

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19922

研究課題名（和文）肝内胆管癌に対する肝切除時に放出されるサイトカインと再発の関係

研究課題名（英文）Interleukin 33, released with hepatectomy, facilitated recurrent disease of cholangiocarcinoma

研究代表者

長岡 慧（Nagaoka, Satoshi）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40745444

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）：IL-33高発現肝に対する肝切除時には血中へIL-33が放出され，長期間IL-33の高発現が保持されていた。肝内胆管癌の背景肝がIL-33高発現肝であることは無再発生存期間の独立予後不良因子であった。細胞実験ではIL-33高発現肝のホモジナイゼーションで得た抽出液の暴露により増殖能，遊走能，浸潤能が有意に上昇した。動物実験において，マウス胆管癌細胞株を用いた同種同所移植モデルの肝切除時にIL-33中和抗体を投与した群と非投与群とを比較すると，投与群で癌発育の抑制が認められた。

研究成果の概要（英文）：The recurrence free survival time of the IL-33 high expression group were significantly shorter than that of the low expression group. The IL-33 released into the plasma following hepatectomy directly correlated with the background liver expression assessed by IHC. IL-33 expression was increased in secondary resected liver specimens as compared to that present in the primary resected liver specimen. The exposure of extracted substances showed significant difference in cell proliferation, migration and invasion ability of CCA cell lines as follows; proliferation assay: 1.28-1.31 folds increase,  $p < 0.001$ , wound healing assay: 1.25-1.27 folds increase,  $p < 0.05$ , invasion assay: 1.40-1.63 folds increase,  $p < 0.05$ , respectively. The syngraft murine model of CCA showed aggressive tumor progression in the remnant liver after hepatic resection, whereas the blockage of IL-33 during hepatic surgery significantly inhibited the tumor progression.

研究分野：消化器外科学

キーワード：Interleukin-33（IL-33） 肝内胆管癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年、マウス実験にて Interleukin-33(以下、IL-33)の短期暴露が、長期間胆管癌の発育を助長する環境を形成することが証明された。IL-33 の臨床における役割についての報告はないが、IL-33 には機械的損傷などの組織障害に応じ、活性化サイトカインの形で細胞外へ放出される特性がある。そこで、胆管癌に対する肝切除時に背景肝から IL-33 が放出され、再発を助長する環境を形成していると仮説し、これを証明することを目的として研究を行った。

## 2. 研究の目的

IL-33 と肝内胆管癌術後再発との関連を解明する

## 3. 研究の方法

(1) 大阪大学で得られた肝内胆管癌切除症例に抗 IL-33 抗体を用いた免疫染色を行う。原発性肝癌の背景肝における IL-33 の発現は報告されているが、肝内胆管癌の背景肝における IL-33 の発現に関しては報告がないため、まず基礎実験として肝内胆管癌の背景肝における IL-33 の発現の有無を確認する。背景肝に IL-33 を豊富に保持している肝内胆管癌では術後再発が促進されると考えており、背景肝における IL-33 発現レベルの高低別で無再発生存期間を比較・検討し、背景肝での IL-33 発現レベルが高いほど術後再発が多い、あるいは術後無再発期間が短いことを確認する。

(2) 肝内胆管癌切除症例の肝切除前後の血液サンプルを用いて血中 IL-33 濃度を ELISA にて測定し、肝切除前後での血中の IL-33 発現レベルを評価し、背景肝の IL-33 発現量と術後放出される IL-33 の量に相関があるかを検討する。

(3) 肝内胆管癌細胞株(HuCCT-1, CCLP-1)を用いて、リコンビナント IL-33 および IL-33 高/低発現肝のホモジナイゼーションで得た抽出液を暴露し、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能、抗癌剤耐性能の変化を評価する。

(4) 動物実験において、肝内胆管癌モデルマウスから樹立したマウス胆管癌細胞株を用いて同種同所移植モデルを作成し、肝切除時に IL-33 中和抗体を投与した群と非投与群とで癌発育能の変化を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 肝内胆管癌の背景肝において IL-33 の発現が確認された。IL-33 陽性細胞数中央値(46.0)を用いて IL-33 高発現群(n=25)、IL-33 低発現群(n=25)に分類した。臨床病理学的背景では IL-33 高発現群より IL-33 低発現群で男性が多かったが( $p=0.0169$ )、他の項目では差を認めなかった。IL-33 高発現群は IL-33

