

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09190

研究課題名(和文) 肝内胆管癌におけるIL-32-Gankyrin axisを介した癌進展機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of cancer progression mediated by IL-32-Gankyrin axis in intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

三島 敬 (Mishima, Takashi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70802560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：当科切除症例75例の免疫組織化学染色では、腫瘍細胞におけるGankyrin高発現群は有意に予後が不良であったが、IL-32に関しては、予後に差は認められなかった。しかし、腫瘍周囲組織におけるIL-32の発現を評価したところ、腫瘍周囲組織(腫瘍間質)におけるIL-32高発現群は、低発現群と比較して有意に予後が悪い($p=0.05$)事が明らかとなった。さらに、腫瘍周囲にIL-32が高発現している症例では、血管浸潤をきたしている症例が多く、IL-32は腫瘍周囲組織から悪性度の維持等に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-32とGankyrinの関連は明らかには出来ていないものの、IL-32は肝内胆管癌において、腫瘍周囲から悪性度の維持などの影響を及ぼしている可能性がある。IL-32は癌腫によりその働きは違い、悪性度を高めているものから弱めるものまで様々である。しかし、肝内胆管癌においては悪性度を高める方向に働いている事が本研究により示唆された。今後も細胞レベルでの研究を続けることで、新たな治療ターゲットの一つとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Results of the immunohistochemical staining of 75 resected intrahepatic cholangiocarcinoma cases in our department revealed that the group with high gankyrin expression in tumor cells had a significantly worse prognosis. However, the prognosis of the group with high interleukin-32 (IL-32) expression in tumor cells was not different from the group with low IL-32 expression. However, in the evaluation of IL-32 expression in peritumoral tissues, the group with high IL-32 expression in peritumoral tissues (tumor stroma) had a significantly worse prognosis compared to the group with low IL-32 expression ($p = 0.05$). Furthermore, many of the patients with high IL-32 expression in the peritumoral tissues had vascular invasion, suggesting that IL-32 may influence the maintenance of tumor cells' malignancy potential in a paracrine manner.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝内胆管癌 IL-32 Gankyrin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌に關与する oncoprotein のうち、Gankyrin は腫瘍の proliferation、invasiveness、stemness features の維持に關与するなど、多岐にわたり tumor progression に關与している。当施設切除例の検討でも、免疫組織化学染色において Gankyrin が高発現である症例は低発現である症例と比較して有意に予後が不良であった(結果未報告)。

Gankyrin は肝内胆管癌のみならず、ほとんどの癌腫において発現が認められている。治療標的としても注目されているものの、臨床応用可能な治療薬の開発までには至っていないのが現状である。さらにその調節因子も不明である。

肝内胆管癌は、肝細胞癌と比較して間質に富む腫瘍であり、腫瘍細胞内のみならず、周囲間質にもその調節因子が存在する可能性があることを考え、今回我々は癌に關連するサイトカインとして報告が散見されている IL-32 に着目した。IL-32 にはいくつかの isoform が存在するが、IL-32 α は肝細胞癌において NF- κ B、Bcl2 に關連し、肝細胞癌の tumor progression に關与していると報告されている(Kang et al., Cancer Lett, 2012)。他にも、cancer stemness の維持に關わるなど、Gankyrin との類似性が報告されている。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究ではまず肝内胆管癌において Gankyrin と IL-32 の間にどのような関係があるかを明らかにし、さらに肝内胆管癌当科切除例における IL-32 発現と臨床病理学的因子との關連を解析することで、IL-32 が肝内胆管癌の tumor progression にどのように關与しているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝内胆管癌切除標本における Gankyrin の発現についての検討

まず当科にて切除された肝内胆管癌症例(1998年から2019年の間に切除された腫瘍形成型もしくは腫瘍形成 + 胆管浸潤型の肝内胆管癌)75症例を対象にパラフィンブロックから得られた標本の免疫組織化学染色により、Gankyrin の発現を検討した。対象となる症例のうち前期の45例に関しては、Gankyrin の発現について以前当科において検討を行っており、さらに後期の30症例を加えた計75例に対して抗 Gankyrin 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

(2) 肝内胆管癌切除標本における IL-32 の発現とその局在についての検討

さらに前項で Gankyrin の発現を検討した75例に対し、IL-32 発現について免疫組織化学染色にて検討した。IL-32 には α ~ θ までと isoform が存在するが、現時点では isoform ごとく抗体は存在しないため、全 isoform をカバーした抗 IL-32 抗体を用いて、検討した。

