘍の疾患理解. *肝胆膵* 2013;66:691-700.
 14. 中沼安二, 佐藤保則. 胆管・胆嚢の組織学的基礎 - 胆管での粘液産生と胆管周囲付属腺について -. *胆と膵* 2013;34:347-52.
 15. 中沼安二, 佐々木素子, 佐藤保則, 原田憲一. 胆道癌の病理診断. *消化器外科* 2013;36:1097-108.
 16. 佐藤保則, 中沼安二. 肝内結石症の胆道発癌 - 病理学的立場から. *胆と膵* 2013;34(11):1145-52.
- ### 2. 学会発表
1. Nakanuma Y. Plenary session cholangiocarcinoma: Hilar cholangiocarcinoma and pancreatic duct adenocarcinoma show similar phenotypes and behaviors. *Laennec Liver Pathology Society Annual Meeting*
 2. Nakanuma Y. Diagnostic procedures of biliary intraepithelial neoplasm. *Seminar in Tokyo International Diagnostic Pathology*
 3. Nakanuma Y. Hilar cholangiocarcinoma resembles pancreatic duct adenocarcinoma pathologically - Suggestions of similar background and development -. *Asian International Academy of Pathology*.
 4. Sato Y, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y. Histological characterization of biliary intraepithelial neoplasia with respect to pancreatic intraepithelial neoplasia. *American Association for the Study of Liver Diseases*.
 5. Sasaki M, Matsubara T, Sato Y, Norihide Y, Nakanuma Y. GNAS and KRAS mutations are common in intraductal papillary neoplasm of the bile duct. *American Association for the Study of Liver Diseases*.
 6. 中沼安二. 教育講演 : 胆道の病理. 第72回日本放射線学会総会
 7. 中沼安二. 肝嚢胞性腫瘍の最近の考え方. 第8回分子標的治療学会
 8. 佐藤保則, 中沼安二. 分枝型胆管内乳頭状腫瘍

- (IPNB, branch type) の概念とその組織発生. 第102回日本病理学会総会
9. 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子, 中沼安二. BillN と PanIN の異同に関する組織学的比較検討. 第102回日本病理学会総会
 10. 佐々木素子, 松原崇史, 佐藤保則, 中沼安二. 胆管内乳頭状腫瘍 intraductal papillary neoplasm of the bile duct における GNAS, KRAS 遺伝子変異の検討. 第40回日本肝臓学会西部会
 11. 原田憲一, 池田博子, 佐藤保則, 中沼安二. 胆管癌 および biliary intraepithelial neoplasia (BiIIN) における glucose transporter1 の発現. 第40回日本肝臓学会西部会
 12. 新田健雄, 中沼安二, 佐藤保則, 佐々木素子, 原田憲一, 平野聡. 胆管内乳頭状腫瘍における HepPar I 発現の検討. 第40回日本肝臓学会西部会
 13. 任香善, 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子, 中沼安二. 胆道癌における SOX9 の発現に関する免疫組織化学的検討. 第49回日本肝臓学会
 14. 任香善, 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子, 中沼安二. 肝門部胆管癌, 肝内胆管癌, 混合型肝臓癌における胆管上皮層内腫瘍性病変 (BillN) の出現頻度の比較検討. 第49回日本肝臓学会
 15. 原田憲一, 佐藤保則, 中沼安二. IgG4関連硬化性胆管炎に出現する Biliary intraepithelial neoplasia (BillN) 病変. 第49回日本肝臓学会
 16. 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子, 中沼安二. 胆管周囲付属腺の上皮層内増殖性病変に関する病理組織学的検討. 第49回日本肝臓学会
 17. 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子, 中沼安二. BiIIN と PanIN の病理組織学的特徴に関する比較検討. 第99回日本消化器病学会総会
 18. 中沼安二. WHO 新分類による胆道癌の前癌病変および初期癌病変. 第49回日本胆道学会学術集会
 19. 佐々木素子, 中沼安二. 胆管内乳頭状腫瘍 (Intraductal papillary neoplasm of the bile duct; IPNB) の病理. 第49回日本胆道学会学術集会
 20. 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子, 中沼安二. BiIIN と PanIN の異同に関する病理組織学的検討. 第49回日本胆道学会学術集会
 21. 原田憲一, 佐藤保則, 佐々木素子, 中沼安二. IgG4関連硬化性胆管炎に見られる BiIIN 病変の解析. 第49回日本胆道学会学術集会

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 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

