

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08671

研究課題名（和文）膵・胆管合流異常におけるNrf2 addictionを介した間質反応の解明

研究課題名（英文）Elucidation of interstitial reactions mediated by Nrf2 addiction in pancreaticobiliary maljunction

研究代表者

森 大樹 (MORI, Hiroki)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：70448330

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵・胆管合流異常において、胆嚢上皮と間質の線維芽細胞・免疫担当細胞とのinteractionに焦点を当てたNLRP3インフラソーム活性化の胆道癌発癌への関与を検討し、間質中のactivated fibroblastとM2 macrophageが増加しており、NLRP3発現は上皮、間質ともに増加しており、NLRP3陽性間質細胞はNLRP3陽性上皮の直下に分布していた。さらに、胆嚢上皮と間質のactivated fibroblastでのNLRP3発現の上昇が確認でき、間質と上皮のNLRP3の活性化を介したinteractionが合流異常における癌発生に関与す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

発がんポテンシャルを有している膵・胆管合流異常において、上皮細胞と間質の線維芽細胞・免疫担当細胞とのinteractionに焦点を当てたNrf2 addictionを介したNLRP3 Inflammasome活性化の胆道癌発癌への関与を検討することにより、合流異常における胆嚢上皮と間質のActivated fibroblastでのNLRP3発現の上昇が確認でき、間質と上皮のNLRP3の活性化を介したinteractionが合流異常における癌発生に関与する可能性が示唆された。この結果を踏まえて、合流異常の胆道上皮細胞-間質interactionによる更なる発癌機序解明や発癌制御法の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the interaction between gallbladder epithelium and interstitial fibroblasts and immunocompetent cells in the chronic inflammation-related carcinogenic mechanism of pancreaticobiliary maljunction. We investigated its involvement in carcinogenesis and found that activated fibroblast and M2 macrophage were increased in the stroma, and NLRP3 expression was increased in both the epithelium and stroma. In addition, NLRP3-positive stromal cells were distributed directly under the NLRP3-positive epithelium. Our results confirmed that NLRP3 expression is increased in the activated fibroblasts of the gallbladder epithelium and stroma in patients with abnormal confluence, and suggested the interaction mediated by activation of NLRP3 in the stroma and epithelium might be involved in carcinogenesis in patients with pancreaticobiliary maljunction.

研究分野：消化器外科、小児外科、膵・胆管合流異常、発がん、間質

キーワード：膵・胆管合流異常 発がん Inflammasome macrophage fibroblast

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵・胆管合流異常は膵管と胆管が十二指腸壁外で合流する先天性疾患であり、膵液が胆管に逆流することにより炎症を中心とした様々な病態を引き起こすとされており、特に胆道癌を高率に発症する。膵・胆管合流異常研究会事務局として当教室で全国症例を集積しており、胆管拡張を伴う膵・胆管合流異常の 21.6%に胆道癌が認められ、通常の胆道癌自然発生率(0.0146%)と比較して約 1500 倍と非常に高い発癌率であることを報告している。

慢性炎症を背景とした膵・胆管合流異常は前癌病変と考えられており、現在までに分子生物学的検討も少ないが見受けられる。その発癌プロセスとして、胆汁中成分の変化、胆道上皮の形態変化、細胞回転亢進、COX2・K-ras・p53 などの遺伝子発現変化などが研究されている(Langenbecks Arch Surg 2009)。すなわち、膵・胆管合流異常の癌化機序として、膵液胆道内逆流、膵液と胆汁の混和、胆汁のうっ滞による炎症性変化により胆道上皮の細胞回転は亢進し、これにいくつかの遺伝子発現変異が加わって発癌に至るものと考えられるが、依然として膵・胆管合流異常の胆道上皮において、過形成から化生性変化、異型上皮化、上皮内癌、癌へと進展するプロセスの全容は明らかになっていない。しかし、最近の我々の研究結果では、成人非担癌膵・胆管合流異常の胆道上皮における発癌機構として、HDAC(histone deacetylase)の高発現を介した epigenetic 修飾の関与や炎症下で発現が増強される遺伝子改変酵素である AID(activation-induced cytidine deaminase)の関与、つまり genetic 修飾の関与が示唆されるといった結果が得られている。また、メタボローム解析を用いて合流異常における胆汁中代謝産物の網羅的解析を行い、発がんに寄与する胆汁中の物質としてリソフォスファチジルコリンとトリアシルグリセロールを同定している。さらに、その 2 者は上皮細胞に ROS の産生を促して発がんに関与するという報告もなされている(JHBPS 2015, J Lipids 2018)。このように、合流異常胆道上皮、胆汁中の発癌に寄与する物質については少なからず報告があるものの、徐々に合流異常の病態解明が進んできているが、過去の検討は主に胆道上皮の変化についてであり、胆道上皮間質中の線維芽細胞や免疫担当細胞の発癌への関与についての検討は今までに全くなされていないのが現状である。

