

平成 27 年 10 月 2 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592024

研究課題名(和文)胆道炎症によるIL-6/TGF- β クロストークから癌と周囲環境に与える変化

研究課題名(英文)Change of cancer and pericancerous tissue induced by inflammation, IL-6/TGF-beta crosstalk, in biliary tract cancers.

研究代表者

小林 省吾 (Kobayashi, Shogo)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：30452436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌においては胆道炎症によりIL-6/TGF- β クロストークが誘導され、上皮間葉転換を通じた化学療法抵抗性が生じていた。癌先進部において顕著であり、局所リンパ節転移や、化学療法抵抗性に関与する間質の発現とも関連しており、SMAD4が主要経路であった。同分子やヒストンの制御により解除できる可能性もあったが、同時に他剤に対する抵抗性も幹細胞やDNA修復因子を介して誘導していた。一方で、放射線の併用は有効であった。本研究においては、胆道癌に伴う炎症による上皮間葉転換、化学療法抵抗性の誘導を明らかにし、メカニズムの解析を通じて抵抗性を打破しており、胆道癌治療における新たな治療法の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We revealed IL-6 / TGF- β crosstalk induced by inflammation in biliary tract cancers. This crosstalk induced Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and chemo-resistance in cancer cells and invasion front of resected specimen, via SMAD4. There was possibility that this resistance might be removed by regulation of SMAD4 or Histone. Meanwhile, this resistance induced co-resistance for the other anti-cancer drugs via DNA repair system and population of stem cells; however, radiation therapy regulated this chemo-resistance. Taken together, chemo-resistance was noted at invasion front via inflammation (crosstalk) and chemo-radiation would be effective for this invasion front and it would be helpful for advanced surgical resection.

研究分野：肝胆膵移植外科

キーワード：胆道癌 炎症性サイトカイン 化学療法抵抗性 癌間質

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は難治性の悪性腫瘍で、本邦を含めた東アジアに多く発生し、国際的にも増加しているため、本邦からの情報発信が必要である。確立した治療法としては外科切除を軸としているが、癌遺残のない切除は、5割にすぎない(全国統計および Kobayashi S, *et al. J Surg Oncol* 2011)。また、化学療法においては、近年、生存期間延長が初めて証明されたゲムシタピン+シスプラチン療法であったとしても、奏効率は30%程度にとどまり(ABC-01試験)、他の現在試みられている化学療法でも、効果は限定される。

難治性である理由としては、胆道癌細胞を用いた研究からいくつ示唆がされている。研究者は胆道癌細胞では Bcl-2 ファミリーの Mcl-1 が過剰に発現しており、これが TRAIL 誘導アポトーシスに抵抗性であること、この過剰発現は炎症性サイトカインの IL-6 の自己分泌によるものであることを証明した (Kobayashi S, *et al. Gastroenterology* 2005, 若手研究スタートアップ平成 19 年「肝胆膵領域悪性腫瘍の化学療法抵抗性に対するアポトーシスの役割」、若手 B 平成 22 年「炎症と化学療法抵抗性との関連-胆道癌における解析と克服-」)。

一方で近年、癌幹細胞や上皮間葉転換など見地から化学療法抵抗性に関する研究が進められてきている。研究者らは低酸素などの刺激が、ヒストン制御蛋白を介して上皮間葉転換を誘導していることを報告した (Yamada D, Kobayashi S, *et al. Ann Surg Oncol* 2011)が、胆道癌は臨床治療経過中に胆道ドレナージを例外なく必要とし、感染およびその治療をしながら癌診療を継続することになるため、炎症とともに進展する特徴に着目し、炎症でも同様なメカニズムが存在すると仮説した。

また、ヒストンは転写因子を通じて幹細胞に作用すると考えられており、幹細胞と上皮

間葉転換の間の相互性が報告されていることからすると、低酸素や炎症という刺激はヒストン制御や転写因子を通じて形質変化を誘導すると考えられる。

こうした上皮間葉転換を誘導する刺激のなかで、同様に炎症で上昇する TGF- β に関しては多数の報告がある。また、正常細胞においては、IL-6 と TGF- β がクロストーク様に相互に刺激しあい、自己分泌を促すことが報告されている。