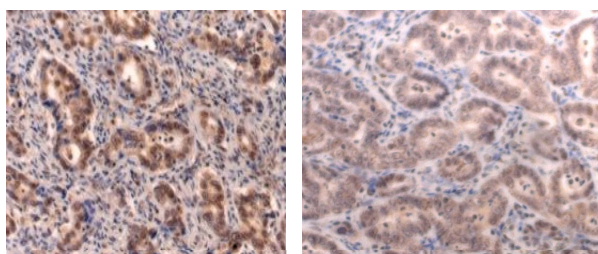
評価にあたっては、腫瘍細胞のみならず、周囲間質も評価し、臨床病理学的因子との關連や予後の解析を行った。また Gankyrin の発現と IL-32 の発現との間の相関を検討した。

(3) 肝内胆管癌細胞株における Gankyrin と IL-32 の相互作用の検討

肝内胆管癌細胞株(HuCCT-1、HuH-28)を用いて、IL-32 の siRNA を transfection することにより IL-32 の knockdown を行った。それにより、Gankyrin の発現がどのように変化するかを western blot にて検討した。また逆に Gankyrin の siRNA を transfection することにより Gankyrin の knockdown を行い、IL-32 の発現がどのように変化するかを解析した。

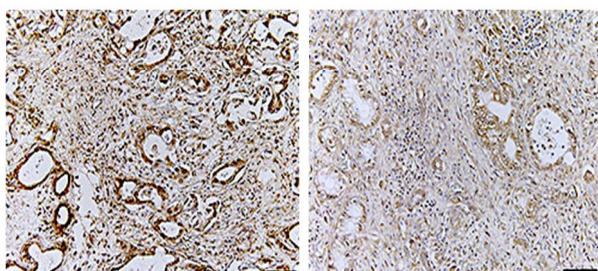
4. 研究成果

(1) 肝内胆管癌切除標本の腫瘍細胞においては、腫瘍細胞に於ける Gankryin と IL-32 の発現の相関は認められなかった。



Gankryin High (cancer cells) Gankryin Low (cancer cells)

Fig.1 Gankryin expression of cancer cells



IL-32 High (cancer cells) IL-32 Low (cancer cells)

Fig.2 IL-32 expression of cancer cells

当科切除症例 75 症例に於ける免疫組織化学染色の結果、Gankryin は 48 例が高発現であった(Fig.1)。また IL-32 においては、47 例が高発現(Fig.2)であった。予後に関しては、Gankryin 高発現群は有意に予後が不良であった。これは当科の少数例の検討でも明らかであったが、症例を増やした今回の検討では、予後にさらに差が認められた($p=0.009$)。しかしながら、IL-32 に関しては、予後に差は認められなかった($p=0.725$) (Fig.3)。

さらに、腫瘍細胞における IL-32 の発現、Gankryin の発現をスコア化し、このスコアに相関があるかを検討したが、腫瘍細胞における Gankryin 発現と、IL-32 の間には相関は認められなかった (Fig.4)。

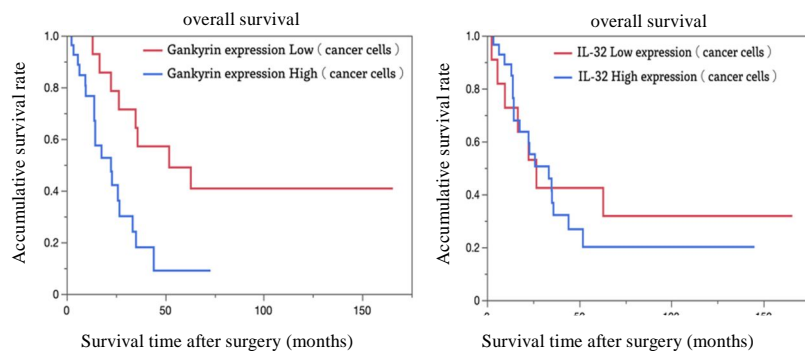


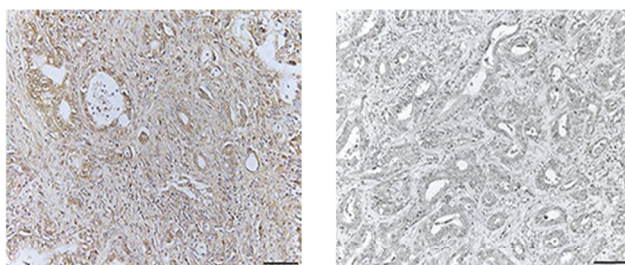
Fig.3 Patient's prognosis

		Gankryin Score			
		0	1	2	3
IL-32 score (cancer cell)	0	0	3	1	1
	1	1	9	7	6
	2	0	5	11	7
	3	0	9	11	4

