

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06166・19K21275

研究課題名(和文) 神経微小環境と胆道発癌に関する機序解明と治療標的の検討

研究課題名(英文) Can B2 Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promote Biliary Tract Cancer (BTC) and be the therapeutic target for BTC?

研究代表者

田中 貴之 (TANAKA, Takayuki)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：40823290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌は極めて予後不良な悪性疾患である。しかし、そのメカニズムが未解明であるため、有効な治療・予防法が確立されていない。これまでに交感神経(ストレス)が誘発するカテコラミンとその受容体であるアドレナリン受容体が膵癌に関与しているという報告を受け、胆道発癌ならびに癌促進においても同様のメカニズムが存在することを今回明らかにし、肝内胆管癌における神経微小環境には、ADRB2を介した機序が存在していることが考えられ、今後、予後不良な胆管癌治療の標的になる可能性が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝内胆管癌は5年生存率30%と予後不良な疾患であり、胆管癌も膵癌同様、前癌病変からの多段階発癌を特徴としている。また、同じ交感神経支配下にある肝内胆管癌も同様のメカニズムが存在している可能性が非常に高い。本研究では交感神経(ストレス)が誘発するカテコラミンとその受容体であるADRB2の陽性率が高いほど予後不良であり、またそのADRB2-カテコラミン伝達肝内胆管癌治療の標的になる可能性が示唆された。それゆえに、今後の肝内胆管癌の治療に飛躍的な効果を生み出すことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Intrahepatic cholangiocarcinoma is a malignant disease with an extremely poor prognosis. Since the mechanism of the disease remains still unknown, effective treatment and prevention methods have not been established. Following the report that sympathetic stress-induced catecholamines and adrenergic receptor2 (ADRB2), are involved in pancreatic cancer, our study realized that the same mechanism as pancreatic cancer exists in biliary carcinogenesis and cancer promotion, and that ADRB2-mediated mechanisms exist in the neural microenvironment of intrahepatic cholangiocarcinoma. This finding suggested that the neuronal microenvironment in intrahepatic cholangiocarcinoma may be mediated by ADRB2, which may become a target for the treatment of cholangiocarcinoma with poor prognosis.

研究分野：肝胆膵・移植外科

キーワード：肝内胆管癌 交感神経刺激 神経微小環境 アドレナリン受容体2 (ADRB2) 神経成長因子 (NGF)

1. 研究開始当初の背景

胆管癌は極めて予後不良な悪性疾患である。しかし、その発症機構が未解明であるため、有効な治療・予防法が確立されていない。研究代表者は、ストレス環境下で誘発されるカテコラミンが、 β_2 アドレナリン受容体 (ADRB2) を介して腫瘍増生を促進させ、さらに神経成長因子により交感神経伸長を促進させる feeding forward loop が形成されることを膵前癌病変や膵癌で突き止めた。また、逆にそれらのシグナル伝達を阻害することで腫瘍増生が抑制されることもわかった (Renz WB, Tanaka T et al. Cancer Cell 2018)。一方、肝内胆管癌は5年生存率30%(第21回全国追跡調査報告)と予後不良な疾患であり、胆管癌も膵癌同様、前癌病変からの多段階発癌を特徴としており、同じ交感神経支配下にある胆管癌も同様のメカニズムが存在している可能性が非常に高い。本研究では交感神経(ストレス)が誘発するカテコラミンとその受容体である ADRB2 が胆道発癌ならびに癌促進に関与することを明らかにし、予後不良な胆管癌治療の標的になる可能性が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的はカテコラミン-ADRB2 シグナル伝達の胆管発癌への関与メカニズムを明らかにし、さらにはその伝達シグナルが治療標的になりうるかどうか、その可能性を見出すことである。

3. 研究の方法

1) In vitro 実験

- ①肝内胆管癌細胞株を利用したアドレナリン受容体(ADRB1~3)の発現解析(RT-PCR)
- ②ノルアドレナリン負荷による癌細胞増殖実験
- ③神経成長因子 (NGF) の発現実験 (RT-PCR、ELISA)
- ④ノルアドレナリン負荷による癌細胞共培養条件下における神経細胞遊走実験

