

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06927

研究課題名(和文)肝外胆管癌における癌細胞の胃腸分化と癌間質マーカーの発現状態の検討

研究課題名(英文) Examination of gastrointestinal differentiation and expression status of cancer stromal markers in extrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

石田 和之 (Ishida, Kazuyuki)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：40444004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝門部胆管癌と遠位胆管癌の胃腸分化方向と癌間質との関連性を明らかにするため、癌関連線維芽細胞(CAFs)、腫瘍浸潤リンパ球(TILs)、腫瘍関連マクロファージ(TAMs)、胃腸分化マーカーの発現を検討した。胆管癌手術施行例の集積、HE標本全ての見直しを行い、主座、組織型、深達度、脈管侵襲、上皮内癌の有無、簇出、マーカー発現など病理学的所見を評価した。結果は、神経浸潤の程度(遠位>肝門部)、脈管侵襲の程度(遠位>肝門部)、MUC5ACの発現、TILとTAMの発現状況が部位により異なる可能性が示された。上皮の胃腸分化方向とCAF、TIL、TAMの関連性は見出せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆管癌はアジアに罹患者が多く、我が国においても癌による臓器別死亡原因では第6位で、5年生存率は20%前後と隣癌に次いで悪性度が高い。本研究では肝門部胆管癌と遠位胆管癌の胃腸分化方向と癌間質との関連性を明らかにするため病理所見、癌関連線維芽細胞(CAFs)、腫瘍浸潤リンパ球(TILs)、腫瘍関連マクロファージ(TAMs)、胃腸分化マーカーの発現を検討したところ、神経浸潤の程度、脈管侵襲の程度(遠位>肝門部)、MUC5ACの発現、TILsとTAMsの発現状況が部位により異なる可能性が示された。胆管癌の腫瘍発生・進展のメカニズムを解明することは、胆管癌の治療につながる重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：To clarify the relationship between the direction of gastrointestinal differentiation and cancer stroma in hilar and distal cholangiocarcinoma, we examined the expression of cancer-associated fibroblasts (CAFs), tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), tumor-associated macrophages (TAMs), and gastrointestinal differentiation markers. We reviewed all collected and HE specimens of surgically treated cholangiocarcinoma cases and evaluated pathological findings such as primary location, histological type, depth, vascular invasion, carcinoma in situ, budding, and marker expression. The results showed that the degree of perineural invasion (distal>hilar), vascular invasion (distal>hilar), MUC5AC expression, and TIL and TAM expression may differ by site. No relationship was found between the direction of epithelial gastrointestinal differentiation and CAFs, TILs, or TAMs.

研究分野：人体病理

キーワード：肝外胆管癌 胃腸分化形質 癌間質

1. 研究開始当初の背景

胆管癌は胆管上皮から発生する腫瘍で、大きく肝内胆管癌と肝外胆管癌に分類される。アジアに罹患者が多く、我が国においても癌による臓器別死亡原因では第6位で、5年生存率は20%前後と膵癌に次いで悪性度が高い。胆管癌の腫瘍発生・進展のメカニズムを解明することは、胆管癌の治療につながる重要な課題である。肝外胆管癌の組織型の90%は管状腺癌であるが、管状腺癌がどのように分類され、その組織学的相違が予後とどのように関連するかは不明な点が多い。消化管癌(腺癌)は胃腸分化マーカーを用いた免疫組織化学により胃型、腸型、混合型、分類不能型に分類され、亜型ごとの臨床病理学的、分子生物学的な特徴や、予後との関連性が報告されている。肝外胆管癌の管状腺癌は、胃腸分化マーカーによって分類が可能で、肝門部胆管癌ではその分類が予後と関連することが報告されている。すなわち、胃腸分化マーカーの発現様式によって層別化された肝外胆管癌は、異なる発癌、進展のメカニズムを有している可能性が示唆される。

近年、癌の浸潤・転移などの生物学的特徴には、上皮(癌細胞)だけではなく、周囲の間質(癌間質)を含めた癌の微小環境の違いが大きく影響することが知られている。癌間質を構成する細胞は、癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)、腫瘍浸潤リンパ球(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)、腫瘍関連マクロファージ(tumor-associated macrophages, TAMs)などがあり、これらが相互に関連し、癌細胞の増殖、浸潤、血管新生の調節、炎症性サイトカインの放出などを担い癌の増殖・浸潤・転移が生じている。近年は癌間質のCAFs, TILs, TAMsは免疫組織化学により可視化できるようになり、癌が発生する臓器、癌細胞の組織型、癌細胞の形質分類によってそれぞれが異なることが判明した。さらにCAFs, TILs, TAMsの発現状態や出現頻度、出現する部位の違いは、癌の浸潤・転移、予後と関連することが報告されている。しかし、肝外胆管癌においては、CAFs, TILs, TAMsの発現状態と臨床病理学的あるいは分子生物学的特徴、予後との関連ははまだ解明されていない。