2. 研究の目的

以上の背景から、研究者らは、胆道炎症による刺激で IL-6/TGF- β がクロストーク様に自己/相互分泌作用し、上皮間葉転換や癌幹細胞化が誘導され、化学療法抵抗性を生じていると仮説した。

本研究の目的は、研究者らの仮説を証明することで、胆道炎症が癌と周囲環境におよぼす影響を多角的に明らかにすることにある。

治療中に常に胆道炎症を伴う胆道癌における、炎症に伴う癌細胞および周囲環境の形質変化を調べるために、近年わかってきた IL-6/TGF-beta クロストークという概念を通じて、癌細胞の転移浸潤能、化学療法抵抗性、上皮間葉転換、癌幹細胞化に対する影響に関して検討を行った。

3. 研究の方法

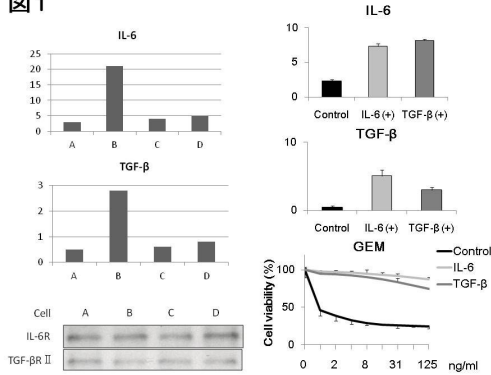
胆道癌細胞株を用いて化学療法耐性株の樹立を行うとともに、同細胞株と胆道癌切除検体を用いて、qRT-PCR、免疫組織化学、WB, ELISA 等で、検討を行った。

4. 研究の成果

まず、胆道癌に作用する代表的な炎症性サイトカインである IL-6 と TGF- β に着目し、この2分子の相互作用ならびに癌細胞の形質転換に関する検討を行った。複数の胆道癌細胞株を用いた検討で、すべての癌細胞において IL-6 および TGF- β の発現分泌が認められ、

それぞれの受容体の発現も認められた(図1)。

図1



IL-6 または TGF- β の刺激により、mRNA および蛋白レベルにおいて、2分子の相互作用が認められ、IL-6/TGF- β クロストークの存在が示唆された(図1)。

さらに胆道癌細胞株における IL-6/ TGF- β クロストークは化学療法抵抗性や上皮間葉転換を誘導し、また逆に化学療法抵抗株においては上皮間葉転換が誘導されていること、そして切除検体においては癌先進部や転移巣で再現されていることを明らかにした(図2,3)。

図2

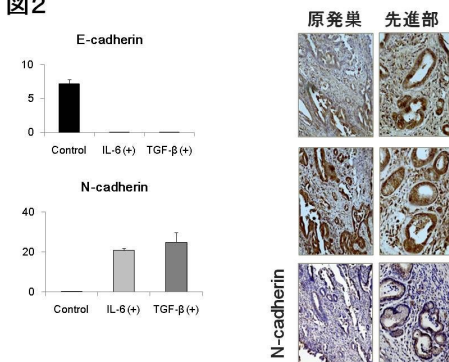
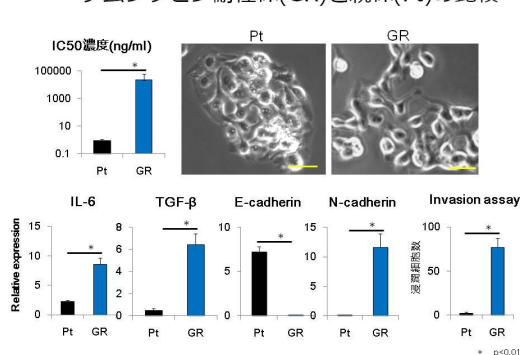