一方、本疾患の病態のひとつとして慢性炎症が共通経路と捉えられているが、そのうちの慢性炎症関連発がんの機序は未だ不明な部分が多い。最近注目を集めている自然免疫システムである Inflammasome が、その慢性炎症関連発がんの一役を担っていることが報告されている(Front Immunol 2017, J Exp Clin Cancer Res 2017)が、今回我々が着想したのは、その Inflammasome 活性化機序に関して、抗酸化遺伝子群のマスターレギュレーターである Nrf2(nuclear factor E2 p45-related factor 2)が関与している可能性である。ストレスに応答した一過性の Nrf2 活性化は抗酸化作用および抗炎症作用により細胞にとって有益であるが、Nrf2 の持続的な活性化を伴う細胞ではしばしば Nrf2 自体に somatic mutation や transcriptional dysregulation などが起こり、その結果 Nrf2 addiction(Nrf2 依存)を発症し有害な影響を及ぼすことが最近報告されている(Cancer Sig 2018)。一方で、Nrf2 は自然免疫応答システムである Inflammasome 活性化に必須のタンパクとしても知られているが、その意義は不明であり、発がんとの関与に関しては未知の領域である。文献的には、慢性炎症を背景とした疾患モデルにおいて、Nrf2 活性化が Inflammasome 活性化に必須であり、その Nrf2 依存的 Inflammasome 活性化が炎症の慢性化にも寄与し、さらに発がんにも寄与する可能性も示唆されている(Sci Rep 2017, J Clin Invest 2018, J Biol Chem 2014)。ただ、Inflammasome 活性化がどのように炎症進展に関与しているかを示した報告はほとんどないが、炎症下にある上皮細胞で Inflammasome が活性化されると、IL-1 が細胞外へ分泌されるだけでなく(Front Immunol 2018)、ASC や miRNA targeting NLRs inflammasomes activation を含んだ exosome も放出する(Sci Signal 2019, Onco Targets Ther 2017)。同時に、HMGB1(high-mobility group protein box 1)が DAMPs として Inflammasome 活性化後に細胞外へ放出されるという報告もある(virulence 2011)。それらを感じた線維芽細胞では Inflammasome 活性化が起こり、IL-6 ファミリーである IL-11 や miR-21 などの miRNAs を含んだ exosome を分泌し、STAT3 活性化を介して上皮細胞の発癌に寄与するという報告がある。また、IL-1 を放出し、マクロファージを含む免疫担当細胞の recruitment を誘導するという報告もあり(Nat Commun 2019)。Nrf2 addiction を間質側からも増強する可能性も考えられ、Nrf2 addiction 状態にある胆管上皮細胞を裏打ちしている間質の活性化された線維芽細胞においても同様の反応が起こることが予想される。さらに、その recruit された免疫担当細胞にも Inflammasome 活性化が誘導され、マクロファージの極性変化も起こるという報告もあり(Cell Res 2017)。活性化された線維芽細胞とともに間質から胆道上皮細胞への炎症を増強することが考えられる。

以上から、胆汁中の発癌関連物質(細胞毒性物質)から持続的な傷害を受けた胆道上皮細胞に Nrf2 addiction を介した NLRP3 Inflammasome 活性化が起こり、間質との interaction による上皮細胞の炎症増強という vicious cycle を介して発癌に寄与するのではないかと仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