2) 肝内胆管癌患者の切除切片を利用した検討

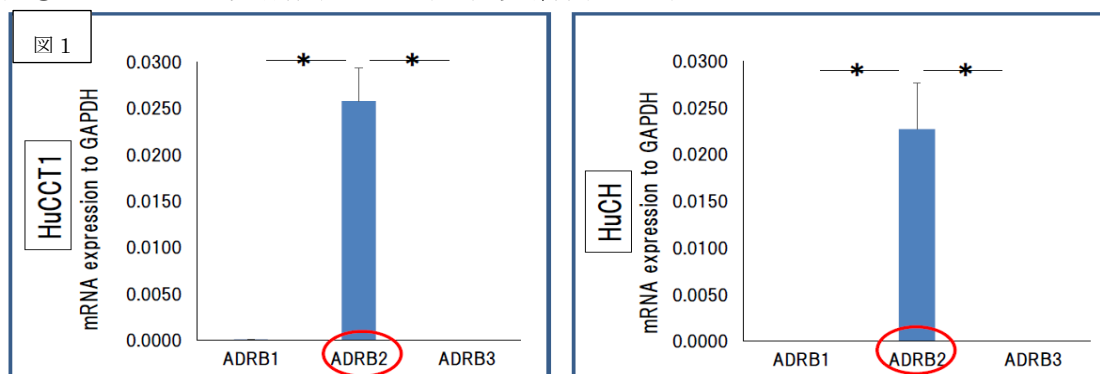
対象：2019年12月31日までの肝内胆管癌切除61例
[年齢(中央値)72歳(23-88歳)、男女比39:22]

評価項目：

- ①癌部・非癌部における ADRB2・神経特異的マーカーである Peripherin 染色の視野面積に対する平均陽性率算出(100倍、無作為5視野)
- ②患者背景および臨床病理学的因子の検討
- ③生存率

4. 研究成果

1)-①: アドレナリン受容体(ADRB1~3)の発現解析(RT-PCR)



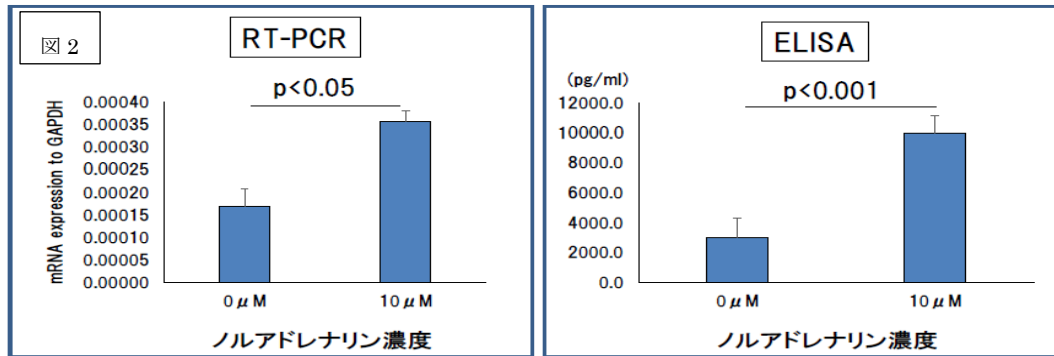
HuCCT1、HuCH のいずれの細胞株でも有意に発現の差を認めた ($p < 0.05$)。

ADRB2 発現が有意に高く、膵癌同様、ADRB2 が重要な受容体である可能性がある。(図1)

1)-②: ノルアドレナリン負荷による癌細胞増殖実験

いずれの癌細胞ともに ADRB2 の発現が高いことが明らかとなり、ノルアドレナリン負荷を行い、細胞増殖実験を施行。HuCCT1 (ICC cell line) 5×10^3 /well 播種し、0 μ M をコントロールとして、濃度勾配を既報に従って 0 μ M~10 μ M に設定。WST-1 assay キットを用いて、細胞増殖を検討した。結果、濃度上昇に伴い、10 μ M でのノルアドレナリン付加群でコントロール群 (0 μ M) に比較して 1.3 倍の細胞増殖を認めたが、明らかな有意差は認めなかった。

1)-③: 神経成長因子 (NGF) の発現実験 (RT-PCR、ELISA)