胆汁中リゾリン脂質の胆管上皮細胞に対する細胞障害と発癌に関する検討

研究協力者 田妻 進 広島大学病院 総合内科・総合診療科 教授

研究要旨: 肝内結石症は高率に胆道悪性腫瘍を合併する。同疾患の胆汁中で上昇しているリゾフォスファチジルコリン (lysoPC) の胆管上皮細胞に対する影響を *in vitro* で検討したところ、酸化ストレスの産生を誘導し、酸化的な DNA 傷害を惹起した。さらに、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現の検討では、発癌に関するパスウェイ遺伝子の顕著な発現の変化を認めた。

A. 研究目的

肝内結石症は高率に肝内胆管癌を合併するが、その詳細なメカニズムは不明である。同疾患において胆汁中 lysoPC が上昇していることから、発癌に寄与しているものと考え、胆管上皮細胞に対する影響について検討した。

B. 研究方法

In vitro で不死化胆管上皮細胞株 MMNK-1 に lysoPC を添加し、酸化ストレスの産生、DNA 傷害に注目して検討した。

C. 研究結果

lysoPC はアポトーシスを主体とする細胞障害を惹起し抗酸化剤 NAC の同時添加で抑制された。lysoPC は活性酸素種 (ROS) の産生を濃度依存性に誘発し、NADPH oxidase 阻害剤の同時添加にて抑制された。脂質過酸化の指標として TABRS を評価したところ、lysoPC にて有意な上昇を認めた。さらに酸化 DNA 傷害の指標 8-OHdG も有意に上昇した。マイクロアレイ解析のパスウェイ解析にて、発癌・アポトーシス・DNA 傷害に関する遺伝子の発現変化を多く認めた。

D. 考察

lysoPC は胆管上皮細胞に対し酸化ストレスを介したアポトーシス主体の細胞障害を惹起する一方で、酸化 DNA 傷害を誘発し、発癌に寄与している可能性が示唆された。

E. 結論

胆汁中 lysoPC の上昇は胆管上皮細胞の細胞障害と発癌に寄与する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Fujita K, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2013.in press

2. 学会発表

・ Sugiyama A, et al. Lysophosphatidylcholine induces

apoptotic cell death in biliary epithelial cell: Implication to biliary oncogenesis associated with pancreaticobiliary maljunction. Falk Symposium (Wien, Austria). September 2012.

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 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

胆管癌の新規糖蛋白質マーカーの開発と簡易測定キットによる測定

研究協力者 正田 純一 筑波大学医学医療系 医療科学 教授

研究要旨：高感度糖鎖プロファイリング解析により、レクチン WFA が肝内胆管癌の癌部上皮に特異的に増加することが判明した。また、MUC1が WFA のキャリアー蛋白であると推測された。レクチン-MUC1抗体による簡易サンドイッチアッセイ系を構築したところ、従来の胆管癌マーカーである CA19-9と比較して優位性を示すことが判明した。本研究の意義は胆管癌に特異的な糖蛋白質マーカーを見出した点にある。厚労省研究班をベースに臨床試験を立案計画し、胆汁および血清における WFA-MUC1の測定意義に関するバリデーションに着手している。

A. 研究目的

胆道癌は胆道の慢性炎症を背景に発生してくることより、従来の腫瘍マーカーは炎症病態の影響によりその診断学的有用性は乏しい。糖鎖は「細胞の顔」であり、細胞表面の粘液糖蛋白の糖鎖構造は癌化により変化する。

糖鎖プロファイリング解析による新しい糖鎖分子マーカーの探索を目的として、(1)胆道癌の病理組織標本について、「レクチンマイクロアレイ」を用いた糖鎖プロファイリングの解析により、癌上皮に特異的な異常糖鎖を探索し、さらに、プロテオーム解析にて異常糖鎖のキャリアー分子を同定することで、新しい糖鎖分子マーカーを発見に繋げていく。また、胆道癌医療の将来に向けた糖鎖分子マーカーの医療分野への導入を目的として、(2)探索された糖鎖分子マーカーがヒト胆道癌の臨床標本においても検出されるかを解析し、臨床成績、病理データの視点より、早期診断マーカー、悪性度、生命予後や治療効果判定のマーカーとしての臨床的意義を検討していく。さらに、絞り込まれたレクチン種とキャリアー分子を用いて、胆道癌の早期診断のための鋭敏な ELISA システムの開発に繋げていく。