消化器外科領域において、膵・胆管合流異常は前癌病変と考えられているものの、現在までに分子生物学的検討はほとんどなされていない。さらに、少ないながらも検討されているのは胆道上皮細胞内の発癌関連因子の検討についてのみであり、間質の発癌への影響に関する検討は今

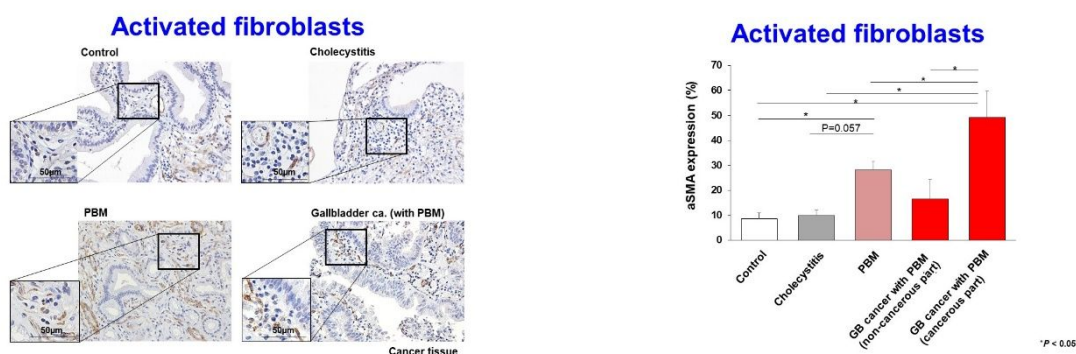
までに報告がまったくない。これらのことから、本研究では、発がんポテンシャルを有している膵・胆管合流異常の慢性炎症関連発癌メカニズムにおいて、上皮細胞と間質の線維芽細胞・免疫担当細胞との interaction に焦点を当てた Nrf2 addiction を介した NLRP3 Inflammasome 活性化の胆道癌発癌への関与を検討することで、胆道癌発癌機構の解明、ひいては胆道癌の予防法、新規診断・治療法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

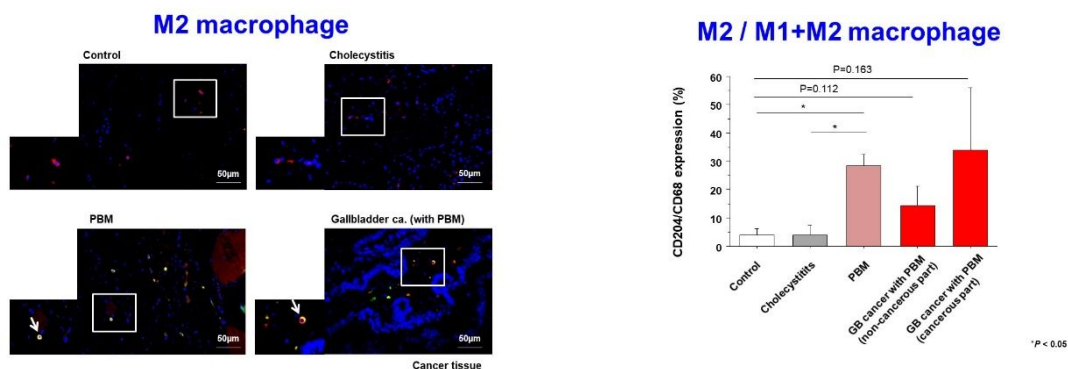
ヒト臨床検体において免疫組織化学染色を行い非胆癌合併合流異常症例、胆癌合併合流異常症例、合流異常非合併胆道癌症例、慢性胆嚢炎症例、コントロール症例の胆道上皮および間質の線維芽細胞・マクロファージにおいて、Nrf2、NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1、IL-11、SMA、CD68、CD204 の発現を検討する。

### 4. 研究成果

Activated fibroblast は、間質中の紡錘形細胞に SMA 発現を認めた。コントロール、慢性胆嚢炎よりも、合流異常で高発現であり、定量化すると間質中の activated fibroblast は control より合流異常で発現が増加していた。



