

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09133

研究課題名(和文)胆管癌悪性化における癌内線維芽細胞の役割の解明と新規治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the role of intracancerous fibroblasts in bile duct cancer malignancy and its application to new therapies

研究代表者

今村 宏(imamura, hiroschi)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00283268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胆管癌間質に多く存在する癌内線維芽細胞(CAFs)は癌細胞の浸潤、転移の促進や治療抵抗性獲得に関与しているが、その分子機構はまだ不明な点が多い。本研究では、CAFが胆管癌細胞にもたらす影響を明らかにするため、5例の手術により摘出された胆管癌部および非癌部の検体を採取し、primary cultureにより4例のCAFおよびコントロールの線維芽細胞の樹立に成功した。5症例の胆管癌を高度免疫不全NOGマウスに移植したが癌の増殖はみられなかった。今後は、臨床検体より直接癌オルガノイドを樹立することにより症例を増やしCAFと胆管癌細胞の相互作用を媒介する遺伝子やシグナルの同定を試みたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、申請者らはCAFが近傍の癌細胞にpartial EMT(epithelial-mesenchymal transition)を誘導する可能性に注目している。partial EMTが細胞-細胞接着を維持した癌細胞クラスターの形成および間葉系の表現型を誘導し、癌細胞の浸潤・転移能や治療抵抗性を促進させる可能性を提案した。本研究が成功した場合は、CAFによる新規の浸潤・転移能や治療抵抗性能促進メカニズムを解明できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Carcinoma-associated fibroblasts (CAFs), which are abundant in the stroma of cholangiocarcinoma, are involved in infiltration of cancer cells, promotion of metastasis, and acquisition of treatment resistance, but the molecular mechanism remains unclear. In this study, in order to clarify roles of CAFs on cholangiocarcinoma progression, specimens of bile duct cancer and non-cancerous parts removed by surgery were collected in 5 cases, and 4 cases of CAFs and control fibers were successfully collected by primary culture. Five cases of bile duct cancer were transplanted into highly immunodeficient NOG mice, but no cancer growth was observed. In the future, we would like to increase the number of cases by establishing cancer organoids directly from clinical specimens and try to identify genes and signals that mediate the interaction between CAFs and bile duct cancer cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：胆管管 CAFs 癌微小環境 オルガノイド PDX

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

$\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 陽性の活性化筋線維芽細胞である CAFs は患者胆管癌の間質で多く検出される。CAFs は、腫瘍の増殖、浸潤や転移さらには癌細胞の治療抵抗性に寄与することが知られている。

申請者らは、乳癌内に存在する線維芽細胞が癌化の過程で癌細胞の影響下でより悪性度の増した CAFs に分化し、正常組織に存在する線維芽細胞とは異なった性質を獲得していることをこれまでに明らかにした(Orimo, A., et al., *Cell* 121, 335-348, 2005)。またヒト乳癌より抽出された CAFs は血管新生促進性サイトカイン stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) を高発現し乳癌の血管新生や増殖を促進することを示した。さらに、CAFs が癌の進展過程で SDF-1 と TGF- $\beta$  シグナルを亢進し、癌促進能の表現型を安定に維持し、癌細胞と独立した癌化を促進する細胞であることを明らかにした (Kojima, Y., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107, 20009-20014, 2011)。しかしながら、CAFs が癌細胞に高転移性や治療抵抗性をもたらすメカニズムはまだ不明である。