B. 研究方法

- (1)臨床標本として、胆道癌（肝門部胆管癌、中下部胆管癌）および肝内胆管癌の組織標本を対象とする。
- (2)癌組織のマイクログリダイセクションを行い、レクチンマイクロアレイ解析を施行する。癌部上皮、周辺異型上皮、非癌部上皮の間で有意な差を示すレクチン種を見出し、癌特異的なレクチン種を探索する。
- (3)癌特異的なレクチン種のキャリアータンパク分子について、プロテオミクス解析によりタンパク質の候補分子の同定を行う。
- (4)検証実験結果をもとに、絞り込まれたレクチン種とキャリアータンパク分子候補について適切な組み合わせを行い、最適な組み合わせを決定する。レクチン-抗体サンドイッチ ELISA による測定システムを構築する。
- (5)構築された測定システムを用いて、胆道癌症例の組織に加えて胆汁、血清標本についても解析を行う。

臨床成績と対比することにより、探索された糖鎖分子マーカーの臨床的意義について検討する。

C. 研究結果

本学と産業技術研究所糖鎖医学センターとの共同研究（新エネルギー・産業技術総合開発機能（NEDO）の「糖鎖機能活用技術開発プロジェクト」）にて、比較糖鎖プロファイリング解析により、胆管癌組織より有用なプローブレクチンとして *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) を見出し、WFA の陽性率は、肝内胆管癌88%、混合型肝癌 胆管癌部分80%/肝細胞癌部分 0%、HCC 0%、正常肝内胆管32%であった。また、糖鎖分子のコア蛋白について LC/MS 解析を施行し、粘液糖蛋白分子（ムチン）として、MY.1E12 抗体で認識される sialyl mucin core polypeptide 1 (MUC1) を同定した。蛍光免疫染色の解析より、WFA および MUC1は胆管癌上皮において共局在している。

多数の臨床標本を解析するには簡便な測定システムの構築が必須であることより、WFA を固相化し、MY.1E12抗体をオーバーレイするサンドイッチ ELISA を構築した。その後の胆汁測定値の解析（ROC 解析）より、WFA-MUC1は従来マーカーである CA19-9と比較して、胆管癌と良性胆道疾患との識別において優位性を示した。さらに、胆汁細胞診と比較しても優位性を示すことも判明した。そこで、厚労省研究班（難治性肝胆道疾患）をベースに臨床試験を立案計画し、胆管癌マーカーとしての胆汁および血清における WFA-MUC1の測定意義に関するバリデーションに着手している。

胆管癌分子マーカーの探索に関しては、肺癌や肝癌等に比較して遅れている印象が強い。プロテオーム解析によるマーカー開発の報告はなされているが、有用なマーカーの開発には至っていない。糖鎖にまで言及した報告は皆無である。本研究はグライコプロテオミクスの解析手法に基づいたものであり、これまでのプロテオミクスによるマーカー探索とは全く異なる内容である。医療現場において真に有用な分子マーカーの探索と、それに続く高感度診断システムの構築が期待

出来る。

D. 考 察

胆管癌分子マーカーの探索に関しては、肺癌や肝癌等に比較して遅れている印象が強い。プロテオーム解析によるマーカー開発の報告はなされているが、有用なマーカーの開発には至っていない。糖鎖にまで言及した報告は皆無である。本研究はグライコプロテオミクスの解析手法に基づいたものであり、これまでのプロテオミクスによるマーカー探索とは全く異なる内容である。医療現場において真に有用な分子マーカーの探索と、それに続く高感度診断システムの構築が期待出来る

E. 結 論

高感度糖鎖プロファイリング解析により肝内ならびに肝外胆管癌に特異的な糖蛋白質マーカー、WFA-MUC1を見出した。また、WFA-MUC1の簡易測定キットを構築し、それによる測定に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Oh S, Kim M, Eto M, Kim B, Shoda J, Tanaka K. New approach for obesity treatment incorporating individual self-management education. *J Obesity & Weight Loss Therapy* 2013, In press.

Seto K, Uchida F, Baba O, Yamatoji M, Karube R, Warabi E, Yanagawa T, Onizawa K, Miyoshi E, Shoda J, Bukawa H. Negative expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. *Springer Plus* 2013, In press.

Seto K, Shoda J, Horibe T, Warabi E, Ishige K, Yamagata K, Kohno M, Yanagawa T, Bukawa H, Kawakami K. Interleukin-4 receptor α -based hybrid peptide effectively induces antitumor activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology Report* 2013, In press.

Harada H, Warabi E, Matsuki T, Yanagawa T, Okada K, Uwayama J, Ikeda A, Nakaso K, Kirii K, Noguchi N, Bukawa H, Siow R, Mann G, Shoda J, Ishii T, Sakurai T. Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. *J Neuroscience* 2013, In press.