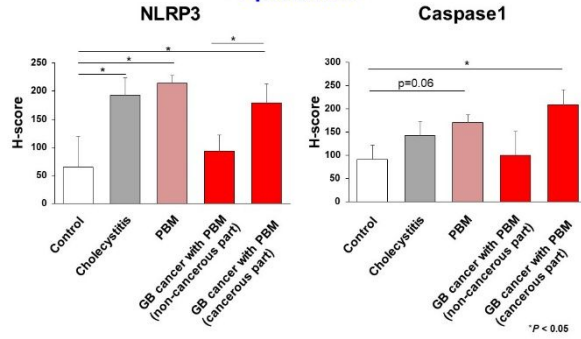
M2 macrophage は、間質の円形の細胞に発現を認め、これもコントロール、慢性胆嚢炎と比較して合流異常群で強い発現を認めており、定量化すると間質の M2 マクロファージの割合は合流異常のいずれの群でもコントロールよりも高値であった。



Inflammasome の評価では、まず上皮においては、NLRP3 発現は合流異常のいずれの群でもコントロールより高値で、Caspase1 の発現も同様であった。

## Inflammasome

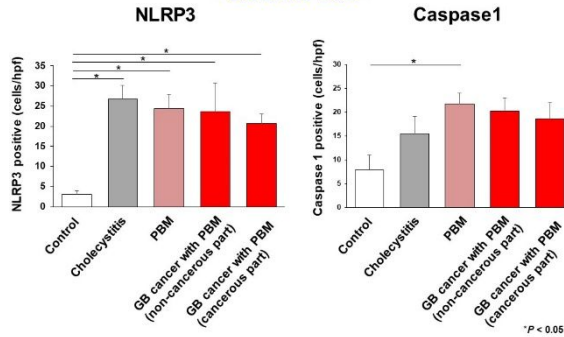
### - Epithelium -



間質においても NLRP3 は発現が増加しており、Caspase1 でも同様の傾向であった。

## Inflammasome

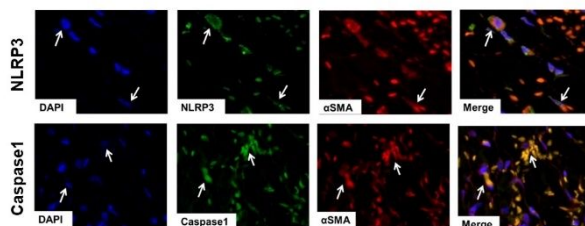
### - Stromal cell -



さらに蛍光免疫で、SMA 陽性細胞に NLRP3、Caspase1 の発現を認め、NLRP3 は activated fibroblast 由来であると考えられた。

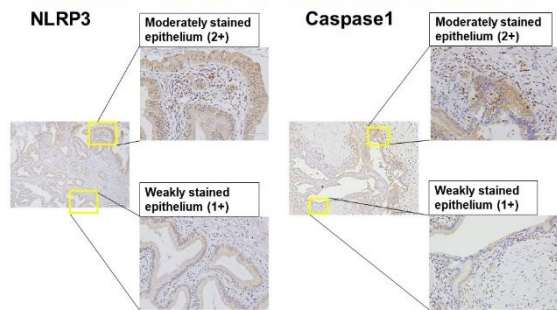
## Inflammasome

### - Activated fibroblast: αSMA positive cells



局在を詳しく見てみると、NLRP3 および caspase-1 陰性上皮の直下にはこれらが陽性の間質細胞はほとんど認めず、NLRP3 および caspase-1 陽性上皮の直下にはこれらが陽性の間質細胞を多く認め、上皮と間質細胞の何らかの interaction があると考えられた。

## Inflammasome - Interaction between epithelial and stromal cells-



本研究で、膵・胆管合流異常の慢性炎症関連発癌メカニズムにおいて、胆嚢上皮と間質の線維芽細胞・免疫担当細胞との interaction に焦点を当てた Nrf2 addiction を介した NLRP3 Inflammasome 活性化の胆道癌発癌への関与の検討を進め、間質中の activated fibroblast と M2 macrophage が増加しており、NLRP3 発現は上皮、間質ともに増加していたことを同定した。また NLRP3 陽性間質細胞は NLRP3 陽性上皮の直下に分布していた。今回の結果から、合流異常における胆嚢上皮と間質の Activated fibroblast での NLRP3 発現の上昇が確認でき、間質と上皮の NLRP3 の活性化を介した interaction が合流異常における癌発生に関与する可能性が示唆された。