図3 ゲムシタピン耐性株(GR)と親株(Pt)の比較



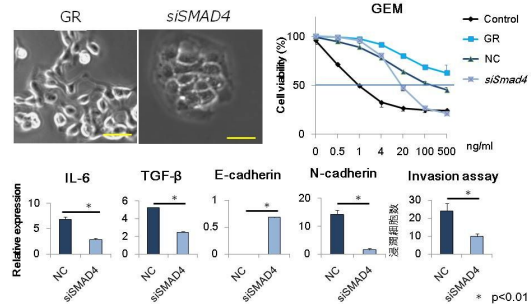
胆道癌は化学療法を施行するにあたり肝

内胆管癌も対象としているが、その肝内胆管癌細胞においては IL-6/TGF- β クロストークや上皮間葉系転換が著しいことが分かった。

次に、この現象を制御する細胞内シグナル伝達経路について検討した(図4)。複数の細胞

図4

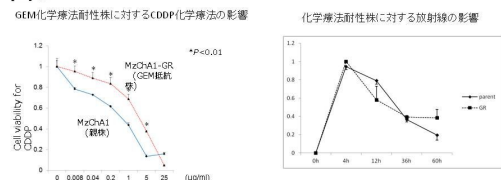
SMAD4ノックダウンによる効果



胞内シグナル伝達経路に特異的な阻害剤または siRNA を用いて、主要経路の候補について検討したところ、SMAD4 の阻害により、IL-6およびTGF- β の両方の発現の低下が認められ、化学療法抵抗性および上皮間葉転換が阻害された。さらに上皮間葉転換が可逆的変化であることに着目して、Epigenetic な制御を行うヒストンに着目したところ、クロストークが誘導する上皮間葉転換や化学療法抵抗性が制御可能であること、SMAD4 がやはり Key factor であることを明らかにした。

続いて、癌細胞外因子への影響について検討した。癌細胞外因子として腫瘍内間質における分子について検討したところ、リンパ節転移や化学療法抵抗性との関与が明らかになった。

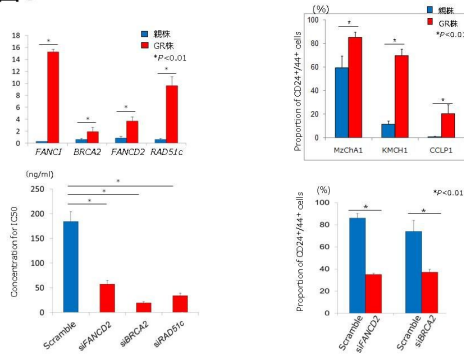
図5



また、誘導した化学療法抵抗癌細胞株は複数の薬剤に対する化学療法抵抗性も有しており(図5)、これは細胞の有するもとの DNA 修復因子や幹細胞が関与していた(図6)。一方で、放射線は化学療法抵抗性

に關与していなかった(図5)。

図6



以上から、炎症を伴うことによって、IL-6/TGF- β クロストークが誘導され、上皮間葉転換を通じた化学療法抵抗性が生じることが示唆された。この現象は、癌先進部において顕著であり、局所リンパ節転移や、化学療法抵抗性に關する間質の発現とも關連しており、SMAD4 が主要経路であった。この化学療法抵抗性は同分子の制御のみならずヒストン制御により解除できる可能性があったが、同時に他剤に対する化学療法抵抗性も癌幹細胞や DNA 修復因子を介して誘導する問題も有していた。一方で、放射線の併用は化学療法抵抗性を凌駕する可能性を示していた。

本研究においては、胆道癌に伴う炎症による上皮間葉転換、化学療法抵抗性の誘導を明らかにし、そのメカニズムの解析を通じて、ヒストン制御や放射線治療を追加することでその抵抗性を打破できる可能性を示しており、胆道癌治療における新たな局所制御の可能性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{ 雑誌論文 } (計 10 件)

1. Yamada D, Kobayashi S, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Ishii H, Nagano H, Doki Y, Mori M. Role of crosstalk between interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 in epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in biliary tract cancer. *Eur J Cancer*. 2013; 49: 1725-1740

2. Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Kawamoto K, Wada H, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Clinicopathological features of long-term survivors for advanced biliary tract cancer and impact of the number of lymph nodes involved. *Int J Surg* 2013; 11: 145-151

3. Kishimoto T, Eguchi H, Nagano H, Kobayashi S, Akita H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Tomokuni A, Tomimaru Y, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Plasma miR-21 is a novel diagnostic biomarker for biliary tract cancer. *Cancer Sci* 2013; 104: 1626-1631.