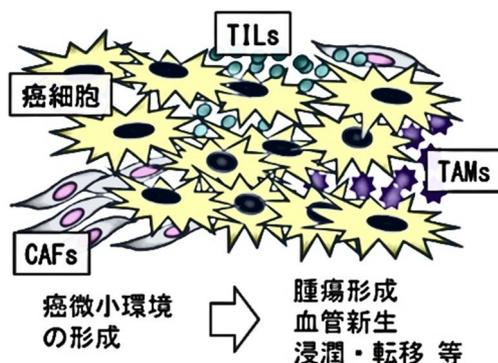


図1. 癌細胞と癌間質(CAFs, TILs, TAMs)

肝門部胆管癌における胃腸分化マーカーの発現状態がどのように発癌、進展のメカニズムに関連しているかは明らかになっていない。そこで我々は、肝外胆管癌における胃腸分化マーカーの発現状態によって、異なったCAFs, TILs, TAMsが癌の発生、進展に関わっている可能性を考えた。すなわち、胃腸分化マーカー発現による組織亜型の違いが予後などの生物学的特徴と関連するとすれば、組織亜型によって癌の増殖・浸潤・転移に関わるCAFs, TILs, TAMsも異なっていることが推察される。また、癌細胞と癌間質細胞に発現しているマーカーのどのような組み合わせが予後と関連しているかを明らかにすることは、肝外胆管癌を層別化し治療選択に繋げる意味で重要である。

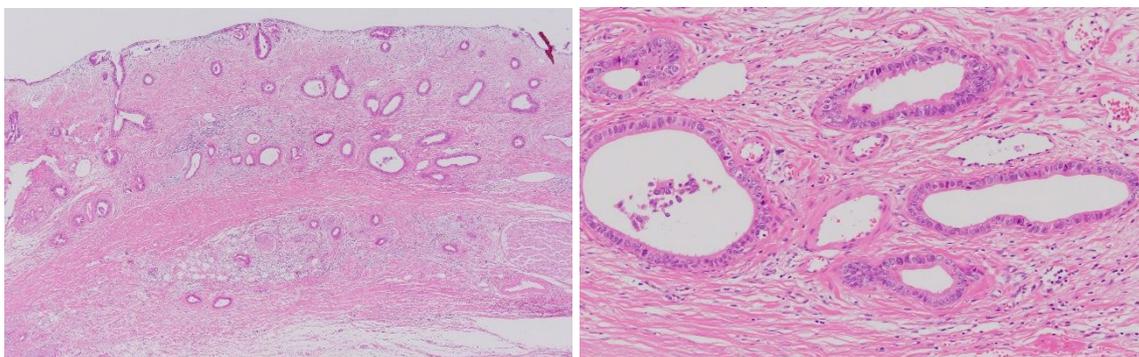


図2. 遠位胆管癌の組織像(HE染色)。

左図:胆管壁全層に浸潤性増殖を示す。右図:高分化管状腺癌である。腫瘍胞巣の周囲に線維芽細胞が増生している。

2. 研究の目的

肝外胆管癌(肝門部胆管癌,遠位胆管癌)における癌細胞の胃腸分化マーカーと癌間質におけるCAFs, TILs, TAMsマーカーの発現状態を調べ、肝外胆管癌の癌細胞と癌間質の関係を明らかにする。さらに、肝外胆管癌の予後を規定する癌細胞と癌間質マーカーの組み合わせを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

2000～2018年に外科的切除が施行され、病理組織学的検討が可能な肝外胆管癌75例について検討した。10%中性緩衝ホルマリンで固定された検体を切り出し、肉眼及び組織所見(HE, EVG, D2-40)から主座、組織型、深達度、脈管侵襲、神経浸潤、上皮内癌進展の有無を検討した。主座は肉眼所見および組織切片で最も腫瘍量が多い場所により分類した。組織型はWHO分類2019および胆道癌取扱い規約第7版に沿って決定した(図2)。深達度は粘膜層、線維筋層、漿膜下層、漿膜、他臓器(肝臓、膵臓)の最も先進部で決定した。脈管侵襲の有無は代表切片においてリンパ管侵襲はD2-40染色、静脈侵襲はEVG染色で評価した。上皮内癌進展は浸潤癌を超えて広がる上皮内癌と定義した。上皮内癌と炎症に伴う反応性異型上皮との鑑別が難しい例は、免疫組織化学(p53とKi-67)を参考にして複数の病理医で判断した。簇出は、管状腺癌の先進部における癌細胞5個以下の小型腫瘍胞巣を評価した。