$p=0.521$ $r=0.052$

Fig.4 Relationship between Gankryin and IL-32 expression in cancer cells

(2) 肝内胆管癌腫瘍間質における IL-32 発現は、予後に影響する。



IL-32 High (stroma) IL-32 Low (stroma)

Fig.5 IL-32 expression of stroma

次に、IL-32 による免疫組織化学染色の結果を腫瘍間質に着目し、高発現群、低発現群に分けて評価したところ、腫瘍間質における IL-32 高発現群は、低発現群と比較して有意に予後が悪い($p=0.05$)事が明らかとなった(Fig.5)。しかし、間質における IL-32 の発現と、Gankryin の発現を前

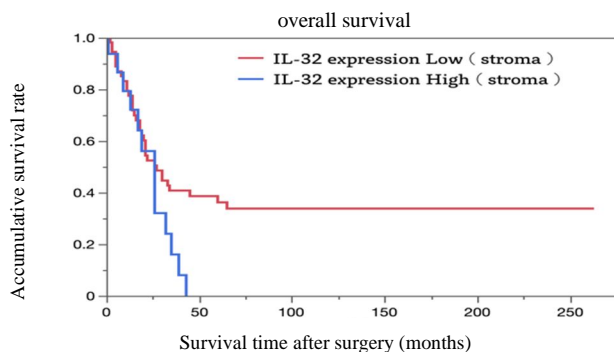


Fig.6 Patient's prognosis

		Gankryin score			
		0	1	2	3
IL-32 score (stroma)	0	0	2	0	1
	1	0	8	6	8
	2	1	12	15	6
	3	0	4	9	3

$p=0.614$ $r=-0.051$

Fig.7 Relationship between Gankryin and IL-32 expression in stroma

項同様にスコア化し、相関を検討したものの、相関関係は認められなかった(Fig.6)。

臨床病理学的因子に免疫組織化学染色の発現評価の結果を加えたうえで、Cox-hazard model による予後規定因子の解析をすると、単変量解析では、Histological grade が G3 であること (p=0.0011)、Gankyrin 高発現(p=0.0126)の 2 因子が予後不良因子であり、これら 2 因子をは多変量解析においても、いずれも独立した予後不良因子であった (Table 1)。

Variables	Overall survival					
	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Hazard ratio	95% CI	p	Hazard ratio	95% CI	p
Sex (M / F)	1.52	0.85 - 2.72	0.1546			
Age (≥ 70y.o. / < 70y.o.)	0.85	0.47 - 1.52	0.5775			
Tumor size (≥ 50mm / < 50mm)	1.65	0.93 - 2.91	0.0841			
Histological grade (G3 / G1 or G2)	3.05	1.56 - 5.97	0.0011	2.70	1.37 - 5.32	0.004
Vasucular invasion (+ / -)	1.51	0.73 - 3.13	0.2658			
Lymph node metastasis (+ / -)	1.58	0.87 - 2.87	0.1288			
Gankyrin expression (High / Low)	2.17	1.18 - 3.98	0.0126	2.01	1.08 - 3.77	0.029
IL-32 expression in tumor cell (High / Low)	0.94	0.53 - 1.68	0.8321			
IL-32 expression in stroma (High / Low)	1.85	0.97 - 3.54	0.0626			

Table 1 Prognostic factors of 75 intrahepatic cholangiocarcinoma patients in Cox's proportional hazard model

さらに Gankyrin,IL-32 の発現と臨床病理学的因子との関連を個別に検討したところ、IL-32 においては cancer cell での高発現の症例は有意に胆管浸潤(b)が多く、stroma に高発現している症例には、有意に動脈浸潤、胆管浸潤が多く、Higtological grade が G3 の症例が多かった(table 2)。