以前より癌浸潤・転移を促進するプログラムとして完全型上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が広く知られている(Thiery, J.P., et al., (2009). *Cell* 139, 871-890.)。EMT が誘導されると上皮系の表現型を消失した癌細胞は細胞-細胞接着能を失い、単一の間葉系癌細胞としてその浸潤能を亢進し、遠隔臓器に転移し、間葉上皮移行 (mesenchymal-epithelial transition: MET) を介して上皮系の表現型が再誘導され転移巣を形成する。しかしながら、近年、EMT 非依存的に間葉系の表現型を介することなく上皮系癌細胞集団(クラスター)が転移する説も報告されている (Cheung, K.J., and Ewald, A.J., *Science* 352, 167-169, 2016)。また、最近多くの患者癌において、partial (部分的) EMT を介して E-cadherin の弱陽性および間葉系の表現型を有した癌細胞 (epithelial-mesenchymal type: E/M type) が細胞-細胞接着能を維持したクラスターを形成し、浸潤・転移に寄与することも提唱されている (Nieto, M.A., et al., *Emt*: 2016. *Cell* 166, 21-45, 2016)。

申請者は CAFs が癌細胞に作用し partial EMT を誘導することにより、E/M type の癌細胞クラスター形成を促進することを推測している。この E/M type の癌細胞クラスターは浸潤能および apoptosis 抵抗性を亢進し、高転移性の表現型や治療抵抗性を示すことが推測される。本研究ではこの仮説を分子レベルで解明し、治療応用へ向けての基礎を構築する。

### 2. 研究の目的

癌患者の死因の 9 割は浸潤・転移による治療抵抗性の獲得に関与しているにもかかわらず、現在に至るまでこれらの病態の分子メカニズムの解明は発展途上の段階である。本研究において、申請者らは CAFs が近傍の癌細胞に partial EMT を誘導する可能性に注目している。独自のアイデアとして partial EMT は細胞-細胞接着を維持した癌細胞クラスターの形成および間葉系の表現型を誘導し、癌細胞の浸潤・転移能や治療抵抗性を促進させる可能性を提案した。また、近年数々の PDX モデルの作製が行なわれているが、胆管癌 PDX を使用した CAFs の共移植モデルの報告は現時点ではない。申請者らはヒト癌 PDX モデルの樹立や organoid 培養に精通している。これらの手法をもとに、CAF-胆管癌 PDX を新規モデルとして樹立し、本申請課題の解明に取り組む予定である。

### 3. 研究の方法

本研究では、CAFs による胆管癌の浸潤・転移や治療抵抗性メカニズムならびに抑制法を解明することを目的として、以下の課題と目標を設定した。

#### 課題 1) 胆管癌 PDX モデルおよび CAFs の樹立

同所移植を容易にするためにまず患者癌塊を NOG (NOD/Shiscid, IL-2RyKO) マウスの皮下に移植することを試みる。患者胆管癌切除検体 (直径 7 mm 程度) をマトリゲル® (Falcon) とともに NOG マウスの皮下に移植する。数か月後、皮下で増殖した癌塊を collagenase で消化し single cell suspension を作製し、新たな NOG マウスの胆管部に同所移植する。もし移植が困難な場合は、数種類の注入針のサイズ (23~30G) を検討し、細胞に与えるダメージを最小化しつつ最も細い注射針を用いる。あるいは皮下移植に変更する。NOG マウスに同所移植後 6 か月間経過を観察し、原発巣の増殖や転移の有無を評価する。8~10 例の胆管癌の移植を予定している。

#### 課題 2) 胆管癌組織由来 CAFs および胆管癌 PDX との共移植系の確立

申請者は高度免疫不全 NOG マウスを使用し、ヒト大腸癌組織を移植した PDX モデルマウスの樹立に成功している (特許出願: 患者原発性大腸癌の個別化転移モデルマウスの作製方法、発明者: 折茂彰他 6 名、出願番号: 2013-193525, 出願日: 平成 25 年 9 月 18 日)。この技術を用い申請者らは、先行研究で PDX 由来大腸癌細胞と乳癌由来 CAFs の共移植を施行した。非癌部由来

線維芽細胞が移植された場合と比較し、CAFs は有意に肝臓や肺への転移を促進した。  
今後の CAFs 促進性の癌浸潤・転移機構の分子メカニズムの解析において、CAFs と癌細胞の癌種を統一することが重要である。本研究では、課題 1 で樹立された患者胆管癌由来 CAFs と胆管癌 PDXs の共移植の系を樹立する。申請者は、CAFs が癌細胞に作用すると、partial EMT を介して E/M タイプの癌細胞を誘導し、低分化能や浸潤・転移能を誘導することを予期している。