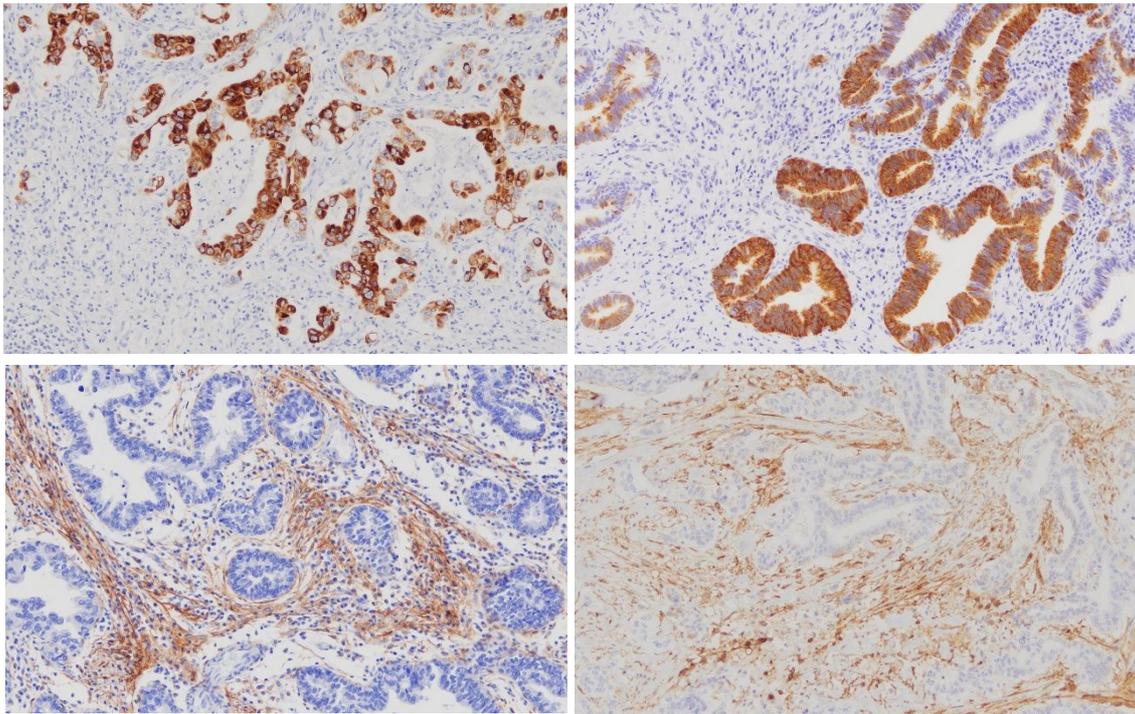


図3. 胆管原発分化型管状腺癌の免疫組織化学。

上段左: MUC5ACが腫瘍細胞に陽性。上段右: MUC6が腫瘍細胞に陽性。下段左: D2-40が腫瘍胞巣周囲の間葉系細胞に陽性。下段右: CD10が腫瘍細胞周囲の間葉系細胞に陽性。

胃腸分化形質, CAFs, TILs, TAMsは、最も深部まで浸潤し十分な腫瘍量が含まれる代表切片に対して免疫組織化学を行い検討した。なお、当初予定の tissue array 作製は機器の購入がかなわず、限られた症例数の解析を行った。胃腸分化マーカーとして、MUC2, MUC5AC, MUC6, CD10, CDX2, CK20, CAFsマーカーは smooth muscle actin(SMA), CD10, D2-40, fibroblast activation protein(FAP), TILsマーカーは CD4, CD8, FOXP3, TAMsマーカーは CD68(pan-macrophage marker), CD163(M2 macrophage marker)を用いた。図3に代表的な免疫組織化学の染色性を示した。統計解析は SPSS v 18.0.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)を使用した。