今後の研究計画としては、in vitro での発癌関連候補物質曝露胆管上皮細胞との共培養による fibroblast 活性化、macrophage 極性変化、上皮細胞悪性化についての検討を行い、細胞内での経時的な発現変化を検討し、胆道癌発癌機構の解明、ひいては胆道癌の予防法、新規診断・治療法を開発することを進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashita S, Takasu C, Morine Y, Ishibashi H, Ikemoto T, Mori H, Yamada S, Oya T, Tsuneyama K, Shimada M.	4. 巻 30
2. 論文標題 Characteristic submucosal alteration in biliary carcinogenesis of pancreaticobiliary maljunction with a focus on inflammasome activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci	6. 最初と最後の頁 462-472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.1253	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 Mori H, Noma T, Morine Y, Ishibashi H, Shimada M.	4. 巻 53
2. 論文標題 Carcinogenic risk in the biliary epithelium of children with congenital biliary dilatation via the DNA damage repair pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 1126-1131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-023-02664-2	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 Mori H, Masahata K, Umeda S, Morine Y, Ishibashi H, Usui N, Shimada M	4. 巻 52
2. 論文標題 Risk of carcinogenesis in the biliary epithelium of children with congenital biliary dilatation through epigenetic and genetic regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 215-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-021-02325-2	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 Mori H, Ishibashi H, Yokota N, Shimada M	4. 巻 52
2. 論文標題 Risk factors for metachronous contralateral inguinal hernia after laparoscopic percutaneous extraperitoneal closure for unilateral inguinal hernia in children	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 1491-1496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-022-02480-0	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 Mori H, Morine Y, Mawatari K, Chiba A, Yamada S, Saito Y, Ishibashi H, Takahashi A, Shimada M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Bile Metabolites and Risk of Carcinogenesis in Patients With Pancreaticobiliary Maljunction: A Pilot Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 327-334
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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森大樹、石橋広樹、島田光生
2. 発表標題 先天性胆道拡張症根治術後8年経過して発症した膵管内蛋白栓の1例
3. 学会等名 第46回日本膵・胆管合流異常研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森大樹、山下祥子、森根裕二、石橋広樹、常山幸一、島田光生
2. 発表標題 膵・胆管合流異常におけるNLRP3活性化を介した腫瘍微小環境と発癌に関する検討
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森大樹、森根裕二、石橋広樹、池本哲也、齋藤裕、山田眞一郎、寺奥大貴、山下祥子、常山幸一、島田光生
2. 発表標題 慢性炎症状態の膵・胆管合流異常におけるNLRP3活性化を介した腫瘍微小環境と発癌に関する検討
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森大樹、森根裕二、横田典子、石橋広樹、島田光生
2. 発表標題 膵・胆管合流異常におけるNrf2依存的インフラマソーム活性化を介した胆道癌発癌機構に関する検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森大樹、森根裕二、石橋広樹、島田光生
2. 発表標題 膵・胆管合流異常の胆道癌発癌機構にNrf2依存的インフラマソーム活性化が関与する
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下祥子、森根裕二、石橋広樹、居村暎、池本哲也、森大樹、齋藤裕、山田眞一郎、常山幸一、島田光生
2. 発表標題 膵・胆管合流異常におけるNLRP3を介した腫瘍微小環境と発癌に関する検討
3. 学会等名 第57回日本胆道学会学術集会
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
研究 分担者	石橋 広樹  (ISHIBASHI Hiroki)  (20314867)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・講師    (16101)	



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	山下 祥子  (YAMASHITA Shoko)  (20825195)	徳島大学・病院・特任助教    (16101)	
研究分担者	森根 裕二  (MORINE Yuji)  (60398021)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授    (16101)	

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