

令和 6 年 4 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15396

研究課題名（和文）Tissue clearing法を用いた消化器癌の新たな転移経路の提唱とその病態

研究課題名（英文）Proposal a new metastatic pathway for gastrointestinal cancer using the Tissue clearing method and its pathogenesis.

研究代表者

吉澤 忠司（Yoshizawa, Tadashi）

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70761071

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：難治性消化器癌の代表である胆道癌、浸潤性膵管癌の臓器特異的な浸潤、転移経路をTissue clearing法を用いた三次元画像解析により解析した。胆道癌では、癌の発生、進展とともに、粘膜深部の既存の神経から神経新生が粘膜浅層に生じ、新生した神経に癌細胞が浸潤、そして連続性に粘膜深部の太い神経線維に沿って癌細胞が胆管壁を広範囲に進展することを明らかにした。また癌細胞とSchwann細胞を共培養すると、癌細胞の浸潤能が増加した。浸潤性膵管癌の静脈の三次元構造解析したところ、術前化学療法施行症例、さらに治療効果の高い症例では、腫瘍血管の血管長が減少し、表面積、体積が増加することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、高悪性度消化器癌である胆道癌、浸潤性膵管癌の科切除標本を用い、Tissue clearing法による3次元画像解析により、実際に人体内で生じている現象を解析した学術的意義の高い研究である。本研究により、癌の浸潤と静脈形態の変化、神経新生、さらに神経周囲を連続性に浸潤する癌組織を捉えることができた。また癌と神経との間には、Schwann細胞が関連していることが示唆された。以上の研究結果から、今後、癌とSchwann細胞間にはたらく因子を解明することで新たな治療標的因子の解明につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We analyze Organ-specific invasion and metastatic pathways of bile duct cancer and invasive pancreatic ductal carcinoma, which are representative of refractory digestive cancers, by three-dimensional image analysis using the Tissue clearing method. In biliary tract cancer, we have shown that as cancer develops and progresses, neurogenesis occurs in the shallow mucosal layers from preexisting nerves in the deep mucosa, cancer cells infiltrate the neoplastic nerves, and cancer cells extensively extend the bile duct wall along thick nerve fibers in the deep mucosa continuously. Co-culturing Schwann cells with cancer cells also increased the invasive potential of the cancer cells. Our three-dimensional structural analysis of the veins of invasive pancreatic ductal carcinoma revealed a decrease in the length of tumor vessels and an increase in their surface area and volume in patients undergoing preoperative chemotherapy, as well as in those with more effective treatment.

研究分野：腫瘍病理

キーワード：組織透明化 Tissue clearing法 胆管癌 膵臓癌 神経周囲浸潤 神経新生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌のステージングは、腫瘍の深達度・大きさ、リンパ節転移、そして遠隔転移の組み合わせで決定される。現在の病理学的概念では、癌細胞は、リンパ管を経て、リンパ節転移を起こし、その転移経路とは別に静脈を介した転移経路があると信じられている。しかし、最近、この概念を覆す報告がなされた (Brown M, Science. 2018)。この論文では、マウスのリンパ節に癌細胞を直接注入し、リンパ節転移巣を形成、その後、リンパ節転移巣を形成した癌細胞は、輸出リンパ管と同時に、high endothelial vessel (HEV) を通して全身に広がることを証明したものである。そこで、本研究では、リンパ管を介したリンパ節転移とは別に、静脈、または、神経を介したリンパ節転移、遠隔転移の可能性に着目し、Tissue Clearing 技術を用いた、三次元形態解析を通じて癌組織、特に、難治性癌の代表である、胆道癌、膵癌の臓器特異的な浸潤、転移経路の解析を行った。

2. 研究の目的

難治性癌の代表である、胆道癌、膵臓癌切除標本を用い、組織透明化技術 (Tissue clearing 法) を用いて臓器特異的な癌の進展経路、遠隔転移経路を明らかにする。またそこに関与する因子を同定することで、癌の進展、転移経路を考慮した癌治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

