

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19914

研究課題名(和文)肝内胆管癌におけるProfibrogenic Factorの存在とその機能解析

研究課題名(英文)The involvement of profibrogenic factors in the malignant behavior of cholangiocarcinoma

研究代表者

岡本 共弘 (Okamoto, Tomohiro)

兵庫医科大学・医学部・病院助手

研究者番号：00567208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌(ICC)組織の間質にcancer associated fibroblasts、Collagen I、III、IVが豊富に存在していた。PDGF Family、CTGF及びPDGFRa、PDGFRbの発現をヒトICC切除標本を用いて免疫染色にて調べたところPDGF-BB、PDGF-CC、CTGFの発現およびPDGFRa、PDGFRbの発現を癌細胞のほか線維芽細胞にも認めた。ICC細胞株に二種類のPDGFR受容体阻害剤を肝内胆管癌細胞株に添加したところ、細胞の増殖は有意に抑制され、癌細胞自身がPDGFによるautocrineで細胞増殖している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The presence of cancer associated fibroblasts and collagens (Type I, III and IV) was found in the stroma of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) tissues. Immunoreactivity of PDGFs, CTGF and PDGF receptor (PDGFR) - , - was found not only in cancer cells, but also in cancer associated fibroblasts. In in vitro experiments, two kinds of PDGFR inhibitor reduced proliferation of 2 types of ICC cell lines, indicating that PDGFs derived from cancer cells may stimulate their proliferation in an autocrine manner.

研究分野：肝内胆管癌

キーワード：肝内胆管癌 fibroblasts profibrogenic factors PDGFs CTGF

## 1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma: ICC) は発見時進行症例が多く未だ予後不良な疾患である。組織学的特徴として、癌細胞のほかに豊富な間質 (線維芽細胞、マクロファージ、免疫細胞、内皮細胞、細胞外マトリックスなど) が含まれていることがあげられる。最近、間質の構成細胞や細胞外マトリックスといった微小環境が近隣の上皮系細胞の transformation を促進し、増殖能、浸潤能、転移能といった機能を制御していることが明らかになってきていることから、癌細胞以外に間質の制御も肝内胆管癌治療においては重要であると考えられている。

ICC の間質内には  $\alpha$ -SMA 陽性の癌組織内線維芽細胞 (cancer associated fibroblast : CAFs) のほか、I、III 型 Collagen のような Fibril Collagen が豊富に蓄積されている。CAFs の起源は肝星細胞や肝門脈領域の線維芽細胞、骨髄から派生した血中前駆細胞があげられるが、いまだ明らかではなく、さらなる検討が必要と考えられる。また、Fibril Collagen は、その内部にたくさんの CAFs を含み、癌細胞を取り囲むように存在している。このことから、間質内 Collagen 産生の責任細胞は CAFs と考えられるが、そのメカニズムに関しては未だあきらかでない。つまり、どの液性因子が線維化に深くかかわり、その液性因子はどの細胞で作られ? autocrine または paracrine で CAFs に作用しているのか? ということがまだ明らかにされていない。

肝硬変における線維化の key player としては PDGF-BB や TGF-beta、CTGF があげられる。そこで我々は、肝線維化にかかわる液性因子が ICC 組織においても働いているのか? その他にかかわる Profibrogenic factor が存在するのか? また産生細胞はどの細胞か? という疑問が生じ、この研究を企画した。また、最近の興味深い論文では Imatinib や Sunitinib などの PDGF 受容体 kinase 阻害剤にて肝内胆管癌セルラインの増殖能や遊走能が抑制されていることや大腸癌細胞が EMT 変化に伴って、PDGF receptor (PDGFR) を発現するようになるという報告から、Profibrogenic factor が直接癌細胞の behavior も制御している可能性も考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は“肝内胆管癌組織における profibrogenic factors の存在とその機能を明らかにすること”である。肝内胆管癌は豊富な線維化を伴う予後不良の悪性腫瘍である。癌の増殖や進展には間質に存在する線維芽細胞や細胞外マトリックスなどが深くかかわっていると報告されているが、肝内胆管癌組織における線維化のメカニズムに関しては未だ明らかにされていない。本研究では肝

内胆管癌組織内線維化に深くかかわっている因子は何か その profibrogenic factor が線維芽細胞を介して、または直接的に癌細胞にどのような影響を与えるかを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### 1) ヒト ICC 組織における Collagen (typeI-type IV) の発現

ヒト ICC 組織内の Collagen の存在を調べるため、Collagen typeI から typeIV までの免疫染色を行った。

### 2) ヒト ICC 組織 CAFs の characterization と細胞分離

ICC-CAFs の characterization を SMA, PDGFR 以外に肝臓門脈領域線維芽細胞 (Portal fibroblasts : PFs) のマーカーである Thy-1, Fibulin-2, 肝臓星細胞 (Hepatic stellate cells : HSCs) のマーカーである Fascin の DAB および蛍光二重免疫染色にて行った。次に、Thy-1 抗体を用いた MACS にて ICC-CAFs の分離を試みた。

### 3) ヒト ICC 組織における PDGF family, CTGF の発現

ヒト ICC 組織内の PDGF-AA、-BB、-CC、-DD、CTGF の発現を免疫染色にて確認した。また、局在を確認するため蛍光二重免疫を行い、共焦点顕微鏡で観察した。癌細胞のマーカーは pan-cytokeratin、CAFs のマーカーは SMA を用いた。