4. Nakashima S, Kobayashi S, Nagano H, Tomokuni A, Tomimaru Y, Asaoka T, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Doki Y, Mori M. BRCA/Fanconi Anemia Pathway Implicates Chemo-resistance to Gemcitabine in Biliary Tract Cancer. *Cancer Sci*. 2015 *in Press*

5. Takeda Y, Nakamori S, Eguchi H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Konishi K, Yoshioka Y, Umeshita K, Mori M, Doki Y, Nagano H. Neoadjuvant Gemcitabine-based Accelerated Hyperfractionation Chemoradiotherapy for Patients with Borderline Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2014 Dec;44(12):1172-80.

6. Nakashima S, Kobayashi S, Sakai D, Tomokuni A, Tomimaru Y, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Matsuura N, Doki Y, Mori M, Nagano H. Prognostic impact of tumoral and/or peri-tumoral stromal SPARC expressions after surgery in patients with biliary tract cancer. *J Surg Oncol*. 2014 Dec;110(8):1016-22

7. Kobayashi S, Nagano H, Sakai D, Eguchi H, Hatano E, Kanai M, Seo S, Taura K, Fujiwara Y, Ajiki T, Takemura S, Kubo S, Yanagimoto H, Toyokawa H, Tsuji A, Terajima H, Morita S, Ioka T. Phase I study of adjuvant gemcitabine or S-1 in patients with biliary tract cancers undergoing major hepatectomy: KHBO1003 study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014 Oct;74(4):699-709

8. Koga C, Kobayashi S, Nagano H, Tomimaru Y, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Eguchi H, Konno M, Ishii H, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Reprogramming Using microRNA-302 Improves Drug Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Ann Surg Oncol*. 2014 Dec;21 Suppl 4:S591-600.

9. Toyoda M, Ajiki T, Fujiwara Y, Nagano H, Kobayashi S, Sakai D, Hatano E, Kanai M, Nakamori S, Miyamoto A, Tsuji A, Kaihara S, Ikoma H, Takemura S, Toyokawa H, Terajima H, Morita S, Ioka T. Phase I study of adjuvant chemotherapy with gemcitabine plus cisplatin in patients with biliary tract cancer undergoing curative resection without major hepatectomy (KHBO1004) *Cancer Chemother Pharmacol*.

2014;73:1295-301.

10. Eguchi H, Nagano H, Kobayashi S, Kawamoto K, Wada H, Hama N, Tomimaru Y, Akita H, Sakai D, Satoh T, Kudo T, Isohashi F, Mori M, Doki Y. A phase I trial of combination therapy using gemcitabine and S-1 concurrent with full-dose radiation for resectable pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;73:309-15.

〔学会発表〕(計 31 件)

1. 小林省吾、永野浩昭、和田浩志、川本弘一、丸橋繁、江口英利、種村匡弘、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹 進行胆道癌の長期生存例の臨床病理学的特徴とその術前予測 第 112 回 日本外科学会定期学術集会 千葉 2012/4

2. 小林省吾、丸橋繁、和田浩志、川本弘一、江口英利、種村匡弘、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 臨床病理学的検討からみた肝門部胆管癌における脈管合併切除再建の意義 第 24 回 日本肝胆膵外科学会・学術集会 大阪 2012/5

3. 小林省吾、永野浩昭、和田浩志、川本弘一、丸橋繁、江口英利、種村匡弘、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹 垂直進展とリンパ節転移からみた胆道癌における Borderlineresectionable と考える症例の定義と対策 第 67 回 日本消化器外科学会総会 富山 2012/7

4. 小林省吾、丸橋繁、和田浩志、川本弘一、江口英利、種村匡弘、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 ポストゲムシタピン時代における化学療法的位置づけ 第 48 回 日本胆道学会東京 2012/9

5. 山田大作、小林省吾、山本浩文、和田浩志、川本弘一、丸橋繁、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 低酸素における EMT のエピジェネティック機構 - 転移性肝癌および肝細胞癌の検討から - 第 18 回 肝血流動態イメージ研究会神戸 2012/1

