

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19175

研究課題名(和文) 細胆管癌および肝内胆管癌の腫瘍発生に関わるインテグリン 4, 6の発現と機能解析

研究課題名(英文) Expression and functional analysis of integrins beta 4 and beta 6 involved in tumorigenesis of cholangiolocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma.

研究代表者

副島 友莉恵 (SOEJIMA, Yurie)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60596964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌，混合型肝癌の外科切除材料および癌株化培養細胞を用い、インテグリン 6 4(4)， α 6(6)とその細胞外基質を介した腫瘍進展に関わる因子を解析し、進展機序を解明することを目的とした。肝内胆管癌におけるインテグリン 4, 6の免疫組織化学的解析では、4, 6共に、部位は大型胆管を含む傍肝門部、肉眼型は胆管浸潤型・胆管内発育型、高分化型癌、浸潤性発育で強く発現し、胆管侵襲と関連した。細胞外基質との関連では 4はラミニン-5と、6はテネイシンCと発現に相関がみられた。また TGF- 1および α -SMA陽性筋線維芽細胞は 6の発現と正の相関を示し、関連が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝内胆管癌、細胆管癌、混合型肝癌におけるインテグリン 4, 6の発現の特徴と関わる因子を調べ、これらの腫瘍の類似性、独立性、発生機序を検討した。特に肝内胆管癌では、インテグリン 4, 6の発現がリガンドやTGF- 1の発現と関連して癌の亜分類および臨床病理学的因子と関連することを明らかにし、論文で報告した。

4, 6の発現は肝内胆管癌の小型末梢胆管から発生する癌で弱く、細胆管癌との類似性が示された。今後、肝内胆管癌においてインテグリン 4, 6の発現を制御する因子を明らかにし、インテグリン 4, 6を標的とし、かつ悪性度評価の指標とした治療応用への展開を目指す。

研究成果の概要(英文)：We immunohistochemically investigated α 6 4 (4) and α 6 (6) integrin expressions in ICCs and evaluated their relationship with clinical and pathological parameters and ligand expression. 4 and 6 integrin levels were higher in non-peripheral central localization type ICC than in the peripheral localization type, in periductal-infiltrating or intraductal-growth types than in mass-forming type ICC, and in well-differentiated type than in poorly differentiated type ICC. High expression was related to bile duct invasion. In addition, 4 and 6 expressions were associated with laminin-5 and tenascin C. TGF- 1 and α -SMA-positive myofibroblasts were correlated with 6 expression. These results suggest that integrin expression is associated with subclassification and clinicopathological features of ICC through the coincident expression of their ligands and TGF- 1.

研究分野：人体病理

キーワード：インテグリン 4 インテグリン 6 肝内胆管癌 ラミニン5 テネイシンC TGF- 1 α -SMA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胆管細胞癌（細胆管癌）および肝内胆管癌については、国内はもとより国際的にも、その発生母地と発現形質の特徴から分類上の議論が続いている。これまでの報告より細胆管癌は、肝内胆管癌や混合型肝癌の他の亜型と、治療や予後の点からも区別される可能性があるため、その発生源と性質を解明することが必要とされている。

(2) 申請者はこれまで、細胞接着分子インテグリン $\alpha\beta 6$ ($\beta 6$)が胆管癌で強い発現を示すのに対し、一方で肝細胞癌では発現がみられなかったという報告(Patsenker E. *J Hepatology*. 2010)から、典型的な細胆管癌および肝内胆管癌組織において、インテグリン $\beta 6$ と、胆管細胞および胆管癌で発現することが知られているインテグリン $\alpha\beta 4$ ($\beta 4$)の発現を免疫組織化学的および分子病理学的に解析した。その結果、インテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ の発現はいずれも、細胆管癌では肝内胆管癌と比較して著しく弱く、鑑別に有用である可能性を明らかにした (Soejima Y, et al. *Hepatol Res*. 2014)。しかし、細胆管癌と肝内胆管癌におけるインテグリン $\beta 4$ または $\beta 6$ を介した腫瘍発生メカニズムや生物学的意義については全く不明であり、詳細な解明が必要とされている。