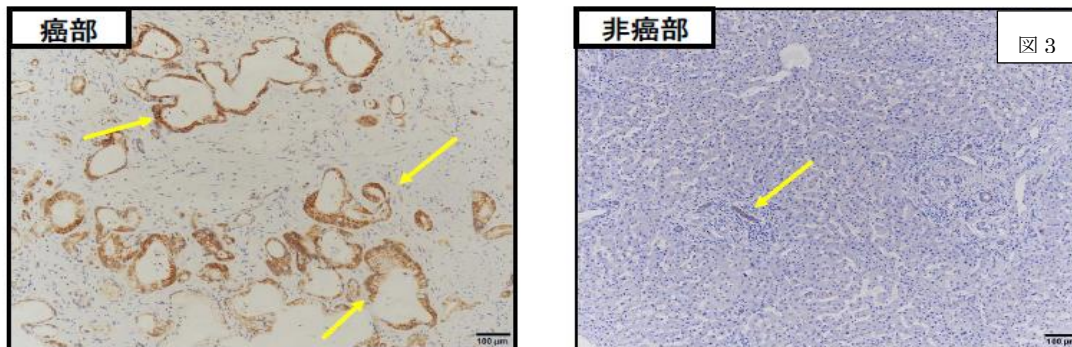


前述の細胞増殖実験にて培養した癌細胞を回収し、RNA を抽出。RT-PCR にて神経成長因子である NGF の発現を測定。ノルアドレナリン負荷を行っていない癌細胞と比べて、ノルアドレナリン負荷群の癌細胞では有意に NGF が発現していた ($p < 0.05$)。さらにノルアドレナリン 10μM 付加を行った細胞培養の上清を回収し、ELISA キットにて NGF の放出量測定を行った結果、RT-PCR 同様にノルアドレナリン 0μM: ノルアドレナリン 10μM=3011pg/ml : 9970pg/ml ($p < 0.001$) と有意にノルアドレナリン負荷群で放出量が上昇していた (図 2)。

1)-④ノルアドレナリン負荷による癌細胞共培養条件下における神経細胞遊走実験

60 mm dish に滅菌したシリコンプレート を静置し、片方には神経細胞、片方には肝内胆管癌細胞を播種し、48 時間培養後に神経細胞のシリコンプレート を除去。その後、ノルアドレナリンを添加し、細胞の変化を確認し、ノルアドレナリン添加群で神経細胞の遊走・伸長を認めた。

2)-①：癌部・非癌部における ADRB2 染色

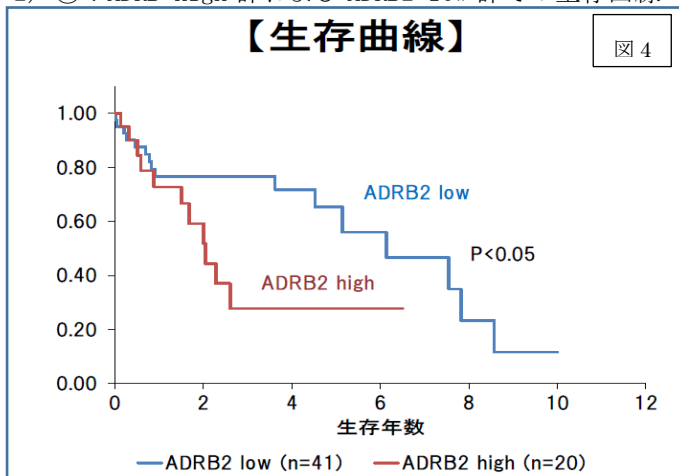


癌部：非癌部=3.98%:0.21% ($p < 0.001$) と有意に癌部で陽性率が高い(図 3)。これをもとに ADRB2 陽性率が 4%以下を ADRB2 low 群、4%以上を ADRB2 high 群と群分けを行った。

2)-②：患者背景および臨床病理学的因子の検討

2)-①の結果をもとに、ADRB2-high 群と low 群で患者背景および臨床病理学的因子を検討し、ADRB2 の high および low で有意差を認めたのが、ADRB2-high 群のほうが腫瘍径 5 cm 以上と大きく ($p < 0.05$)、病期分類がⅢ以上と進行しており ($p < 0.05$)、Peripherin 染色陽性率が高い ($p < 0.05$) という結果であった。

2)-③：ADRB-high 群および ADRB2-low 群での生存曲線



ADRB2-High 群と low 群間で生存曲線を比較したところ、ADRB2-high 群は MST=2.2 年、5 年生存率=28%、low 群では、MST=6.2 年、5 年生存率=58%と ADRB2-High 群で有意に短い結果となった ($p < 0.05$) (図 4)。

結語：肝内胆管癌における神経微小環境には、ADRB2 を介した機序が存在していることが考えられ、今後、ADRB2 は治療標的の可能性があるとと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中貴之、足立智彦、大野慎一郎、濱田隆志、釘山統太、原貴信、日高匡章、伊藤信一郎、金高賢悟、江口 晋
2. 発表標題 肝内胆管癌における神経微小環境の影響とそのメカニズム
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中貴之、足立智彦、松島肇、永川寛徳、宮本大輔、池田貴裕、原貴信、曾山明彦、日高匡章、伊藤信一郎、金高賢悟、江口 晋
2. 発表標題 肝内胆管癌における神経微小環境の関与とその機序解明
3. 学会等名 第121回日本外科学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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