### 4) ヒト ICC 組織における PDGFR 、 PDGFR の発現

ヒト ICC 組織内の PDGFR 、 PDGFR の発現を免疫染色にて確認した。また、局在を確認するため蛍光二重免疫を行い、共焦点顕微鏡で観察した。癌細胞のマーカーは pan-cytokeratin、CAFs のマーカーは SMA を用いた。

### 5) ICC 細胞株 (RBE 細胞 SSP-25 細胞) における PDGF family および PDGFR の発現

ICC 細胞株 (RBE 細胞 SSP-25 細胞) における PDGF family を RT-PCR にて、PDGFR の発現を western blot にて調べた。各々コントロールを肝線維芽細胞株 (LX-2 細胞) とした。

### 6) PDGF family のヒト ICC 細胞株増殖能への影響

培養 RBE 細胞 および SSP-25 細胞に Recombinant PDGFAA-CC を添加し、増殖能を検討した。増殖能は Alamar Blue Assay を用いて行った。

### 7) PDGFR 阻害剤のヒト ICC 細胞株増殖能への影響

二種類の PDGFR 阻害剤 (CP-673451、

Crenolanib)の ICC 細胞株増殖能への影響を Alamar Blue Assay にて測定した。

#### 4. 研究成果

1) ICC 組織内の免疫染色を行った結果、ICC 間質に Collagen type I, Type III, Type IV の強い発現を認めた。癌細胞にはこれらの発現は認めなかった。

2) ICC 間質には DAB 染色で SMA+細胞、PDGFR +細胞、Thy-1+細胞、Fibulin-2+細胞、を認め、蛍光二重免疫では、SMA 陽性細胞は PDGFR +、Thy-1+、Fibulin-2+であった。以上より ICC-CAFs は PFs マーカーを主に発現し、PFs とよく似た細胞であると考えられた。ICC-CAFs の分離に関しては現在、行っている。

3) PDGFAA-DD のうち、PDGF-BB、-CC、-DD の発現を癌組織に認めた。傾向二重免疫では癌細胞にも CAFs にも PDGF-BB、-CC、-DD の発現を認めた。また、CTGF においても同様の結果を得た。

4) PDGFR-、- の発現を癌組織に認めた。蛍光二重免疫では癌細胞にも CAFs にも PDGFR-、- の発現を認めた。

5) 肝線維芽細胞株(LX-2 細胞)をコントロールとして、PDGF-BB は RBE 細胞で 4.7 倍、SSP-25 細胞は 2.2 倍の発現を認めた。PDGF-CC は RBE 細胞で 1.2 倍、SSP-25 細胞は 0.9 倍の発現を認めた。PDGF-DD は RBE 細胞で 0.4 倍、SSP-25 細胞は 3.7 倍の発現を認めた。また、PDGFR、の発現は LX-2 細胞、RBE 細胞、SSP-25 細胞すべてに発現していた。

6) PDGFAA-DD のうち市販されている PDGF-AA、PDGF-BB および PDGF-CC(すべて 1-80ng/ml) を培養 RBE 細胞および SSP-25 細胞に添加したところ、明らかな細胞増殖効果は見当たらなかった。

7) CP-673451 を培養 RBE 細胞および SSP-25 細胞に添加したところ、ともに 2 $\mu$ M の添加にて細胞増殖率は 68%、66%に抑制された。Crenolanib を培養 RBE 細胞および SSP-25 細胞に添加したところ、ともに 2 $\mu$ M の添加にて細胞増殖率は 70%、62%に抑制された。

以上のことから癌細胞および CAFs から分泌された PDGFs が PDGFR を介して細胞増殖にかかわっている可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1) 宇山直樹, 伊藤礼, 栗本亜美, 岡本共弘, 矢田章人, 末岡英明, 裴正寛, 近藤祐一, 中村育夫, 鈴村和夫, 麻野泰包, 岡田敏弘, 平野公通, 廣田誠一, 河田則文, 藤元治朗. 肝内胆管癌原発巣および転移リンパ節における CAF の免疫染色学的検討. 第 52 回日本肝癌研究会 2016.7 東京

2) 宇山直樹, 伊藤礼, 栗本亜美, 岡本共弘, 大橋浩一郎, 矢田章人, 末岡英明, 裴正寛, 小坂久, 近藤祐一, 中村育夫, 鈴村和夫, 麻野泰包, 岡田敏弘, 平野公通, 廣田誠一, 藤元治朗. 肝内胆管癌 CAF に門脈域線維芽細胞および fibrocytes が関与している. 第 28 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2016.6 大阪

3) Uyama N, Ito R, Kurimoto A, Okamoto T, Yada A, Sueoka H, Hai S, Kosaka H, Kondo Y, Nakamura I, Suzumura K, Asano Y, Okada T, Hirano T, Yamanaka J, Kawada N, Fujimoto J. Cancer associated fibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma is derived from portal fibroblasts, but not hepatic stellate cells; immunohistochemical study in human tissues. The 66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2015) 2015.11 San Francisco

4) 宇山直樹, 岡本共弘, 裴正寛, 中村育夫, 近藤祐一, 鈴村和夫, 麻野泰包, 岡田敏弘, 平野公通, 藤元治朗. 肝内胆管癌組織内における PDGF family の役割に関する免疫組織学的考察. 第 51 回日本胆道学会学術集会 2015.9 宇都宮

[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:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 共弘 (Okamoto, Tomohiro)  
兵庫医科大学・医学部・研究生(研究員)  
研究者番号：00567208

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

宇山 直樹 (Uyama, Naoki)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70402873