4. 研究成果

病変の主座および広がりから肝門部胆管癌25例、遠位胆管癌45例に分類し、病変が広範囲で分類不能が3例、胆嚢管原発が2例認められた。神経侵襲と脈管侵襲の頻度は肝門部胆管癌に対して遠位胆管癌が有意に高かった。簇出の程度に相違はなかったが、二次的な炎症性細胞浸潤が目立つ症例ではその評価が困難であった(肝門部胆管癌2例、遠位胆管癌4例)。MUC5ACの発現は肝門部胆管癌に有意に多かった。MUC6は肝門部胆管癌、遠位胆管癌ともに発現していた。MUC2, CD10, CDX2の発現頻度は低く、肝門部胆管癌と遠位胆管癌に相違はなかった。TILsは遠位胆管癌でCD4陽性細胞がCD8陽性細胞よりも多い傾向がみられた。TAMsは遠位胆管癌で肝門部胆管癌よりもCD68陽性細胞、CD163陽性細胞が出現する傾向があった。上皮の胃腸分化方向とCAFs, TILs, TAMsの関連性は見出せなかった。予後については症例を追跡中であり、予後データも含めた臨床病理学的解析を順次進めている。

肝門部胆管癌と遠位胆管癌では病理学的な相違及び上皮の形質発現の違いが明らかになり、TILsとTAMsの発現状況も異なる可能性が示された。今回の結果より肝門部胆管癌と遠位胆管癌の癌微小環境は異なることが推測され、癌を構成する上皮の特徴と癌間質と関連性について

予後などの生物学的態度も含めて更に検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Takahashi Takao, Ishida Kazuyuki, Emi Yasunori, Sakamoto Michiie, Imura Johji, Aishima Shinichi, Muro Kei, Uetake Hiroyuki, Oki Eiji, Katayose Yu, Yoshida Kazuhiro, Unno Michiaki, Hyodo Ichinosuke, Tomita Naohiro, Sugihara Kenichi, Maehara Yoshihiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Pathological Evaluation of Resected Colorectal Liver Metastases: mFOLFOX6 Plus Bevacizumab versus mFOLFOX6 Plus Cetuximab in the Phase II ATOM Trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4392 ~ 4392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14184392	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 Fukushi Koh, Yamamiya Akira, Tominaga Keiichi, Abe Yoko, Hoshi Koki, Nagashima Kazunori, Kashima Ken, Kunogi Yasuhito, Sakuma Fumi, Yamagishi Hidetsugu, Ishida Kazuyuki, Haruyama Yasuo, Irisawa Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Usefulness of Adding Maspin Staining to p53 Staining for EUS-FNA Specimens of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 6097 ~ 6097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11206097	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 Nozawa Yumi, Ishida Kazuyuki, Maiko Niki, Takada-Owada Atsuko, Onozaki Masato, Takaoka Mina, Matsuyama Kinichi, Sakuraoka Yuhki, Nakazato Yoshimasa, Kubota Keiichi	4. 巻 55
2. 論文標題 Mixed adenoneuroendocrine carcinoma of the non-ampullary duodenum with mismatch repair deficiency: a rare case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 258 ~ 266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-022-00324-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 Suzuki Yuka, Hoshi Koki, Tominaga Keiichi, Inaba Yasunori, Yoshinaga Tomonori, Kojimahara Shunsuke, Maki Ryuichi, Nemoto Rena, Tetsuka Yugo, Kawata Yosuke, Yamamiya Akira, Sugaya Takeshi, Iso Yukihiro, Takada Owada Atsuko, Ishida Kazuyuki, Goda Kenichi, Irisawa Atsushi	4. 巻 3
2. 論文標題 A case of obstructive jaundice caused by metastasis of breast cancer to the intra/extrahepatic bile duct	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DEN Open	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) 10.1002/deo2.144	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 Nagai Tamiko, Ishida Kazuyuki, Machida Hiromi, Takada Owada Atsuko, Onozaki Masato, Noda Shuhei, Nozawa Yumi, Takaoka Mina, Sakuma Fumi, Aoki Taku, Irisawa Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Usefulness of cytological diagnosis in pancreatic endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration or biopsy: Comparison with histological diagnosis and relationship with puncture route and sample acquisition method	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostic Cytopathology	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) 10.1002/dc.25144	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 Matsumoto Takatsugu, Shimizu Takayuki, Sato Shun, Tanaka Genki, Yamaguchi Takamune, Park Kyung-Hwa, Sakuraoka Yuhki, Shiraki Takayuki, Mori Shozo, Iso Yukihiro, Nemoto Takehiko, Kubota Keiichi, Nozawa Yumi, Ishida Kazuyuki, Aoki Taku	4. 巻 9
2. 論文標題 Micro-hepatocellular carcinoma with bile duct tumor thrombus mimicking intrahepatic intraductal papillary neoplasm of the bile duct: a case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Surgical Case Reports	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/s40792-023-01646-3	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
---------------------------	-----------------------	----

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