Oh S, Tanaka K, Warabi E, Shoda J. Exercise training decreases elevated serum ferritin and lipid peroxidation marker levels in middle-aged obese men

with non-alcoholic fatty liver disease. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2013, In press.

Matsuda A, Kuno A, Matsuzaki H, Kawamoto T, Shinkai T, Nakanuma Y, Yamamoto M, Ohkohchi N, Ikehara Y, Shoda J, Hirabayashi J, Narimatsu H. Glycoproteomics-based cancer marker discovery adopting dual enrichment with Wisteria floribunda agglutinin for high specific glyco-diagnosis of cholangiocarcinoma. *J Proteomics* 2013, In press.

Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, Miyoshi, E, Shoda J. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *J Gastroenterol* 2013, In press.

Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Gotoh N, Tokushige K, Hashimoto E, Utsunomiya H, Takahashi H, Ishii T, Yamamoto M, Shoda J. Deletion of Nrf2 leads to rapid progression of steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet. *J Gastroenterol* 48:620-32, 2013.

2. 学会発表

小野塚太郎, 尹之恩, 加藤千晶, 呉世昶, 田中喜代次, 正田純一: 肥満者に対する加速度トレーニングの有用性に関する予備検討. 第14回日本健康支援学会年次学術大会(京都), 2013.

加藤千晶, 小野塚太郎, 呉世昶, 江藤幹, 田中喜代次, 志田隆史, 正田純一: 肥満者における肝病態の改善に向けた健康支援とその成果. 第14回日本健康支援学会年次学術大会(京都), 2013.

池田 瑛, 蕨 栄治, 正田純一: 脂肪性肝炎を自然発症する過食肥満マウスの腸管病変と病態的意義, probiotics の効果第99回消化器病学会総会(鹿児島), 2013.

呉世昶, 田中喜代次, 正田純一: 肥満者の肝機能障害および代謝異常の改善を目指した新しい治療戦略の展開 第99回消化器病学会総会(鹿児島), 2013.

磯辺智範, 岡本嘉一, 志田隆史, 小野塚太郎, 正田純一: 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) における非侵襲的な病態評価のための新しいツール-Proton MRS と Fibroscan- 第99回消化器病学会総会(鹿児島), 2013.

正田純一: 第49回肝臓学会総会(東京)平成25年度前

期教育講演会「胆道疾患」, 2013.

呉 世昶, 田中喜代次, 加藤千秋, 正田純一: 運動実践は転写因子 Nrf2の賦活化し非アルコール性脂肪性肝疾患の肝病態を改善する 第49回肝臓学会総会 (東京), 2013.

秋山健太郎, 池田 瑛, 藤 栄治, 正田純一: 過食肥満により脂肪性肝炎を自然発症する p62/Nrf2遺伝子二重欠失マウスの腸管病変とその病態的意義 第49回肝臓学会総会 (東京), 2013.

志田隆史, 磯辺智範, 岡本嘉一, 上牧 隆, 正田純一: 非アルコール性脂肪性肝疾患における Controlled Attenuation Parameter の有用性の検討 第86回超音波医学会 (大阪), 2013.

小貫建一郎, 樋口亮太, 谷澤武久, 梶山英樹, 川本徹, 山本雅一, 中沼安二, 大河内信弘, 松田厚志, 久野敦, 成松 久, 正田純一: 肝内胆管癌の新規糖蛋白質マーカーの開発 第回胆道学会 (千葉) 小貫

正田純一, 田中喜代次: 肥満・生活習慣病と肝胆道疾患, 運動療法による予防と治療 第68回体力医学会 (東京), 2013.

藤 栄治, 池田 瑛, 秋山健太郎, 正田純一: p62:Nrf2遺伝子二重欠損マウスは過食により NASH を自然発症する. 第16回肝臓学会大会 (東京), 2013.

小野塚太郎, 志田隆史, 丸山剛, 江口清, 志波直人, 正田純一: 筋萎縮予防法ハイブリッド訓練の女性 NAFLD 患者に対する有用性の検討 第68回体力医学会 (東京), 2013.