- 1) 胆管癌の切除標本を用いて、ホールマウント蛍光免疫染色 (CK19: 胆管癌、胆管上皮を標識, S100: 神経周囲の Schwann 細胞を標識) を施行後、iDISCO 法により組織透明化を行った。透明化されたサンプルを、共焦点定量イメージサイトメーター Cell Voyager CQ1 により Z スタック画像を取得、得られた画像情報を画像解析ソフト (IMARIS) により三次元構築を行い癌と神経との三次元構造解析を行った。
- 2) 癌組織の発生、進展と神経新生との関連を解析するため、非腫瘍性胆管粘膜と癌組織における神経の三次元画像を、ImageJ SNT を用いて、神経長・分岐数を定量的に比較検討した。具体的には、弘前大学医学部附属病院で切除された膵頭十二指腸切除術標本 10 症例 (胆管癌 : 8 症例/非腫瘍胆管組織 : 2 症例) を対象とした。FIJI SNT ソフトウェアで 20 領域 (浸潤癌領域: 14 領域/上皮内癌領域: 2 領域/非腫瘍領域: 4 領域) における神経の長さと同分岐数を解析した。得られたデータに対して、2 群間においては Mann-Whitney 検定を、3 群間以上においては Kruskal-Wallis 検定と Dunn の多重比較検定を用い統計解析を行なった。
- 3) 癌と神経周囲に存在する Schwann 細胞の相互作用を解析するため、癌細胞 (Panc-1, Capan-1, TFK-1) と Schwann 細胞との共培養系を作成、癌細胞と Schwann 細胞の相互作用を Time lapse 画像で解析するとともに、癌細胞の浸潤能に関して検討を行った。
- 4) 癌の転移経路である血管の変化を、CK19 (膵管癌及び非腫瘍性膵管上皮細胞を標識) CD34 (血管内皮細胞を標識) のホールマウント蛍光免疫染色を実施し、Tissue clearing 法により組織を透明化後、三次元画像を取得、術前化学療法の有無により比較解析を行った。対象症例は、弘前大学医学部附属病院にて 2019 年 ~ 2022 年までに切除された浸潤性膵管癌症例のうち、3 次元解析に応用可能な 26 症例 (NAC+: 13/NAC-: 13) を研究対象とした。

4. 研究成果

- 1) 癌細胞と神経の 3 次元構造解析では、胆管壁浅層領域に新生した細い神経周囲に癌細胞が浸潤し、既存の胆管壁深層の太い神経周囲に連続性に癌細胞が進展していた。そして、癌細胞が神経線維を伝い、広く胆管壁に浸潤する像が確認された (図 1, 2)。以上の結果から、リンパ管侵襲、静脈侵襲とは別の経路である神経周囲浸潤により、胆管壁に広範囲に癌細胞が進展し、転移、局所再発に関与していることが示唆された。