2. 研究の目的

原発性肝癌の一種である細胆管癌および肝内胆管癌においては、その発生母地と発現形質の特徴から分類について国内外ともに未だ議論の余地があり、治療や予後の点からもこれらの腫瘍本態の性質を解明し、分類することが必要とされている。本研究では、外科的に切除された細胆管癌と肝内胆管癌、及びそれらの株化培養細胞を用いて、インテグリン $\beta 4$ および $\beta 6$ とその細胞外基質を介した腫瘍形成に関連する因子を詳細に検討するとともに、両者の鑑別が困難な非典型例や混合型肝癌における発現を解析することにより、細胆管癌と肝内胆管癌の腫瘍発生独立性と発生機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝内胆管癌組織において、インテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ およびそのリガンドである細胞外基質（ラミニン-5, テネイシン C）の発現を免疫組織化学的に解析し、臨床病理学的所見との関連およびそれぞれの発現の関連を調べる。

(2) 混合型肝癌、および肝内胆管癌と細胆管癌の鑑別が困難な症例の組織を用いて $\beta 4$, $\beta 6$, 細胞外基質（ラミニン-5, テネイシン C）の発現を免疫組織化学的に調べ、細胆管癌と肝内胆管癌の独立性および関連性を調べる。

(3) インテグリン $\beta 6$ を介した肝内胆管癌進展機序を明らかにするため、肝内胆管癌組織および株化培養細胞(HuCC1, HuH28)を用いて、 $\beta 6$ により活性化される TFG- $\beta 1$ と、TFG- $\beta 1$ により活性化し、癌の浸潤や線維化に関わる α -SMA 陽性筋線維芽細胞の発現との関連を、免疫染色による蛋白質発現およびリアルタイム PCR 法による mRNA 発現量を調べ解析する。

4. 研究成果

(1) 肝内胆管癌組織 48 例におけるインテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ 、ラミニン-5, テネイシン C の発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、 $\beta 4$ は 96%、 $\beta 6$ は 73%で発現がみられた。臨床病理学的所見との関連を解析すると、発生部位では傍肝門部型で末梢型よりも強い発現を示し($\beta 4$: 70%vs32%, $\beta 6$: 60%vs16%)、肉眼型では腫瘍形成型と比較して胆管浸潤型および胆管内発育型を含む例で強い発現を示した($\beta 4$: 31%vs100%, $\beta 6$: 19%vs67%)。分化度では高分化型および中分化型と比較して低分化型で低い発現がみられた($\beta 4$: 51%vs8%, $\beta 6$: 34%vs0%)。さらに、膨張性発育と比較して浸潤性発育で強い発現を示し($\beta 4$: 22%vs56%, $\beta 6$: 13%vs36%)、胆管侵襲の有無との関連も示された($\beta 4$: 58%vs18%, $\beta 6$: 42%vs5%)。アルシアン青染色や EMA 発現パターンとの関連も示された(図 1)。細胞外基質との関連では、 $\beta 4$ はラミニン-5 と、 $\beta 6$ はテネイシン C の発現とそれぞれ関連がみられ($P<0.001$, $P=0.016$)、発現の局在は、 $\beta 4$, $\beta 6$ の発現が強い部位でラミニン-5, テネイシン C も強い発現を示した。また、ラミニン-5 は胆管浸潤型および

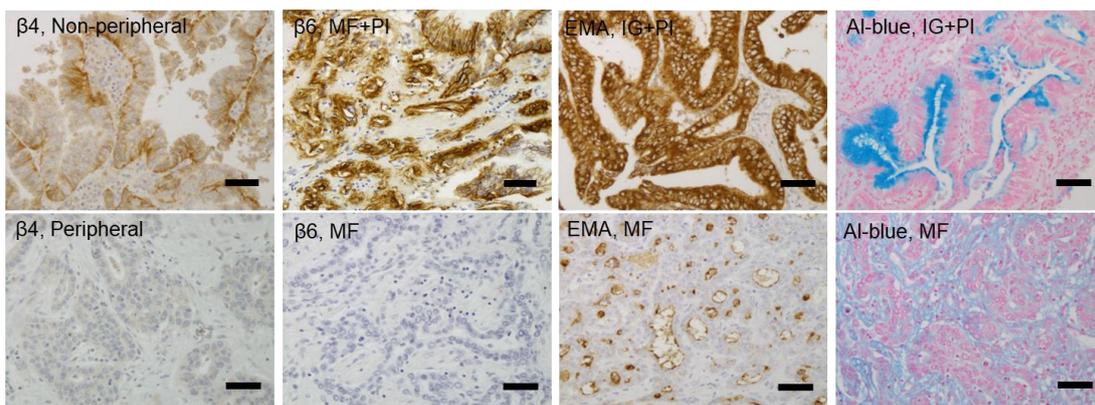


図 1 肝内胆管癌の部位および肉眼型とインテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ の発現との関連