小野塚太郎, 志田隆史, 丸山剛, 江口清, 志波直人, 正田純一: 肥満者女性に対する加速トレーニングの効果についての予備検討 第68回体力医学会 (東京), 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特許 (米国) 「肝内胆管癌の検出・判別方法」
2011F6500SO

2. 実用新案登録

なし

3. その他

本研究は産業技術総合研究所糖鎖センターとの共同研究である。

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 金沢大学大学院病態検査学講座 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。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21例、非腫瘍群14例の胆汁を用いて、胆道系腫瘍に特異的な2つの miR-451及び miR-486を同定した。miR-451は胆汁中に分泌される分泌優位の miRNA であり、肝内胆管癌細胞株 Huh28細胞で過剰発現させると、EMT シグナルの低下、炎症シグナルの低下を認めた。一方、miR-486を過剰発現させると、EMT シグナル、炎症シグナルの亢進が認められた。これらの2つの miRNA は診断・病態解析及び治療応用の観点からも有用と考えられ、今後の機能解析が必要と考えられた。

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™ PARISTM (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34例 (腫瘍群)、良性疾患25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。

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21例、非腫瘍群14例の胆汁を用いて検証した。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、miR-451及び miR-486を同定した。11例の肝内胆管癌組織及び7例の C 型慢性肝炎肝組織を用いて、同様に380種の miRNA に関し発現解析を行った。その結果、同様に miR-451及び miR-486の発現変動を認めた。miR-451は胆汁中に分泌される分泌優位の miRNA であり、肝内胆管癌細胞株 Huh28細胞で過剰発現させると、EMT シグナルの低下、炎症シグナルの低下を認めた。一方、miR-486を過剰発現させると、EMT シグナル、炎症シグナルの亢進が認められた。また、これらの miRNA の発現制御に2次胆汁酸の組成の関与が示唆された。これらの2つの miRNA は診断・病態解析及び治療応用の観点からも有用と考えられ、今後の機能解析が必要と考えられた。

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する。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得るとされている。

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2つの miRNA、miR-451及び miR-486を同定した。興味深いことに、miR-451は分泌型であり、抗腫瘍作用、miR-486は腫瘍促進作用を有すると考えられた。これらの

2つの miRNA は診断・病態解析や治療の観点からも有用と考えられ、今後の機能解析が必要と考えられた。

E. 結 論

胆管癌症例の胆汁中に悪性腫瘍群と非腫瘍群を鑑別する2つの miRNA, miR-451及び miR-486を同定した。診断及び病態解析に於いて有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E and Kaneko S. *Hepatology*, 2013 in press.
- 2) microRNA-122 Abundance in Hepatocellular Carcinoma and Non-Tumor Liver Tissue from Japanese Patients with Persistent HCV versus HBV Infection. Spaniel C, Honda M, Selitsky SR, Yamane D, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM. *PLoS One*. 2013 Oct 9;8(10):e76867. doi: 10.1371/journal.pone.0076867.
- 3) Pro-angiogenic cytokines for prediction of outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Miyahara K, Nouse K, Morimoto Y, Takeuchi Y, Hagihara H, Kuwaki K, Onishi H, Ikeda F, Miyake Y, Nakamura S, Shiraha H, Takaki A, Honda M, Kaneko S, Sato T, Sato S, Obi S, Iwadou S, Kobayashi Y, Takaguchi K, Kariyama K, Takuma Y, Takabatake H, Yamamoto K; Okayama Liver Cancer Group, Yamamoto K, Morimoro Y, Takeuchi Y, Miyahara K, Hagihara H, Kuwaki K, Onishi H, Nakamura S, Shiraha H, Nouse K, Takuma Y, Takabatake H, Morimoto Y, Fujioka S, Osawa T, Kariyama K, Toshimori J, Kobashi H, Miyatake H, Iwadou S, Kobayashi Y, Uematsu S, Okamoto R, Araki Y, Tatsukawa M, Yabushita K, Shimoe T, Sakaguchi K, Sakata T, Kaneyoshi T, Miyashita M, Makino Y, Moriya A, Ando M, Baba N, Seno T, Nagano T, Takaguchi K, Matsumoto E, Takayama H. *Br J Cancer*. 2013 Oct 15;109(8):2072-8. doi: 10.1038/bjc.2013.554. Epub 2013 Sep 17.
- 4) The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. Zeng SS, Yamashita T, Kondo M, Nio K, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Yoshida M, Hayashi T, Oishi N, Ikeda H, Honda M, Kaneko S. *J Hepatol*. 2013 Sep 6. doi:pii: S0168-8278(13)00647-8.
- 5) Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, Honda M, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. *Eur J Immunol*. 2013 Aug 12. doi: 10.1002/eji.201343531. [Epub ahead of print]
- 6) Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. *Hepatology*. 2013 Sep;58(3):1133-42. doi: 10.1002/hep.26470.
- 7) Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. Hodo Y, Honda M, Tanaka A, Nomura Y, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Sasaki M, Nakanuma Y, Moriyama M, Kaneko S. *Clin Cancer Res*. 2013 Apr 1;19(7):1827-37. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1641
- 8) Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. *Hepatology*. 2013 Apr;57(4):1484-97. doi: 10.1002/hep.26168.
- 9) ER stress induced impaired TLR signaling and macrophage differentiation of human monocytes. Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Wada T, Kaneko S. *Cell Immunol*. 2013 Apr 24;282(1):44-52. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.04.006.
- 10) Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. Honda M, Yamashita T, Yamashita T, Arai K, Sakai Y, Sakai A, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. *BMC Cancer*. 2013 Apr 15;13:191. doi: 10.1186/1471-2407-13-191.
- 11) Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Ueda T, Honda M, Horimoto K, Aburatani S, Saito S, Yamashita T, Sakai Y, Nakamura M, Takatori H, Sunagozaka H, Kaneko S. *Genomics*. 2013