6. 山田大作、小林省吾、永野浩昭、和田浩志、川本弘一、丸橋繁、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹 胆道癌における IL-6/TGF-beta クロストークと化学療法耐性への影響 第 112 回 日本外科学会定期学術集会千葉 2012/4

7. 山田大作、小林省吾、和田浩志、川本弘一、丸橋繁、江口英利、石井秀始、永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹 胆道癌における EMT 誘導因子の同定 第 67 回 日本消化器外科学会総会富山 2012/7

8. Shogo Kobayashi, Hiroaki Nagano, Daisaku Yamada, Hideshi Ishii, Yoshito Tomimaru, Naoki Hama, Hiroshi Wada, Koichi Kawamoto, Hidetoshi Eguchi, Yuichiro Doki, and Masaki Mori. Inflammation-associated cytokines of biliary tract cancer induced chemo-resistance and therapeutic implications *ASCO-GI* 1014, 1/16-18. San Francisco, CA

9. 小林省吾、永野浩昭、和田浩志、濱直樹、

秋田裕史、川本弘一、丸橋繁、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹 進行胆道癌における脈管合併切除再建の可能性 日本外科学会定期学術集会 2013, 4/11-13 福岡

10. 小林省吾、和田浩志、濱直樹、富丸慶人、秋田裕史、川本弘一、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 動脈浸潤胆道癌に対する合併切除再建の取り組み 日本胆道学会学術集会 2013, 9/19-20 千葉

11. 小林省吾、秋田裕史、濱直樹、和田浩志、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 肝切除を伴う膵頭十二指腸切除術例の検討 肝胆膵外科学会・学術集会 2013, 6/12-14 栃木

12. 小林省吾、永野浩昭、和田浩志、濱直樹、富丸慶人、秋田裕史、川本弘一、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹 肝門部胆管癌における脈管合併切除再建の意義 日本臨床外科学会総会 2013, 11/21-23 愛知

13. 古賀睦人、小林省吾、江口英利、秋田裕史、濱直樹、和田浩志、川本弘一、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 胆道癌患者における術前、術後の腎機能に関する検討 肝胆膵外科学会・学術集会 2013, 6/12-14 栃木

14. 古賀睦人、小林省吾、江口英利、秋田裕史、濱直樹、和田浩志、川本弘一、丸橋繁、梅下浩司、永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹

miR-302 導入による肝細胞癌への影響 日本外科学会定期学術集会 2013, 4/11-13 福岡

15. 古賀睦人、和田浩志、濱直樹、富丸慶人、秋田裕史、川本弘一、小林省吾、江口英利、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 miR-302 によるリプログラミング手法を用いた肝細胞癌治療の可能性の検討 日本消化器外科学会総会 2013, 7/17-19 宮崎

16. 中島慎介、小林省吾、秋田裕史、濱直樹、和田浩志、川本弘一、丸橋繁、江口英利、梅下浩司、永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹 網羅的遺伝子発現解析を用いたゲムシタピン耐性胆道癌における機序の解明 日本外科学会定期学術集会 2013, 4/11-13 福岡

17. 中島慎介、小林省吾、富丸慶人、濱直樹、和田浩志、川本弘一、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 予定残肝容積率40%未満の肝切除症例に対する門脈塞栓術の検討 日本胆道学会学術集会 2013, 9/19-20 千葉

18. 中島慎介、小林省吾、秋田裕史、濱直樹、和田浩志、川本弘一、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 予定残肝容積率40%以下の肝切除症例に対する門脈塞栓術の検討 肝胆膵外科学会・学術集会 2013, 6/12-14 栃木

19. 中島慎介、小林省吾、秋田裕史、濱直樹、和田浩志、川本弘一、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 DNA修復阻害を利用したゲムシタピン耐性胆道癌に対

する新規治療戦略の検討 日本消化器外科学会総会 2013, 7/17-19 宮崎

20. 津田雄二郎、小林省吾、富丸慶人、秋田裕史、濱直樹、和田浩志、川本弘一、江口英利、永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹 当院における末梢型肝内胆管がんに対する切除成績とリンパ節郭清の意義についての検討 日本消化器外科学会総会 2013, 7/17-19 宮崎