び胆管内発育型、浸潤性発育で強くみられ、肝静脈侵襲、リンパ節転移、予後と関連がみられた。テネイシン C の発現は浸潤性発育と関連がみられた。

(2) 混合型肝癌は WHO で Classical type と 3 つの subtypes with stem-cell features に分類されるが、診断基準が明確でなく不明な点が多い。そこで、混合型肝癌組織 14 例を用い、各亜型における $\beta 4$, $\beta 6$ インテグリンと細胞外基質の発現を調べ、腫瘍の進展との関連を調べた。その結果、混合型肝癌各亜型の stem cell 部位で、低頻度だが明瞭な発現を示した ($\beta 4$: 3 例, $\beta 6$: 2 例, ラミニン-5: 5 例, テネイシン C: 6 例) (図 2)。これらの発現と臨床病理学的所見との関連はみられなかったが、インテグリンの発現よりも細胞外基質の発現が高頻度にみられたことから、ラミニン-5, テネイシン C がインテグリン $\beta 4$ および $\beta 6$ を誘導する可能性と、これらの発現が混合型肝癌における stem cell features の性質の維持と関連する可能性が推測された。

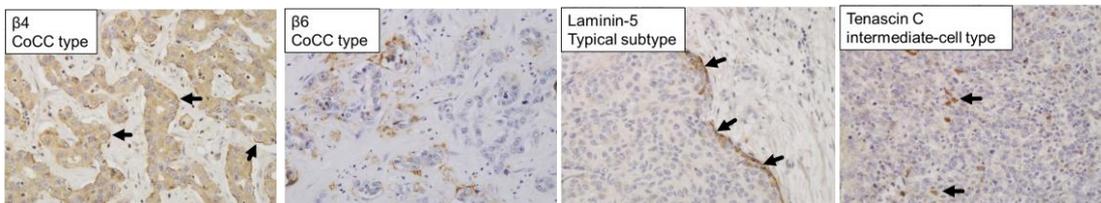


図 2 混合型肝癌 stem cell 部位におけるインテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ 、ラミニン-5, テネイシン C の発現

(3) インテグリン $\beta 6$ により活性化される TGF- $\beta 1$ と、TGF- $\beta 1$ により活性化し増生する α -SMA 陽性癌関連筋線維芽細胞との関連を調べた。肝内胆管癌組織 52 例では、TGF- $\beta 1$ は細胞質に発現し、22 例(42%)が高発現(>25%)で $\beta 6$ と正の相関を示した ($r=0.32$, $P=0.012$)。臨床病理学的所見と比較すると、門脈侵襲(50%vs10%)および予後 ($P=0.044$) と関連がみられた。 α -SMA 陽性筋線維芽細胞は癌細胞の腺管周囲と線維化部位に発現しがみられ、32 例(62%)が高発現で $\beta 6$ と正の相関を示した ($r=0.24$, $P=0.042$) (図 3)。

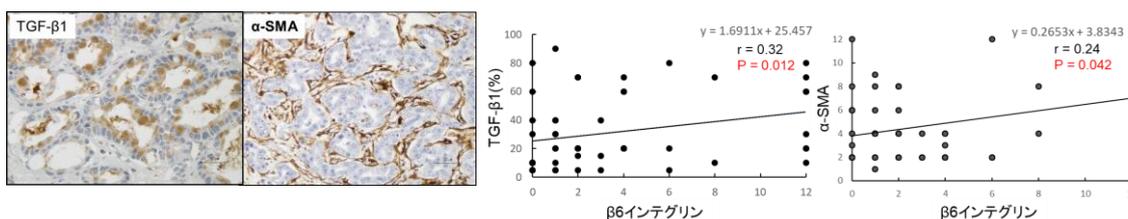


図 3 肝内胆管癌組織における TGF- $\beta 1$ および α -SMA の発現とインテグリン $\beta 6$ の発現との相関

(4) 肝内胆管癌株化培養細胞は、ITGB6 (インテグリン $\beta 6$ 遺伝子) mRNA 高発現を示す HuCCT1 と、低発現を示す HuH28 を用い比較解析を行った (Soejima Y. *Hepatol Res.* 2014)。TGF- $\beta 1$ は蛋白質、mRNA 共に、HuCCT1 で HuH28 と比較して高い発現がみられた。さらに HuCCT1 と HuH28 をヒト線維芽細胞 (NHDF) と共培養し、線維芽細胞における α -SMA の発現を調べたところ、 α -SMA mRNA 量は胆管癌細胞株と共培養しない場合および HuH28 との共培養と比較して、HuCCT1 との共培養で高い発現がみられた (図 4)。また、創傷治癒アッセイでは、HuCCT1 で HuH28 と比較して高い遊走能を示した。