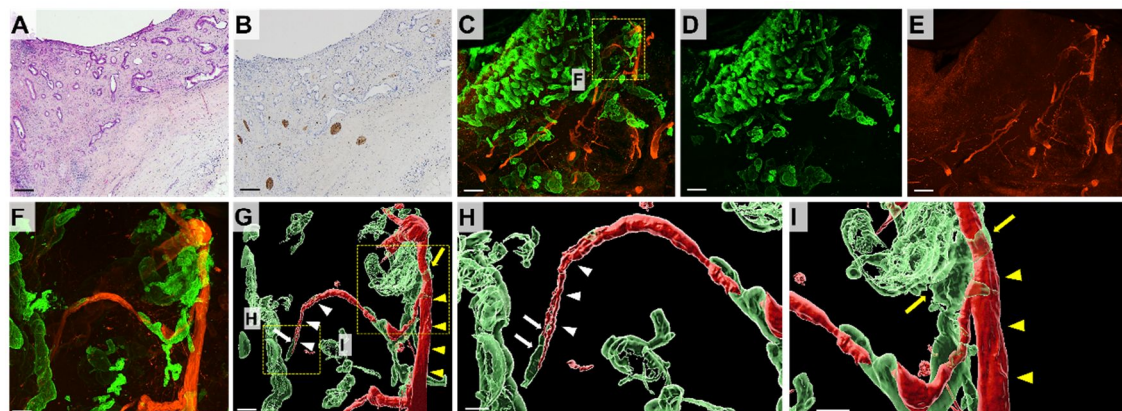


図 1: 粘膜表層に向かって、神経新生が生じ (神経: 赤) 新生神経に癌細胞が浸潤していた (癌細胞: 緑)。

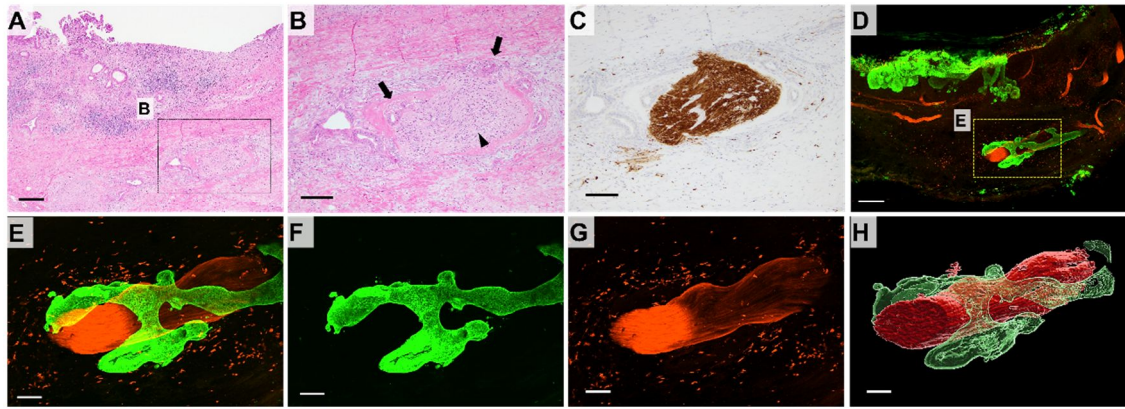


図 2：胆管壁深層における既存の神経では、癌細胞が連続性に浸潤、広範囲に胆管壁を進展していた（神経：赤，癌細胞：緑）。

2) 非腫瘍と腫瘍の 2 群間の三次元神経画像を SNT により比較検討したところ、非腫瘍領域と比較して、腫瘍領域において、神経長、分岐数ともに有意に増加していた。また、非腫瘍、上皮内癌、浸潤癌と癌が進展するにつれ、神経長、分岐ともに増加傾向を示した（図 3）。癌の増生と神経新生は密接に関連しており、神経新生により癌の進展に適した環境が形成されることが示唆された。

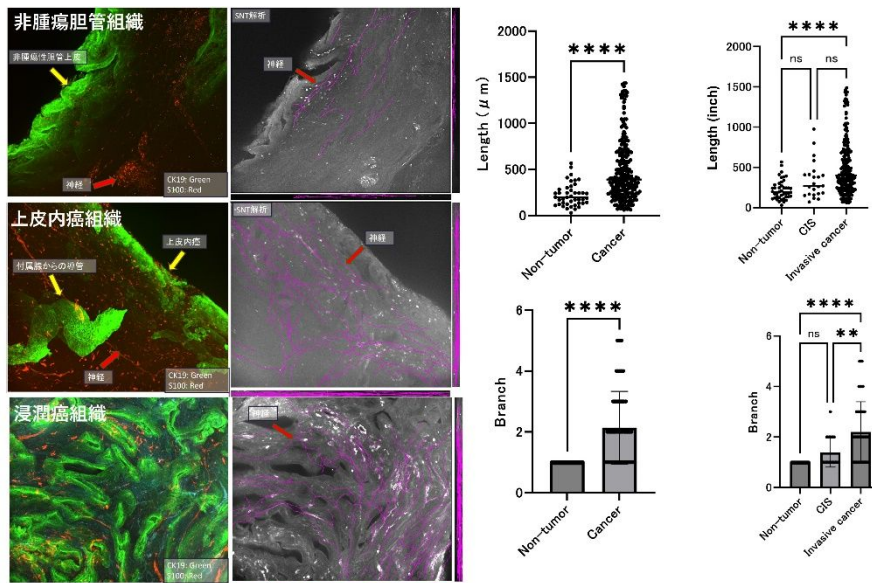


図 3：胆管癌の神経 3 次元画像と SNT 解析

3) 神経周囲の Schwann 細胞が癌の進展、神経周囲浸潤に関与するのではないかとする仮説のもと、Schwann 細胞と膵癌細胞、胆管癌細胞の関連を明らかにするために、膵癌細胞株（Panc-1, Capan-1）、胆管癌細胞株（TFK-1）と Schwann 細胞の共培養系の実験を行ったところ、共培養系では、Schwann 細胞の優位な浸潤能の増加が認められ（図 4, 5）、共培養系の Time lapse 画像では、癌細胞間に Schwann 細胞が入り込み、癌細胞の結合性を低下させる像が確認された（図 6）。また、Wound healing assay においても共培養系では、癌細胞の遊走能の増加が確認され、癌の神経を介した伸展、転移に Schwann 細胞が深く寄与している可能性が示唆された。