21. 小林省吾、富丸慶人、和田浩志、濱直樹、川本弘一、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 教室における進行胆道癌に対する治療戦略 第 26 回日本肝胆膵学会・学術集会 2014/6 和歌山市

22. 小林省吾、永野浩昭、江口英利、富丸慶人、濱直樹、和田浩志、川本弘一、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹 教室における広範囲胆管癌に対する治療戦略 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014/7 郡山市

23. 小林省吾、井岡達也、森田智視、波多野悦朗、味木徹夫、永野浩昭 肝葉切除を伴う胆道癌切除例に対する術後補助化学療法の無作為化第 II 相試験 第 52 回 日本癌治療学会学術集会 2014/8 横浜市

24. 小林省吾、永野浩昭、井岡達也 大量肝切除を伴う胆道癌手術における GEM または S-1 による補助化学療法 第 50 回 日本胆道学会学術集会 2014/9 東京

25. 中島慎介、小林省吾、坂井大介、富丸慶人、濱直樹、和田浩志、川本弘一、石井秀始、江口英利、梅下浩司、永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹 胆道癌における SPARC 発現の臨床的意義 第 22 回日本消化器関連学会週間 2014/10/23-26 神戸

26. 中島慎介、小林省吾、富丸慶人、和田浩志、濱直樹、川本弘一、江口英利、梅下浩司、永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹 DNA 相同組換え修復阻害を利用した胆道癌に対する治療戦略 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014/3/4-5 京都

7. 中島慎介、小林省吾、友國晃、富丸慶人、濱直樹、和田浩志、川本弘一、丸橋繁、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 予定残肝容積率 40% 以下の肝切除症例に対する術前門脈塞栓術の検討 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2014/6/11-13 和歌山

28. 中島慎介、小林省吾、富丸慶人、濱直樹、和田浩志、川本弘一、江口英利、永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹 DNA 相同組換え修復阻害を利用した胆道癌に対する治療戦略 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014/7/16-18 郡山

29. 阪本卓也、小林省吾、富丸慶人、秋田裕史、和田浩志、濱直樹、川本弘一、江口英利、梅下浩司、永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹 胆道癌における化学療法耐性と上皮間葉転換に対する HDAC 阻害剤の作用に関する検討 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014/4/3-5 京都

30. 阪本卓也、小林省吾、富丸慶人、濱直樹、和田浩志、川本弘一、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 胆道癌手術における周術期栄養状態と合併症に関する検討 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2014/6/11-13 和歌山

31. 阪本卓也、小林省吾、友國晃、富丸慶人、和田浩志、濱直樹、川本弘一、丸橋繁、江口英利、梅下浩司、永野浩昭、土岐祐一郎、森正樹 HDAC 阻害剤を用いた胆道鏡における上皮間葉転換と化学療法抵抗性の制御 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014/7/16-18 郡山

〔図書〕(計 2 件)

1. 小林省吾、和田浩志、丸橋繁、川本弘一、濱直樹、秋田裕史、江口英利、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭 進行胆道癌の長期生存例の臨床病理学的特徴とその術前予測 篠原出版社 2013 年

2. 小林省吾、後藤邦仁、丸橋繁、高橋秀典、秋田裕史、杉村啓二郎、三吉範克、本居正明、大森健、岸健太郎、能浦真吾、藤原義之、大植雅之、矢野雅彦、石川治、左近賢人 FDG-PET による胆嚢癌進展度診断 胆と膵医学図書出版

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)
○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 省吾 (KOBAYASHI SHOGO)
大阪府立成人病センター 副部長
研究者番号: 30452436

(2)研究分担者

1. 和田 浩志 (WADA HIROSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 00572554

2. 永野 浩昭 (NAGANO HIROAKI)
山口大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 10294050

3. 丸橋 繁 (MARUBASHI SHIGERU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 20362725

4. 川本 弘一 (KAWAMOTO KOICHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 30432470

5. 江口 英利 (EGUCHI HIDETOSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 90542118

(3)連携研究者

なし