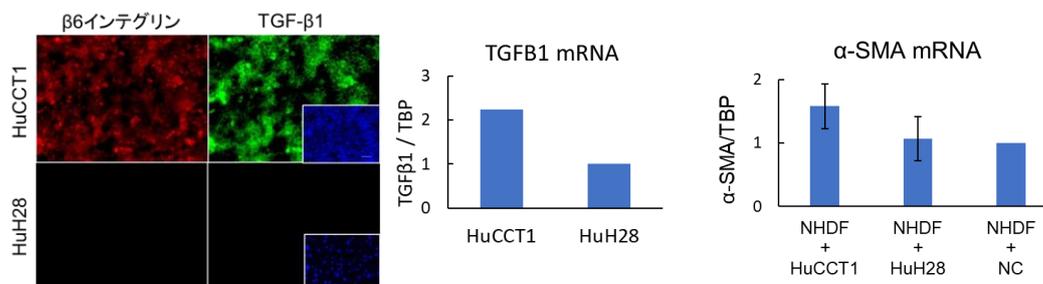


図 4 胆管癌細胞株におけるインテグリン $\beta 6$ および TGF- $\beta 1$ と α -SMA 陽性筋線維芽細胞の発現

また、肝内胆管癌におけるインテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ と細胞外基質との関連を調べるため、肝内胆管癌株細胞を細胞外基質 (フィブロネクチン、テネイシン、ラミニン) コートディッシュ上で培養し、インテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ の発現を調べた。しかし、非コートディッシュと比較して明らかな差はみられなかった。この結果より、胆管癌におけるインテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ の発現には細胞外

基質のみでなく、他の因子の関与が必要であることが考えられた。

以上より本研究では、インテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ が細胞外基質ラミニン-5、テネイシン C および TGF- $\beta 1$ の発現と関わり、肝内胆管癌の亜分類と関連して異なる発現を示すこと、さらに、癌の浸潤や進展と関連することが明らかとなった。今後さらに、インテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ の発現がどのような機序で制御されているのかを調べ、インテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ を標的とし、かつ悪性度評価の指標とした治療応用のための研究基盤確立を目指していく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① [Soejima Y](#), Takeuchi M, Akashi T, Sawabe M, Fukusato T. $\beta 4$ and $\beta 6$ integrin expression is associated with the subclassification and clinicopathological features of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Mol Sci*. 査読有, 2018 Mar 27;19(4), 1004. doi: 10.3390/ijms19041004.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 竹内美穂, [副島友莉恵](#) 他、肝内胆管癌における TGF- $\beta 1$, α -SMA と $\alpha v\beta 6$ インテグリンの発現解析、第 13 回日本臨床検査学教育学会学術大会、2018
- ② [副島友莉恵](#) 他、肝内胆管癌における TGF- β と $\alpha v\beta 6$ インテグリンの発現 Immunohistochemical analysis of TGF- $\beta 1$ and beta6 integrin in intrahepatic cholangiocarcinoma、第 54 回日本肝癌研究会、2018.
- ③ [副島友莉恵](#) 他、混合型肝癌組織における $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 6$ インテグリンと細胞外基質の免疫組織化学的解析、第 106 回日本病理学会総会、2017.
- ④ [Soejima Y](#), et al. Expression of beta4, beta6 integrins in intrahepatic cholangiocarcinoma and cholangiolocellular carcinoma 肝内胆管癌および細胆管細胞癌組織におけるインテグリン $\beta 4$, $\beta 6$ の発現 第 75 回日本癌学会学術総会、2016.
- ⑤ [Soejima Y](#), et al. Immunohistochemical studies of beta4 and beta6 integrins in intrahepatic cholangiocarcinoma. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science, 2016
- ⑥ [副島友莉恵](#) 他、肝内胆管癌組織における $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 6$ インテグリンの免疫組織化学的解析 Immunohistochemical analysis of beta4 and beta6 integrins in intrahepatic cholangiocarcinoma、第 52 回日本肝癌研究会、2016
- ⑦ [副島友莉恵](#) 他、肝内胆管癌組織における $\alpha v\beta 6$ インテグリンの免疫組織化学的発現検討 Immunohistochemical analysis of beta6 integrin in cholangiolocellular carcinoma、第 105 回日本病理学会総会、2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等：東京医科歯科大学ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mp/publications/publications.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：福里 利夫

ローマ字氏名：(FUKUSATO, toshio)

研究協力者氏名：沢辺 元司

ローマ字氏名：(SAWABE, motoji)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。