Apr;101(4):238-48. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.02.007.

- 12) MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. J Virol. 2013 May;87(9):5270-86. doi: 10.1128/JVI.03022-12.

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

胆汁酸刺激と細胞保護～細胞内グルタチオン動態の解析

研究協力者 海野 倫明 東北大学大学院医学系研究科 消化器外科学 教授

研究要旨：肝内結石症は胆道感染と胆汁うっ滞が主体の病態である。胆汁酸刺激による肝細胞表現型の変化を LC-MS/MS 同時絶対定量法にて検討した結果から、肝細胞内グルタチオン動態の解析を行った。胆汁酸刺激によってもたらされる酸化ストレスが GSH 合成を促進させ、細胞保護作用をもたらす可能性が示唆された。今後、肝内結石症による発癌予防や肝細胞障害改善の治療戦略となり得るか更なる検討を予定している。

A. 研究目的

肝内結石症は胆道感染と胆汁うっ滞が主体の病態である。慢性的な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。当教室では、特異的ペプチドプローブを用いた定量的プロテオミクスによって、胆汁酸刺激による肝細胞表現型の変化を検討した。胆汁酸刺激によりグルタチオン (GSH) 合成の律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GCLC) が誘導されることを明らかとした。胆汁酸刺激に対する GSH の細胞保護作用につき検討することとした。

B. 研究方法

胆汁酸 (1% コール酸: 5日間経口投与) 投与によるマウス肝細胞内 GSH 濃度変化, Glutathione synthetase (GS), GCLC の発現変化を測定した。酸化ストレスを 4-HNE 免疫染色で評価した。培養細胞株 (Hepal-6) で Oatp-1 をノックダウンし、GSH 排泄抑制下での細胞内 GSH 濃度変化を測定した。

C. 研究結果

コール酸投与により肝細胞内の GCLC 濃度は 1.7 倍に上昇, Glutathione synthetase (GS) は 2 倍に上昇した (図 1)。GSH 濃度, 酸化型 GSH 濃度ともに有意に上昇していた。

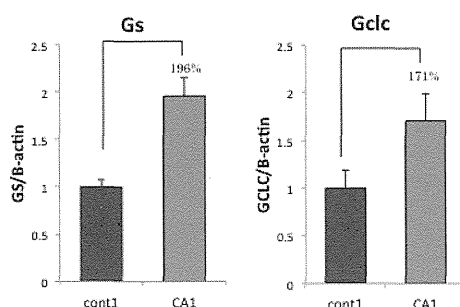


図 1. 細胞内 GS, GCLC 発現変化

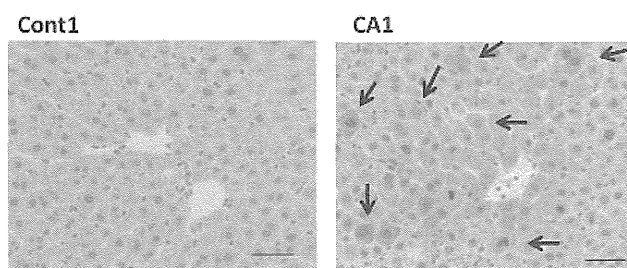


図 2. 4-HNE 免疫染色

4-HNE 免疫染色を用い酸化ストレスを評価すると、コール酸投与のみで 4-HNE 陽性細胞を認めた。

GSH 排泄トランスポーター Oatp-1 を siRNA でノックダウンし、細胞内 GSH 濃度変化を測定した。ノックダウンにより GSH 濃度は低下する傾向を認めた。