		Gankyrin expression			p	IL-32 expression (cancer cells)			p	IL-32 expression (stroma)			p
		Low	High	p		Low	High	p		Low	High	p	
Sex	F	33	13	20	0.5877	9	24	0.1075	33	12	21	0.6221	
	M	42	14	28		19	23		42	13	29		
Age	≥ 70 y.o.	43	18	25	0.2203	21	22	0.0170*	43	11	32	0.0988	
	< 70 y.o.	32	9	23		7	25		32	14	18		
Histological grade (UICC)	G1/2	58	23	35	0.281	19	39	0.0863	58	23	35	0.0420*	
	G3	16	4	12		9	7		16	2	14		
Tumor size	< 50	25	10	15	0.6098	6	19	0.0914	25	6	19	0.2253	
	≥ 50	50	17	33		22	28		50	19	31		
pN	(-)	48	19	29	0.3887	20	28	0.3009	48	19	29	0.1258	
	(+)	27	8	19		8	19		27	6	21		
vp	(-)	25	10	15	0.6098	9	16	0.8659	25	10	15	0.3865	
	(+)	50	17	33		19	31		50	15	35		
vv	(-)	40	20	20	0.0069*	17	23	0.3227	40	13	27	0.87	
	(+)	35	7	28		11	24		35	12	23		
va	(-)	66	27	39	0.0165*	25	41	0.7914	66	25	41	0.0237*	
	(+)	9	0	9		3	6		9	0	9		
b	(-)	26	13	13	0.0658	14	12	0.0313*	26	14	12	0.0061*	
	(+)	49	14	35		14	35		49	11	38		

Table 2 Clinicopathological features of 75 intrahepatic cholangiocarcinoma patients

(3) 肝内胆管癌細胞株においては、IL-32 の発現は Gankyrin 発現の影響を受けない。

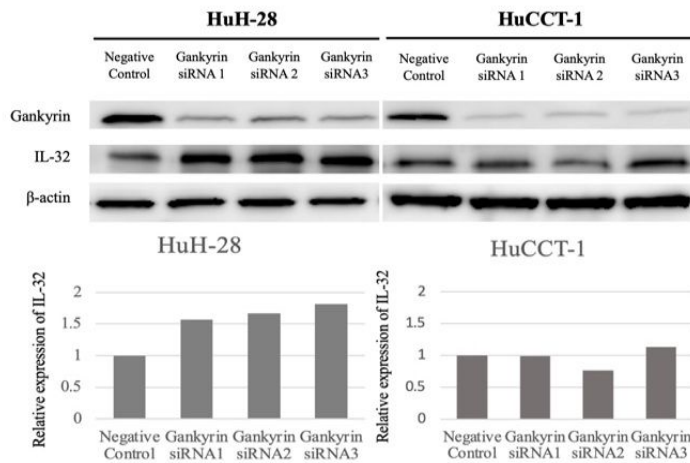


Fig.6 Western blot analysis of ICC cells transfected with Gankyrin siRNA

免疫染色では相関関係が認められなかったが、肝内胆管癌細胞株 (HuCCT-1, HuH-28) における IL-32 の knockdown を行い、Gankyrin の発現の変化を検討した。

これにより IL-32 が Gankyrin の調節にどのように関連しているかを明らかにする予定であったが、現在のところ、siRNA の transfection による knockdown が出来ておらず、今後も条件検討を重ね継続して行う予定である。

しかし、Gankyrin の siRNA を用いた Gankyrin の knockdown 実験を並行して行っていたが、こちらの knockdown には成功しており (Fig.6)、Gankyrin の knockdown による IL-32 の減弱は認められなかった (HuH-28 においては、若干の発現の増強を認めていた)。

以上より、現段階では IL-32 は間質を通じて肝内胆管癌の予後に影響をおよぼしている可能性があり、臨床病理学的因子の検討からは、血管浸潤ないし胆管浸潤への関与が疑われているという点が明らかになったが、Gankyrin の調節因子としての働きは現在明らかにできていない。

よって今後は、IL-32 の Knockdown によって Gankyrin の発現がどのように変化するかという点を引き続き検証してゆくとともに、腫瘍間質での IL-32 の発現が腫瘍の malignant potential に関与している可能性を考え、paracrine manner による IL-32 の腫瘍細胞への影響を検証してゆく。具体的には、recombinant IL-32 を肝内胆管癌細胞株の培地に各種濃度で混和した上で培養をし、細胞の機能解析等を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakai Nozomu, Yoshitomi Hideyuki, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takano Shigetsugu, Suzuki Daisuke, Kagawa Shingo, Mishima Takashi, Nakadai Eri, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Outcome of interventional radiology for delayed postoperative hemorrhage in hepatobiliary and pancreatic surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 2264 ~ 2272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Yutaka, Sakai Nozomu, Yoshitomi Hideyuki, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takano Shigetsugu, Suzuki Daisuke, Kagawa Shingo, Mishima Takashi, Nakadai Eri, Miyauchi Hideaki, Matsubara Hisahiro, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 111
2. 論文標題 High expression of Kruppel like factor 5 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2078 ~ 2092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14411	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 Takano Shigetsugu, Yoshitomi Hideyuki, Kagawa Shingo, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Suzuki Daisuke, Sakai Nozomu, Mishima Takashi, Nakadai Eri, Miyazaki Masaru, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Long-term outcomes and significance of preoperative lymphocyte-to-monocyte ratio as a prognostic indicator in patients with invasive pancreatic neoplasms after repeat pancreatectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 6602-6604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-6602-4	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 -