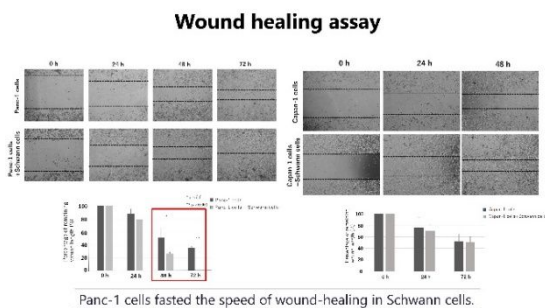


図 4：Wound healing assay

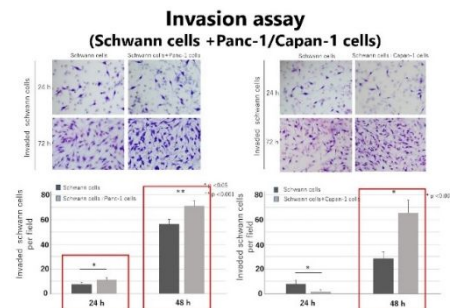


図 5：Invasion assay

Time lapse image
—Panc-1 cells + Schwann cells—

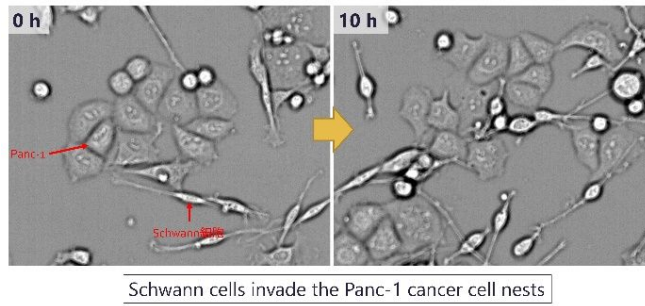


図 6：共培養系による Time lapse image

4) 術前化学療法未施行症例に対し、術前化学療法施行症例では、腫瘍血管の血管長が減少し、表面積、体積が増加した。術前治療による組織学的治療効果判定を Area of residual tumor score (ART score) で行い、術前治療による効果が低い症例と、高い症例で比較検討したところ、組織学的効果が低い症例に対して、高い症例では、腫瘍血管の血管長は減少し、表面積、体積、半径が増加していた (図 7)。以上、化学療法による効果は腫瘍血管の形態と密接に関連していることが示唆された。