D. 考 察

コール酸投与における肝内 GSH 動態につき検討した。コール酸投与により GSH 合成の律速酵素である GCLC, GS は上昇し、細胞内 GSH 濃度も上昇した。特異的ペプチドプローブを用いた定量的プロテオミクスによる、胆汁酸刺激による肝細胞表現型の変化で認めた Oatp-1 の発現低下は、siRNA を用いた検討では、GSH 濃度変化と相関せず、GSH 濃度の上昇は、合成促進によるものと考えられた。

胆汁酸投与により誘導された酸化ストレスが GSH 合成促進を誘導し、細胞内において抗酸化、解毒作用をもたらす可能性が示唆された。細胞内 GSH のコントロールにより、胆汁酸刺激に対する細胞保護の可能性が示唆された。

E. 結 論

特異的ペプチドプローブを用いた定量的プロテオミクスによって明らかとなった肝細胞表現型の変化から胆汁酸刺激による GSH 動態と細胞保護の可能性が示唆された。今後、肝内結石症による発癌予防や肝細胞障害の治療戦略となり得るか更なる検討を予定している。

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

- ①深瀬耕二, 青木 豪, 坂田直昭, 乙供 茂, 大塚英郎, 水間正道, 林 洋毅, 中川 圭, 岡田恭穂, 森川孝則, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄友, 海野倫明. 肝内胆管癌の手術治療成績から見た治療戦略 (第25回日本肝胆膵外科学会学術集会 宇都宮 2013)
- ②海野倫明. 消化器癌のサーベイランス 胆道癌の診断と治療 (第49回日本肝臓学会総会 東京 2013)

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
銭谷幹男	消化器・肝胆膵疾患における自己抗体検査	浜窪隆夫	新機能抗体開発ハンドブック	エヌ・ティー・エス	東京	2012	470-476
銭谷幹男	自己免疫性肝炎	矢崎義雄	内科学	朝倉書店	東京	2013	1131-1133
阿部雅則, 恩地森一	自己免疫性肝炎	小川聡	内科学書 改訂第8版	中山書店	東京	2013	271-274
阿部雅則, 恩地森一	自己免疫性肝炎	北村聖	臨床病態学2 (第2版)	ヌーヴェル ヒロカワ	東京	2013	126-128
原田憲一	Ⅲ章：非腫瘍疾患 ・自己免疫性肝炎 ・原発性硬化性胆管炎 ・その他の二次性硬化性胆管炎, 胆管系疾患	中沼安二	肝臓を診る医師のための肝臓病理テキスト	南江堂	東京	2013	89-94, 143-150
原田憲一, 中沼安二	第2章 非腫瘍性胆管・胆嚢疾患 ・総論：診断アプローチ ・各論：代表的な疾患	中沼安二, 坂元亨宇, 福嶋敬直	キーワードとアルゴリズムで捉える：肝胆膵の実践病理診断	文光堂	東京	2013	41-64
中沼安二, 原田憲一, 池田博子	8章 消化器疾患各論 ・胆道疾患：原発性硬化性胆管炎	浅香正博, 菅野健太郎, 千葉勉	カラー版 消化器病学 -基礎と臨床-	西村書店	東京	2013	1405-1410
竹山康章, 向坂彰太郎	原発性胆汁性肝硬変, 原発性硬化性胆管炎	田中良哉	免疫・アレルギー疾患 イラストレイテッド	羊土社	東京	2013	241-247
竹山康章, 向坂彰太郎	原発性胆汁性肝硬変	浅香正博, 菅野健太郎, 千葉勉	カラー版 消化器病学 -基礎と臨床-	西村書店	東京	2013	1209-1216
腰山裕一, 湯川晋弘, 西原利治	メタボ肝癌の高危険群①	小俣政男	メタボ肝癌	アークメディア	東京	2013	97-101
西原利治	肥満症と脂肪肝, NASH	中尾一和	内分泌代謝学	診断と治療社	東京	2013	449-450
藤原慶一, 安部隆三, 織田成人, 横須賀收	急性肝不全に対する人工肝補助の現状と high flow-volume HDF の展望	持田智	第39回日本急性肝不全研究会藤原研司先生メモリアル追悼文集・記録集	アークメディア	東京	2013	135-140
柄沢智史, 渡邊栄三, 安部隆三, 中田孝明, 大島 拓, 服部憲幸, 織田成人	劇症肝炎 (FH) に対するオンライン血液濾過透析 (on-line HDF) の施行経験 - 高流量持続血液濾過透析 (HFCHDF) との臨床効果の比較 -	持田智	第39回日本急性肝不全研究会藤原研司先生メモリアル追悼文集・記録集	アークメディア	東京	2013	153-156