低発現群より無再発生存期間が有意に短く、無再発生存期間中央値は IL-33 高発現群、IL-33 低発現群それぞれ 11.1 ヶ月、33.0 ヶ月であり( $p=0.0149$ )、IL-33 の高発現が無再発生存期間について独立した予後不良因子であった( $p=0.046$ )。

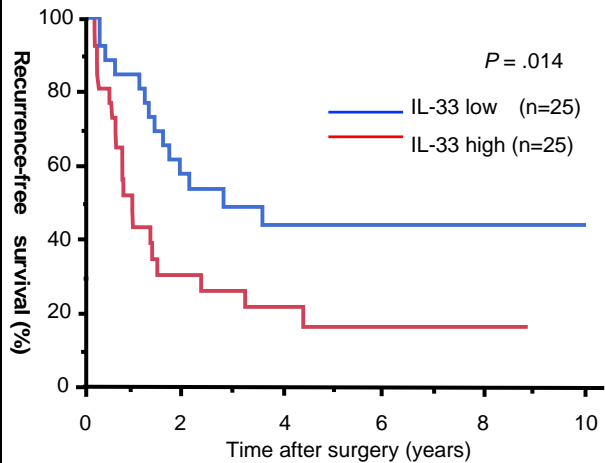


図1 背景肝 IL-33 発現別の無再発生存期間

(2) IL-33 高発現群は IL-33 低発現群より、肝切除前後の IL-33 血中濃度比が有意に上昇していた ( $p<0.01$ )。IL-33 高発現肝に対する肝切除時には血中へ IL-33 が放出され、長期間 IL-33 の高発現が保持されていた。

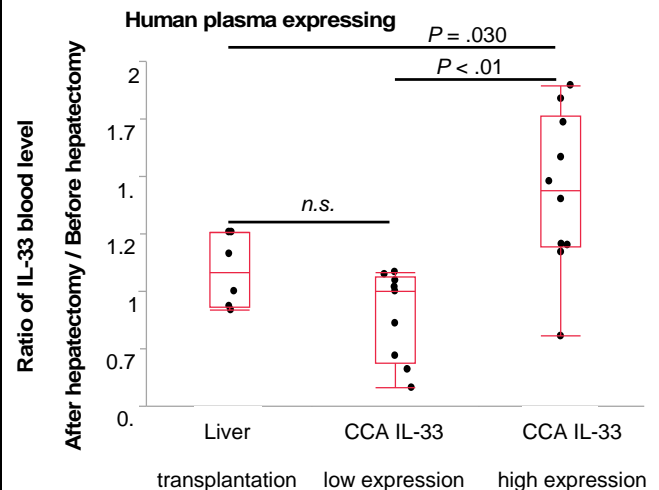
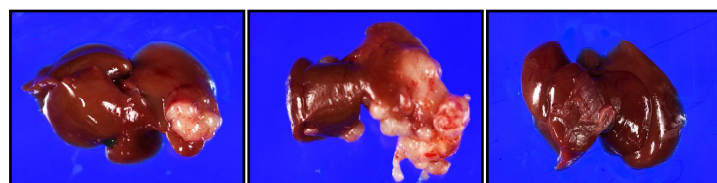


図2 背景肝 IL-33 発現別の肝切除前後の IL-33 血中濃度比

(3) 肝内胆管癌細胞株に対し、リコンビナント IL-33 の暴露は各機能評価に有意な変化を及ぼさなかったが、IL-33 高発現の肝切除検体から抽出した蛋白液を加えた細胞では IL-33 低発現の抽出液を加えた細胞と比較し、増殖能、遊走能の上昇を認めた。Proliferation assay: IL-33 high vs low, 131.6% vs 100.0%, HuCCT-1  $p<0.001$ , 128.5% vs 100.0%, CCLP-1  $p<0.001$ , Wound healing assay: IL-33 high vs low, 108.2% vs 100.0%.