1. 著者名 Sato Nami, Takano Shigetsugu, Yoshitomi Hideyuki, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Suzuki Daisuke, Sakai Nozomu, Kagawa Shingo, Mishima Takashi, Nakadai Eri, Mikata Rintaro, Kato Naoya, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Needle tract seeding recurrence of pancreatic cancer in the gastric wall with paragastric lymph node metastasis after endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration followed by pancreatectomy: a case report and literature review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-020-1159-x	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 Sugiura K, Mishima T, Takano S, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Takada M, Miyazaki M, Ohtsuka M.	4. 巻 189
2. 論文標題 The Expression of Yes-Associated Protein (YAP) Maintains Putative Cancer Stemness and Is Associated with Poor Prognosis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 1863-1877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.05.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takano S, Yoshitomi H, Kagawa S, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Suzuki D, Sakai N, Mishima T, Nakadai E, Miyazaki M, Ohtsuka M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Long-term outcomes and significance of preoperative lymphocyte-to-monocyte ratio as a prognostic indicator in patients with invasive pancreatic neoplasms after repeat pancreatectomy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-6602-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda A, Sakai N, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Takano S, Suzuki D, Kagawa S, Mishima T, Nakadai E, Miyazaki M, Ohtsuka M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Is hepatic artery coil embolization useful in distal pancreatectomy with en bloc celiac axis resection for locally advanced pancreatic cancer?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World J Surg Oncol. 124	6. 最初と最後の頁 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12957-019-1667-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokota T, Takano S, Yoshitomi H, Kagawa S, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Suzuki D, Sakai N, Nojima H, Mishima T, Nakadai E, Ohtsuka M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Successful treatment of a locally advanced unresectable pancreatic cancer patient with interstitial pneumonitis by conversion surgery following gemcitabine plus nab-paclitaxel chemotherapy: A case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 419-424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2019.1807.	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takashi Mishima, Shigetsugu Takano, Katsunori furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Daisuike Suzuki, Nozomu Sakai, Shingo Kagawa, Isamu Hosokawa, Takanori Konishi, Masayuki Ohtsuka
2. 発表標題 Analysis of correlation between resection margin and recurrence in patients with IPMN
3. 学会等名 The 32nd Meeting of Japanese Society of Hepato Billiary Pancreatic Surgery
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Shigetsugu Takano, Hideyuki Yoshitomi, Shingo Kagawa, Furukawa Katsunori, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Daisuke Suzuki, Nozomu Sakai, Takashi Mishima, Eri Nakadai, Masayuki Ohtsuka
2. 発表標題 The clinical impact and analysis for neoadjuvant chemotherapy against borderline resectable pancreatic cancer: gemcitabine plus S-1 vs gemcitabine plus nab-paclitaxel.
3. 学会等名 AACR special conference Pancreatic Cancer: Advances in Science and Clinical Care (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Sasaki, Shigetsugu Takano, Hideyuki Yoshitomi, Kazuyuki Sogawa, Shingo Kagawa, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Daisuke Suzuki, Nozomu Sakai, Takashi Mishima, Eri Nakadai, Masayuki Ohtsuka
2. 発表標題 C4BPA identified as a novel biomarker is associated with favorable outcome of patients with pancreatic cancer.
3. 学会等名 AACR special conference Pancreatic Cancer: Advances in Science and Clinical Care (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoji Miyahara, Shigetsugu Takano, Hideyuki Yoshitomi, Shingo Kagawa, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Daisuke Suzuki, Nozomu Sakai, Takashi Mishima, Eri Nakadai, Masayuki Ohtsuka
2. 発表標題 The impact of Lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) in patients with borderline resectable pancreatic head cancer after curative surgery.
3. 学会等名 AACR special conference Pancreatic Cancer: Advances in Science and Clinical Care (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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	野島 広之 (Nojima Hiroyuki) (10507320)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	
研究分担者	高野 重紹 (Takano Shigetsugu) (20436380)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	
研究分担者	久保木 知 (Kuboki Satoshi) (50571410)	千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501)	
研究分担者	大塚 将之 (Ohtsuka Masayuki) (90334185)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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
---------	---------