鈴木一幸, 滝川康裕, 遠藤龍人, 宮坂昭生, 宮本康弘, 小野寺美緒, 小山富子, 岡本宏明, 伊藤清顕, 溝上雅史	B型急性肝炎および慢性 肝疾患におけるHBVゲ ノタイプAの頻度と感 染経路の検討	犬山シンボ ジウム記録 刊行会	ウイルス肝炎・肝癌の 病態と治療	メディカル トリビュー ン社	東京	2013	23-28
安井 伸, 藤原慶一, 横須賀收	HBVキャリア重症化の 定義と核酸アナログ+ス テロイド併用療法	持田智	第39回日本急性肝不全 研究会藤原研司先生メ モリアル追悼文集・記 録集	アークメディア	東京	2013	123-126
正田隼人, 竹原徹郎	劇症肝炎の発症機序 ① アポトーシス・細胞死	竹原徹郎, 持田智, 大平弘正, 坂井田功	難治性肝疾患の診療を極め る (Hepatology Practice)	文光堂	東京		印刷中
Inoue K, Yoshiba M.	Overview of Artificial Liver Support Systems in the World and New Promising Methods	Carmen Peralta, Luis Fontana	Liver Failure: Etiologies, Neurological Complications and Emerging Therapies	Nova Publishers	New York	2013	159-176
荒田慎寿, 滝澤憲一, 野崎昭人, 近藤正晃, 森本 学, 沼田和司, 今成秀則, 田中克明	急性肝不全に対する on- line HDF の課題と展望	持田 智	第39回日本急性肝不全 研究会藤原研司先生メ モリアル追悼文集・記 録集	株 式 会 社 アークメディア	東京	2013	146-149
高谷広章, 植村正人, 藤本正男, 松山友美, 森岡千恵, 石川昌利, 辻本達寛, 瓦谷英人, 北澤利幸, 早川正樹, 松本雅則, 藤村吉博, 福井 博	急性肝不全における血 漿エンドシン濃度と ADAMTS13活性の動態: 新規治療法の可能性を含 めて	日本エンド トキシン・ 自然免疫研 究会 (編)	エンドトキシン・自然 免疫研究16自然免疫か ら自然炎症へ	医学図書出 版株式会社	東京	2013	16-19
福井 博	劇症肝炎の発症機序 (微 小循環障害)	坂井田功, 大平弘正, 竹原徹郎, 持田智	難治性肝疾患の診療を極め る (Hepatology Practice)	文光堂	東京	2013	印刷中
佐藤保則, 中沼安二	腫瘍性胆管・胆嚢疾患	中沼安二, 坂元亨宇, 福嶋敬宜	肝胆膵の実践病理診断	文光堂	東京	2013	185-208
佐藤保則, 中沼安二	胆管系悪性腫瘍	中沼安二	肝臓病理テキスト	南江堂	東京	2013	232-246
佐々木素子, 中沼安二	胆道粘液産生性腫瘍の分 子病理	小俣政男, 千葉勉	専門医のための消化器 病学	医学書院	東京	2013	547-548

鬼島 宏, 中沼安二, 柳澤昭夫, 佐々木素子	胆道癌取扱い規約 [病 理]	日本肝胆膵 外科学会編	胆道癌取扱い規約 (第 6版)	金原出版	東京	2013	1-93
正田純一	トピックス：胆石形成 の分子機序	小俣政男, 千葉 勉	専門医のための消化器 病学	医学書院	東京	2013	494-496
正田純一, 松田厚志, 久野 敦, 池原 譲, 成松 久, 大河内信弘, 山本雅一, 中沼安二	肝内胆管癌の新規バイオ マーカー	坂井田功, 大平弘正, 竹原徹郎, 持田智	難治性肝疾患の診療を極め る (Hepatology Practice)	文光堂	東京	2013	印刷中
正田純一	胆道の炎症		内科学書第8版 Vol.4 肝・胆道・膵疾患	中山書店	東京	2013	349-351
正田純一	原発性硬化性胆管炎		内科学書第8版 Vol.4 肝・胆道・膵疾患	中山書店	東京	2013	352-353
Shoda J, Kawamoto T, Yamamoto M.	Gallbladder Cancer - Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options.	Hiroto S.Watanabe	Horizons in Cancer Research	NOVA Science Publishers	New York	2013	1-24