HuCCT-1  $p=0.0277$ , 111.8% vs 100.0%, CCLP-1  $p=0.0165$ . また, 抗癌剤耐性能については肝細胞抽出液の検討でも IL-33 の発現による差は認めなかった。

(4) 肝切除時に IL-33 中和抗体を投与した群と非投与群を比較すると IL-33 中和抗体投与群で癌発育の抑制が認められた。



Laparotomy

Hepatectomy

Hepatectomy +  
anti-IL-33

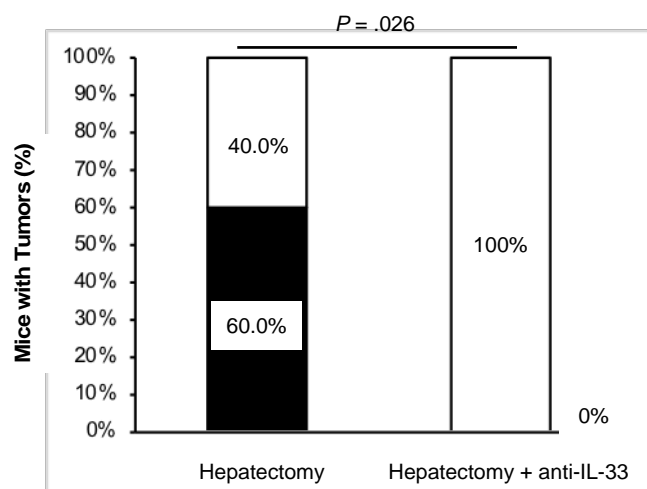


図3 抗 IL-33 中和抗体の投与群, 非投与群におけるマウス肝内胆管癌発癌率

以上の結果より, 肝内胆管癌の背景肝が IL-33 高発現肝の場合, 肝切除時に IL-33 が血中へ放出され, 肝内での発現を高く保持し, 癌悪性能を促進する環境を形成して再発を助長している可能性が示され, また肝切除時に IL-33 阻害薬を用いることで術後再発が抑制される可能性が示唆された。

## 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) 現在投稿準備中

〔学会発表〕(計 10 件)

Satoshi Nagaoka, Interleukin-33 keeping liver makes the circumstances facilitating recurrence of

cholangiocarcinoma, Japan Digestive Disease Week 2017 (JDDW 2017), 2017

Satoshi Nagaoka, Interleukin-33 Keeping Liver Facilitated Recurrence of Cholangiocarcinoma through Indirect Influence, Asian Pacific Digestive Week 2017 (APDW 2017), 2017

長岡慧, 肝内胆管癌において IL-33 高発現保持肝臓が再発に及ぼす影響, 第 26 回日本がん転移学会総会, 2017

長岡慧, 肝内胆管癌再発における Interleukin-33 の直接的・間接的影響に関する検討, 第 72 回日本消化器外科学会総会, 2017

Satoshi Nagaoka, Interleukin-33, Released with Hepatectomy, Facilitated Recurrence of Cholangiocarcinoma Not through Direct Influence, 第 29 回日本肝胆膵外科学会・学術集会, 2017

長岡慧, 肝内胆管癌の再発における背景肝の IL-33 発現の役割, 第 117 回日本外科学会定期学術集会, 2017

Satoshi Nagaoka, IL-33, Released with Hepatectomy, Facilitated Recurrence of Cholangiocarcinoma Not through Direct Influence, The Society of Surgical Oncology Annual Cancer Symposia 2017 (SSO2017), 2017

Satoshi Nagaoka, IL-33, Released with Hepatectomy, Facilitated Recurrence of Cholangiocarcinoma through Indirect Influence, The 26th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL2017), 2017

長岡慧, 肝内胆管癌の再発における背景肝の IL-33 の役割, 第 27 回日本消化器癌発生学会総会, 2016

長岡慧, 肝内胆管癌再発における肝切除後の IL-33 発現の役割, 第 71 回日本消化器外科学会総会, 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

長岡 慧 (NAGAOKA, Satoshi)  
大阪大学医学部附属病院・医員  
研究者番号：40745444

##### (2) 研究分担者

江口 英利 (EGUCHI, Hidetoshi)  
大阪大学医学部附属病院・准教授  
研究者番号：90542118

山田 大作 (YAMADA, Daisaku)  
大阪大学医学部附属病院・准教授  
研究者番号：60571396

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )