

令和 6 年 9 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02700

研究課題名（和文）胆膵癌の概日リズムに関連した高悪性度形質とその制御

研究課題名（英文）Mechanisms of high-grade malignancy of pancreato-biliary cancer, and its modulation

研究代表者

鬼島 宏 (KIJIMA, Hiroshi)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：90204859

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,800,000円

研究成果の概要（和文）：胆道癌・膵癌が高悪性度の腫瘍形質を示す微小環境特性は、早期浸潤病巣より腫瘍細胞の上皮間葉転換が生じ、線維化・脈管侵襲・神経浸潤を伴う顕著な浸潤性増殖と表現できる。本研究では(1) 癌細胞・間葉系細胞の共培養法で、線維化を伴う間質の特性が解析された、(2) 三次元培養法で、間質浸潤・リンパ管侵襲の形態学的特徴が解明された、(3) ヒト外科切除材料の解析で、線維性間質を呈する癌微小環境と化学療法反応性と関連が示された。以上より、胆膵癌の高悪性度形質には、線維性間質が大きく関与している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、癌微小環境が癌の増殖・進展や悪性度に重要であることが唱えられている。今回の研究で、胆道癌・膵癌が高悪性度形質を示す癌微小環境の特性が、早期浸潤病巣より認められる線維化を伴う癌間質によることが明らかとなった。この線維性間質を呈する癌微小環境が、化学療法の反応性と関連していることが示された点は、高悪性度形質の制御に向けた大きな成果と言える。一方で、今後は、臨床現場での応用を想定した胆道癌・膵癌の高悪性度形質の制御の研究を通して、患者予後を改善させるような臨床病理学的研究が求められる。

研究成果の概要（英文）：High-grade malignancy of human pancreato-biliary cancer is characterized by the cancer microenvironment with rapid cancer cell growth, and lymphatic/venous/perineural invasion in early cancer stage. In this study, we clarified several clinic-pathological properties of pancreato-biliary cancer cells as follows: (1) Co-culture scratch migration assay showed that the mesenchymal stem cells affected the aggressive migration/invasion abilities of cancer cells in the stroma. (2) Three-dimensional culture study demonstrated epithelial-mesenchymal transition (EMT) and morphological changes at lymphatic invasion. (3) Morphological analysis revealed relationship between fibrous stroma with cancer-associated fibroblasts (CAF), and chemotherapeutic changes.

研究分野：病理学

キーワード：胆道癌 膵癌 浸潤性増殖 癌微小環境 脈管侵襲

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 胆道癌(特に肝外胆管癌・胆嚢癌)ならびに膵癌(その大部分を占める浸潤性膵管癌)は、隣接する2臓器の悪性腫瘍であり、類似の発育進展様式を呈しており、生命予後が極めて不良な難治性癌の代表である。我国の部位別癌死亡数では、胆道癌・膵癌を合わせると年間50,000人以上にも達して、大腸癌や胃癌を大きく上回り、肺癌に次ぎ2番目の多さとなっている。我々はこれまでに、胆膵癌を中心にヒト癌における高悪性度形質の解析とその制御を遺伝子レベルで行い、実績を上げてきた(Nature Commun 2013; Cancer Cell 2002)。癌細胞の増殖や転移にかかわる因子として、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)が関与する腫瘍血管新生の解析でも成果をあげてきた(Int J Oncol 2005)。

(2) 生物の生理機能・代謝・行動は、脳の視床下部(視交叉上核)で駆動される中枢性の生物時計が刻む約24時間周期の概日リズムにより調節されている。「概日リズムの乱れ」は発癌リスクとして注目されており、国際がん研究機関(International Agency for Research on Cancer, IARC: WHO 附属機関)によるIARC発癌リスク一覧では、グループ2Aの「シフト勤務」として含まれている(右表)。胆管癌の発癌リスクと認識されている印刷作業が、グループ2Bに含まれることに鑑みると、胆管癌では「概日リズムの乱れ」は印刷作業以上の発がんリスクとなっていることが想定される。

### IARC(国際がん研究機関)発癌リスク一覧

発癌リスク	リスク具体例
• Group 1: ヒトに対する発癌性が認められる	• Carcinogenic: 喫煙、ピロリ菌、肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス
• Group 2A: ヒトに対する発癌性がおそらくある	• Probably Carcinogenic: 紫外線、 <b>シフト勤務</b>
• Group 2B: ヒトに対する発癌性が疑われる	• Possibly Carcinogenic: 印刷作業
• Group 3: ヒトに対する発癌性が分類できない	• Not Classifiable: (略)
• Group 4: ヒトに対する発癌性がおそらくない	• Probably Not: (略)

(3) ヒトでは、現在5つの時計遺伝子(Clock, Bmal, Per, Cry, Dec)が同定されている。我々は、DECをはじめとする時計遺伝子産物がbHLH型転写因子として機能し、血管新生・アポトーシス制御や腫瘍細胞増殖などの病態との関連を報告し、実績を重ねている(Genes Cells 2010; Genes Cells 2008)。

(4) 胆膵癌の発育進展には、他臓器の癌とは異なる病理学的特徴がみられる(J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2014)。これは、早期浸潤病巣での間質線維化巣内への特異的な簇出(budding)であり、癌細胞の上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)や癌関連線維芽細胞(CAF)の動員によって生じる。我々は、これまでの研究で時計遺伝子DECの遺伝子産物がbHLH型転写因子として機能することで、膵癌細胞の上皮間葉転換が惹起されることを証明している(Int J Oncol 2012)。

(5) しかしながら、時計遺伝子の機能的制御が上皮間葉転換のみならず、線維化・脈管侵襲・神経浸潤を伴う顕著な浸潤性増殖という胆膵癌の微小環境特性全体の基盤となっているのではないかと、という疑問が新たに生じてきた。さらには、時計遺伝子機能の本態である「概日リズム」との詳細な分子機序も、解明すべき大きな課題である。

## 2. 研究の目的

前述の背景と研究実績に基づき、以下の2項目を証明することを目的とした。

- (1) 高悪性度形質を呈する胆膵癌の微小環境特性は、早期浸潤病巣より癌細胞の上皮間葉転換のみならず、線維化・脈管侵襲・神経浸潤を伴う顕著な浸潤性増殖が基盤となっていること。
- (2) 癌細胞増殖・腫瘍血管新生といった胆膵癌の微小環境特性は、概日リズムを形成する時計遺伝子産物(bHLH型転写因子)の機能的制御が基盤となっている可能性を示すこと。

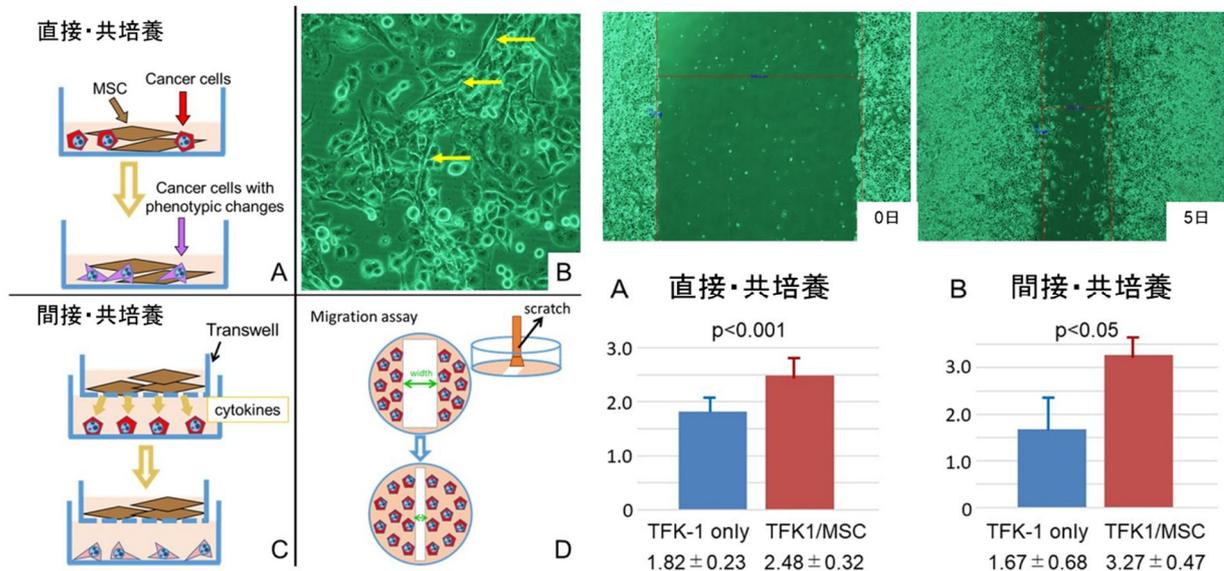
## 3. 研究の方法

(1) 癌細胞と間葉系幹細胞の共培養系における間質浸潤能(遊走能): ヒト胆管癌(TFK-1)培養細胞株を用いて、癌細胞の遊走能と間葉系幹細胞(MSC)との関連をscratch migration assayにより検討した。癌細胞・間葉系幹細胞を1層の同一シャーレ(容器)内で培養する直接・共培養、および癌細胞・間葉系幹細胞を2層に分けて同一シャーレ内で培養する間接・共培養の2種類の方法で検討した。

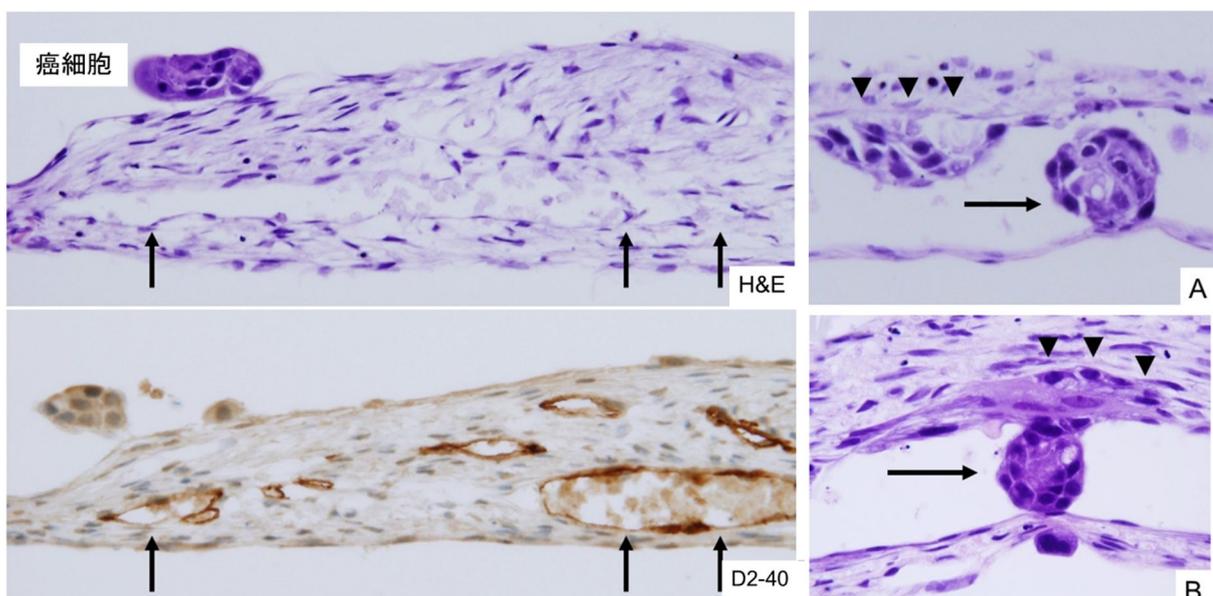
- (2) 三次元培養における癌細胞のリンパ管浸潤能：線維芽細胞とリンパ管内皮細胞を積層培養して、リンパ管を有する三次元間質組織を構築し、ヒト胆管癌 (TFK-1) 培養細胞株を用いて間質浸潤・リンパ管侵襲の形態学的解析を行った。
- (3) 線維性間質を伴う高悪性度癌微小環境と術前化学療法治療効果との関連解析：ヒト膵癌組織の外科切除材料で、術前化学療法の差異（術前未治療群・化学療法低反応群・化学療法高反応群）による治療効果の組織学的判定を行った。免疫染色・特殊染色を施行し、癌細胞を cytokeratin AE1/AE3、癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast, CAF) を  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)、微小血管密度を CD31, 線維性間質密度を Masson trichrome で確認した。

#### 4. 研究成果

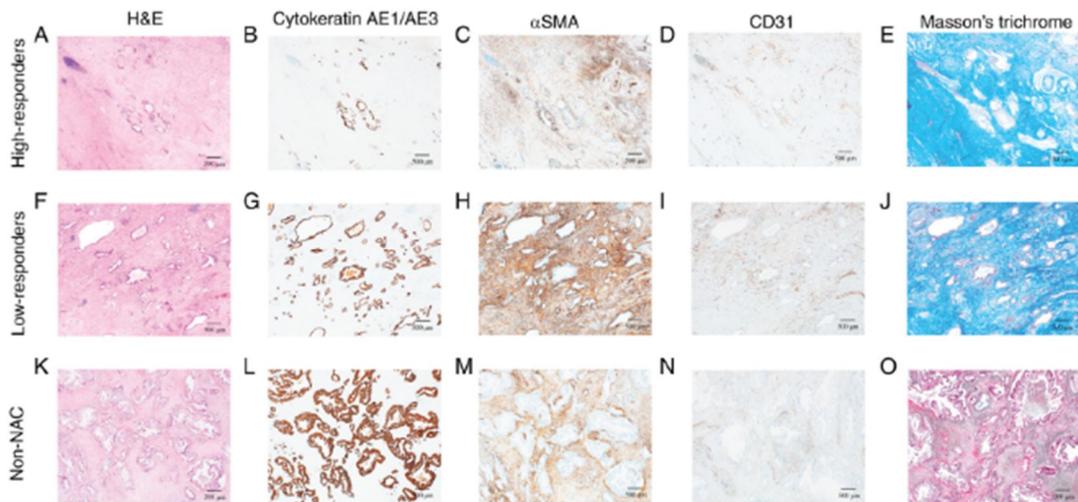
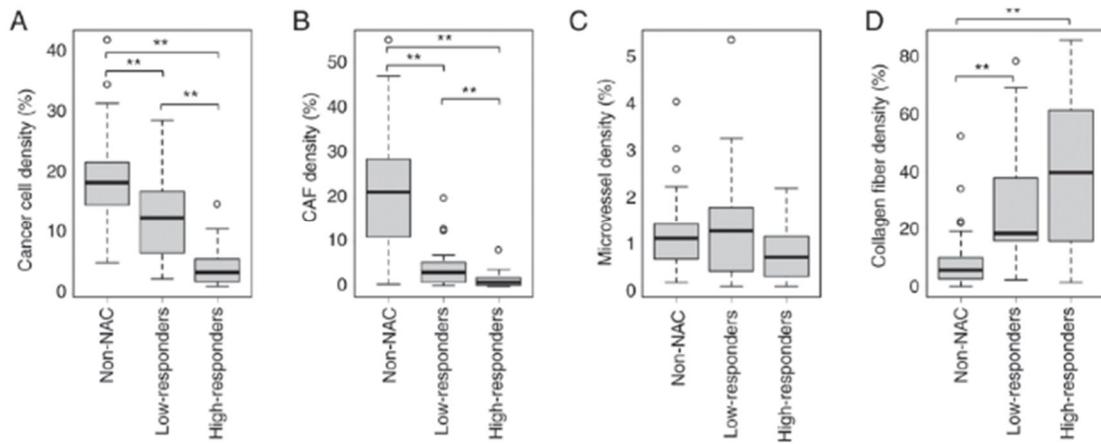
- (1) 胆管癌細胞 (TFK-1) を間葉系幹細胞 (MSC) と共培養すると、直接・共培養の場合でも、間接・共培養の場合でも、胆管癌細胞単独の培養よりも、有意に間質浸潤能（遊走能）が亢進していた。これにより、線維化を伴う間質が、高悪性度形質を呈する癌微小環境特性の基盤となっていることが確認された。



- (2) 積層培養による三次元間質組織では、組織内にリンパ管が構築されていた(下図左・矢印)。胆管癌細胞 (TFK-1) は、浸潤の際には上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) により間質内での癌微小環境を形成し、リンパ管内に侵入することが示された(下図右・矢頭)。リンパ管内に侵入すると、癌細胞は球状胞巣へと変化して転移先へと移動することが確認された(下図右・矢印)。



(3) ヒト膵癌組織の外科切除材料での検討では、癌微小環境内の癌細胞密度 (cytokeratin AE1/AE3) および癌関連線維芽細胞 (CAF) は、術前未治療群・化学療法低反応群・化学療法高反応群の順で低下していた (下図 A, B)。微小血管密度 (CD31) は、化学療法実施群 (低反応群・高反応群) による治療効果の組織学的判定を行った。微小血管密度 (CAF) は、3 群で有意差が見られなかった (下図 C)。線維性間質密度 (Masson trichrome) は、術前未治療群に比べて化学療法実施群 (低反応群・高反応群) で優位に高かった (下図 D)。



以上より、高悪性度形質には、線維性間質を呈する癌微小環境が重要であり、癌細胞自体の上皮間葉転換が関与していることが解明された。さらに、線維性間質を呈する癌微小環境が化学療法の反応性とも関連していることが明らかとなった。