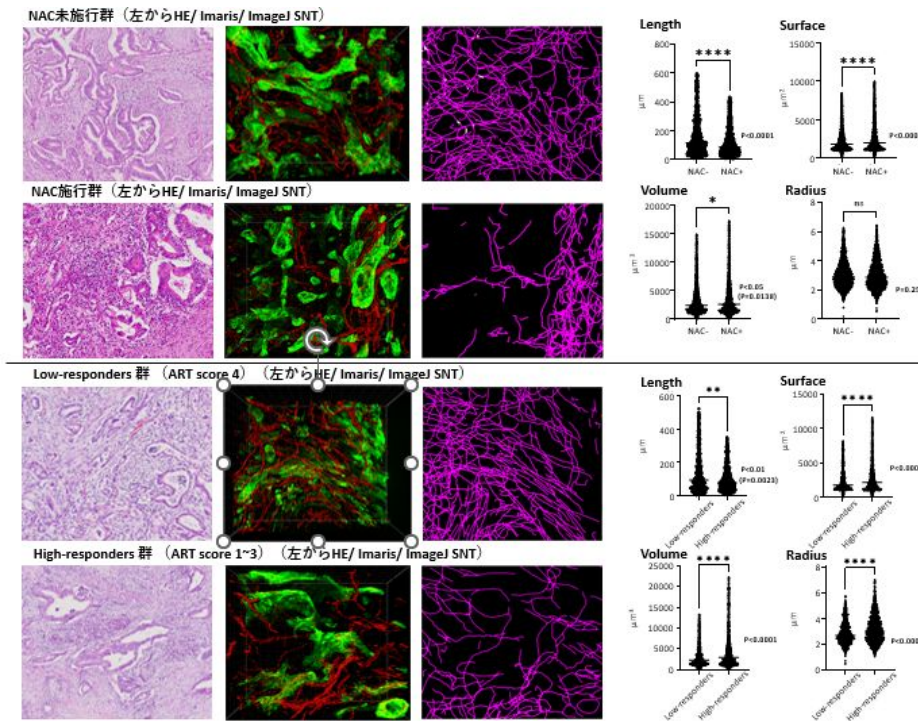


図 7：膵癌組織における三次元血管構造解析

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 1件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Lee Jae W., Zhang Yang, Yoshizawa Tadashi, Argani Pedram, Wood Laura D., Oshima Kiyoko	4. 巻 481
2. 論文標題 Cancerization of ducts in hilar cholangiocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-022-03333-4	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 該当する
1. 著者名 Goto Shintaro, Nakazawa Atsuko, Yoshizawa Tadashi, Aoki Masahiko, Hirabayashi Takeshi, Seino Hiroko, Morohashi Satoko, Kijima Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Case Report: A Giant Epignathus with a Well-Developed Skeleton of Head and Neck	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Surgical Pathology	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) 10.1177/10668969221133739	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 Taishu, Wakiya Taiichi, Ishido Keinosuke, Kimura Norihisa, Fujita Hiroaki, Yoshizawa Tadashi, Goto Shintaro, Tataru Yota, Kijima Hiroshi, Hakamada Kenichi	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 Journal of Gastroenterology	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 Sakai Yasuhiro, Yoshinaga Kazuya, Yoshida Ayaka, Rezano Andri, Shioyama Kazuya, Kawashima Yoshiaki, Yoshizawa Tadashi, Yoshizawa Akihiko, Hatakeyama Shingo, Ohyama Chikara, Ito Hiroyasu, Abe Masato, Kijima Hiroshi, Otsuki Yoshiro, Ito Akihiko, Tsuzuki Toyonori, Takeya Motohiro, Sakaguchi Nobuo, Kuwahara Kazuhiko	4. 巻 114
2. 論文標題 Testicular teratomagenesis from primordial germ cells with overexpression of germinal center associated nuclear protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1729~1739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15685	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 Yamazaki Keisuke, Wakiya Taiichi, Ishido Keinosuke, Kimura Norihisa, Ichinohe Daichi, Takahashi Yoshiya, Yoshizawa Tadashi, Kijima Hiroshi, Hakamada Kenichi	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 Clinical Journal of Gastroenterology	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 Wakiya Taiichi, Ishido Keinosuke, Yoshizawa Tadashi, Kanda Taishu, Hakamada Kenichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Roles of the nervous system in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 623 ~ 633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12459	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 Shintaro, Seino Hiroko, Yoshizawa Tadashi, Morohashi Satoko, Ishido Keinosuke, Hakamada Kenichi, Kijima Hiroshi	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 -
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 Fujita Hiroaki, Ishido Keinosuke, Kimura Norihisa, Wakiya Taiichi, Nagase Hayato, Yoshizawa Tadashi, Haga Toshihiro, Goto Shintaro, Kijima Hiroshi, Hakamada Kenichi	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 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/s40792-020-01045-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 Wakiya Taiichi, Ishido Keinosuke, Kimura Norihisa, Nagase Hayato, Yoshizawa Tadashi, Morohashi Satoko, Fujita Hiroaki, Kanda Taishu, Tataru Yota, Saruwatari Junji, Kijima Hiroshi, Hakamada Kenichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Eukaryotic initiation factor 2 signaling behind neural invasion linked with lymphatic and vascular invasion in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific 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) 10.1038/s41598-021-00727-3	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 Horiguchi Hirotaka, Hatakeyama Shingo, Yoneyama Tohru, Yoneyama Mihoko Sutoh, Tanaka Toshikazu, Fujita Naoki, Okamoto Teppei, Yamamoto Hayato, Yoneyama Takahiro, Yoshizawa Tadashi, Hashimoto Yasuhiro, Kawaguchi Toshiaki, Ohyama Chikara	4. 巻 39
2. 論文標題 Prognostic significance of the Ki67 index and programmed death-ligand 1 expression after radical cystectomy in patients with muscle-invasive bladder cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations	6. 最初と最後の頁 238.e9 ~ 238.e17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2020.11.029	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉澤忠司
2. 発表標題 組織透明化と3次元イメージング解析を用いた膵臓癌と神経周囲浸潤の解析
3. 学会等名 第111回病理学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉澤忠司, 後藤慎太郎, 鬼島宏	4. 発行年 2022年
2. 出版社 アークメディア	5. 総ページ数 8
3. 書名 [胆嚢疾患の最前線] 胆嚢疾患の病理	

〔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			
米国	Johns Hopkins University			