#### 課題 3) CAFs による胆管癌浸潤・転移促進や治療抵抗性に関するメカニズムの調査

上記課題 2 )の DNA マイクロアレイ解析にてグループ間で発現に差が認められた遺伝子のうち、その差が顕著な 5 つの遺伝子の発現を shRNA を用いて抑制し、partial EMT との関与を調査する。

#### 4 . 研究成果

胆管癌間質に多く存在する癌内線維芽細胞 (CAFs)は癌細胞の浸潤、転移の促進や治療抵抗性獲得に関与しているが、その分子機構はまだ不明な点が多い。本研究では、CAFs が胆管癌細胞にもたらす影響を明らかにするため、5 例の手術により摘出された胆管癌部および非癌部の検体を採取した。採取した検体をミンスし酵素処理により単一細胞化して 10%FCS-dMEM の培養液を添加して培養皿上にて線維芽細胞の培養を施行した。線維芽細胞の増殖は全般的に遅く、特に非癌部の検体よりの線維芽細胞の増殖は遅かった。これは手術で採取可能な非癌部の検体の量が少なく限られていることより細胞を増やしている間にすでに細胞老化を起している可能性が示唆された。結果的に primary culture により 4 例の CAFs およびコントロールの線維芽細胞の樹立に成功した。

また手術で採取された 5 症例の胆管癌の小癌塊 ( 5 mm x 5 mm ) をマトリゲル溶液に浸した後に高度免疫不全 NOG マウスの皮下に移植した。1 年間経過を観察したがいずれのマウスにも癌の増殖はみられなかった。申請者らは以前 40 例の患者大腸癌組織を NOG マウスの皮下に移植し 28 例 ( 70% ) で癌の生着や増殖を観察した ( Mizukoshi K et al., *Int J Cancer*, 146, 2547-2562, 2020)。また他のグループも患者由来胆管癌を NOD-SCID 高度免疫不全マウスに皮下移植し癌の生着率は 45% であった ( Leiting et al, *JHEP Rep.* 2020, 2, 100068 )。今回の胆管癌の NOG マウスへの生着率が 20% 以下という我々の結果は極めて低く、これが癌の性質以外にも手技的なものに起因している可能性が大きいと推測している。今後は、臨床検体をマウスに移植することなく、検体より直接培養癌オルガノイドを樹立し CAFs と胆管癌の相互作用を媒介する遺伝子やシグナルの同定を試みたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryuji Yoshioka, Hiroshi Imamura, Hirofumi Ichida, Yu Gyoda, Tomoya Mizuno, Yoshihiro Mise, Akio Saito	4. 巻 16
2. 論文標題 Simulation training in pancreatico-jejunostomy using an inanimate biotissue model improves the technical skills of hepatobiliary-pancreatic surgical fellows	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0244915.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0244915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gyoda Y, Imamura H, Ichida H, Yoshimoto J, Ishizaki Y, Kuwatsuru R, Kawasaki S.	4. 巻 34
2. 論文標題 Significance of hypovascular lesions on dynamic computed tomography and/or gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging in patients with hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 1242-1248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.14510.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oguro S, Yoshimoto J, Imamura H, Ishizaki Y, Kawasaki S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Clinical significance of macroscopic no-margin hepatectomy for hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 HPB (Oxford)	6. 最初と最後の頁 872-880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hpb.2018.03.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oguro S, Yoshimoto J, Imamura H, Ishizaki Y, Kawasaki S.	4. 巻 24
2. 論文標題 Three hundred and sixty-eight consecutive pancreaticoduodenectomies with zero mortality.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci.	6. 最初と最後の頁 226-234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.433.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	折茂 彰  (akria orimo)  (70275866)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授   (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------