今回の研究成果として、高悪性度形質を呈する胆膵癌の微小環境の本質に迫ることができた。一方で、概日リズムを形成する時計遺伝子産物 (bHLH 型転写因子) との直接的な関連性については、今後の課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Yachi T, Yoshizawa T, Kimura N, Seino H, Morohashi M, Goto S, Ishido K, Kijima H, Hakamada K.	4. 巻 25
2. 論文標題 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts recurrence and histological grade of extrahepatic bile duct cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2023.13711	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 Yamazaki K, Wakiya T, Ishido K, Kimura N, Ichinohe D, Takahashi Y, Yoshizawa T, Kijima H, Hakamada K.	4. 巻 16
2. 論文標題 A case of serous cystic neoplasm with tumor growth acceleration leading to extrapancreatic invasion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 289-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-022-01746-x	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 Kanda T, Wakiya T, Ishido K, Kimura N, Fujita H, Yoshizawa T, Goto S, Tatara Y, Kijima H, Hakamada K.	4. 巻 57
2. 論文標題 Heterogeneity of metabolic adaptive capacity affects the prognosis among pancreatic ductal adenocarcinomas.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 798-811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-022-01898-0	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 Ogasawara H, Yoshizawa T, Kubota S, Goto S, Morohashi S, Hakamada K, Kijima H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Phenotypic changes and cell migration of bile duct cancer cells induced by mesenchymal cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioMed Res J.	6. 最初と最後の頁 485-490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Fujita H, Ishido K, Kimura N, Wakiya T, Nagase H, Yoshizawa T, Haga T, Goto S, Kijima H, Hakamada K.	4. 巻 7
2. 論文標題 A case report of mucinous adenocarcinoma derived from intra-ampullary papillary-tubular neoplasm with a malignant course.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surg Case Rep.	6. 最初と最後の頁 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-020-01045-y	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 Goto S, Seino H, Yoshizawa T, Morohashi S, Ishido K, Hakamada K, Kijima H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Time density curve of dynamic contrast-enhanced computed tomography correlates with histological characteristics of pancreatic cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12537	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 Yoshizawa T, Wu Y, Watanabe S, Narita H, Goto S, Morohashi S, Chiba T, Shimoda H, Kijima H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Lymphatic invasion model of bile duct cancer using 3D human stromal tissues.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioMed Res J.	6. 最初と最後の頁 349-353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Goto S, Yoshizawa T, Ishido K, Seino H, Morohashi S, Ogasawara H, Kubota S, Ogasawara K, Nakamura A, Hakamada K, Kijima H.	4. 巻 49
2. 論文標題 Use of time-density curves of dynamic contrast-enhanced computed tomography for determination of the histological therapeutic effects of neoadjuvant chemotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2023.8498	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 Ogasawara H, Yoshizawa T, Oshima K, Ogasawara K, Kubota S, Goto S, Morohashi S, Wakiya T, Kimura N, Ishido K, Kijima H, Hakamada K.	4. 巻 29
2. 論文標題 Three-dimensional analysis of perineural invasion in extrahepatic cholangiocarcinoma using tissue clearing.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathol Oncol Res.	6. 最初と最後の頁 1611284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/pore.2023.1611284	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 Kubota S, Miura T, Wakiya T, Yoshizawa T, Goto S, Morohashi H, Sakamoto Y, Tataru Y, Kijima H, Hakamada K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Malignant Characteristics in Neoadjuvant Chemotherapy-Resistant Rectal Cancer, Focusing on Extramural Lesions.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 7612-7623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-023-13928-z	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鬼島 宏、小島啓子、鳥谷部慎子
2. 発表標題 胆道の生検・細胞診の診断向上のために
3. 学会等名 第60回日本臨床細胞学会秋期大会・シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鬼島 宏
2. 発表標題 胆道疾患の病理
3. 学会等名 第97回日本病理学会東北支部学術集会・特別講演 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鬼島 宏
2. 発表標題 胆道・膵の細胞診
3. 学会等名 第41回青森県臨床細胞学会・特別講演（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

弘前大学大学院医学研究科・病理生命科学講座 <a href="https://hirosaki-u-pathology2.com/">https://hirosaki-u-pathology2.com/</a>
--

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	吉澤 忠司 (YOSHIZAWA Tadashi) (70761071)	弘前大学・医学研究科・准教授  (11101)	
研究分担者	後藤 慎太郎 (GOTO Shintaro) (00826901)	弘前大学・医学研究科・助教  (11101)	
研究分担者	山田 勝也 (YAMADA Katsuya) (40241666)	弘前大学・医学研究科・特任教授  (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	袴田 健一  (HAKAMADA Kenichi)  (30271802)	弘前大学・医学研究科・教授    (11101)	

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