

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06007

研究課題名(和文) 時計遺伝子制御に基づく膵・胆道癌の癌微小環境形成

研究課題名(英文) Pancreato-biliary cancer microenvironment formation is based on the regulation of clock genes.

研究代表者

吉澤 忠司 (Yoshizawa, Tadashi)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70761071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：難治性癌の代表である膵癌・胆道癌の病態には、癌細胞の上皮間葉転換を伴う浸潤増殖および脈管侵襲を介した転移が関与している。胆管癌細胞株とヒト間葉系幹細胞株との共培養系モデルにおいて、癌細胞株の形態変化、免疫組織染色で、癌細胞に上皮間葉転換が生じることを明らかにした。また、共培養を施行した胆管癌細胞株において、DEC1 の発現が上昇していることを、RT-PCR を用いて明らかにし、時計遺伝子の制御のもと、癌微小環境が形成されることが示唆された。生体に近い癌微小環境モデル(リンパ管組織を含む三次元培養モデル)を作製し胆管癌細胞株がリンパ管に浸潤する組織像を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Pancreato-biliary cancer is one of the most aggressive malignancies in humans. Its aggressive phenotypes are thought to be associated with invasive tumour growth via epithelial mesenchymal transition. We clarified that in a co-culture model of cholangiocarcinoma and human mesenchymal stem cell lines, carcinoma cells indicate mesenchymal transition by morphological changes and immunohistochemical staining. In addition, using RT-PCR, it was clarified that the expression of DEC1 is elevated in a co-cultured model, and it was suggested that the cancer microenvironment is formed under the control of the clock gene. Furthermore, we could obtain an image of cancer cells infiltrating the lymph vessel in a cancer microenvironment model (three-dimensional culture model including the lymphatic vessel tissue).

研究分野：人体病理学

キーワード：癌 胆道 癌微小環境 時計遺伝子 上皮間葉転換

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌ならびに胆道癌は、生命予後がきわめて不良で、難治性癌の代表とされている。

(1) 癌の増殖・浸潤・転移といった生物学的な特性は、癌細胞のみで決定されるものではなく、癌細胞のおかれた微小環境下での間質との相互作用が影響していると考えられている。特に間質の線維化を顕著に伴う膵癌・胆道癌の発育進展には、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)。その特徴は、浸潤病巣での間質の線維化である。この線維化を形成する線維芽細胞は、SMA 陽性を示す、筋線維芽細胞の特徴を有しており、癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast ; CAF) として注目されている。また、この CAF は癌細胞の上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT) にも関与していることが明らかとなっている。我々の胆管癌を用いた研究で、原発巣、リンパ節転移巣において CAF の増生が多い症例では予後不良となることを明らかにした。また、大腸癌においても同様の結果を得ている (Oncol Rep, 2016)。従って、癌と間質を考慮した癌微小環境を解析することは、従来の細胞のみをターゲットとした解析に比べ、より生体に近い環境を反映し、臨床応用・治療へ寄与するものと考えられる。

(2) 生物の生理機能・代謝・行動は、脳の視床下部(視交叉上核)で駆動されてい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。この生物時計(概日リズム)は時計遺伝子の発現により制御され、その機能解析が進みつつある。我々の研究室は、DEC 遺伝子 (DEC1 および DEC2) が時計遺伝子ファミリーに属することを解明し、さらに変異型 DEC 遺伝子を用いて時計遺伝子のフィードバック機構について明らかにするなど、DEC 遺伝子解析に関して世界に先駆けた研究を行い、評価を受けている (Int J Mol Med 17: 1053-1056, 2006; Eur J Biochem 271, 4409-4419, 2004; Nature 419, 841-844, 2002)。さらに我々は、DEC が概日リズム(生物時計)の調節に加えて、血管新生・アポトーシス制御や腫瘍細胞増殖などの病態機序と関連していることを報告している (Genes Cells 15: 315-325, 2010; Genes Cells 13: 131-144, 2008)。

## 2. 研究の目的

膵・胆道癌の持つ高悪性度形質の特性として、早期病変より癌細胞周囲に線維化が生じ、リンパ管侵襲・静脈侵襲・神経周囲浸潤が顕著になることが挙げられる。我々は、この癌微小環境形成が、概

日リズムを形成する時計遺伝子 (bHLH 型転写因子) を基盤に形成されるという仮説に基づき、時計遺伝子の発現と、癌細胞増殖・癌細胞-間質との相互作用の機序を証明することで、癌微小環境の病態解明と、増殖制御機構の構築を明らかにし、臨床応用への展開を目的とする。

## 3. 研究の方法

前述の背景と実績に基づき、我々は、膵・胆道癌では生物時計が関与する概日リズムの下で、特徴的な間質変化を伴う微小環境が形成され、細胞増殖、脈管侵襲が行われると考えている。本研究では、難治性癌の代表である膵・胆道癌の悪性度を規定する癌微小環境因子を、癌と間質・時計遺伝子との相互作用に着目し以下の項目で証明する。

- (1) 癌微小環境を形成するために、癌細胞とヒト間葉系幹細胞を共培養し、ヒト間葉系幹細胞の癌関連線維芽細胞への分化を明らかにする。
- (2) 癌細胞と癌関連線維芽細胞との共培養により、癌の悪性形質転化、時計遺伝子の発現を確認する。
- (3) リンパ管・血管を有する三次元培養組モデルを作製し、癌細胞の脈管侵襲、間質との相互作用、時計遺伝子の関与を明らかにする。また、時計遺伝子を過剰発現、またはノックダウンすることで、癌微小環境への影響、癌細胞の悪性形質転化への影響を明らかにする。
- (4) 癌微小環境下において、サイトカインが癌細胞に及ぼす影響と、時計遺伝子発現との相互作用を明らかにする。

## 4. 研究成果

- (1) 胆管癌細胞株とヒト間葉系幹細胞株との共培養系モデルにおいて、癌細胞株の形態変化、免疫染色で、癌細胞における vimentin の発現上昇、E-cadherin の発現低下といった、上皮間葉転換が生じることを明らかにした。
- (2) 胆管癌細胞株とヒト間葉系幹細胞株との共培養系において時計遺伝子の関与を検討したところ、共培養を施行した胆管癌細胞株において、DEC1 の発現が上昇していることを、RT-PCR を用いて明らかにし、時計遺伝子の制御のもと、癌微小環境が形成されることが示唆された。
- (3) 生体に近い癌微小環境モデル(リンパ管組織を含む三次元培養モデル)を作製し胆管癌細胞株がリンパ管に浸潤する組織像を得ることができた。

## 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 13 件 : すべて査読あり)

1. Liu Q, Wu Y, Yoshizawa T, Yan X, Morohashi S, Seino H, Kato Y, Kijima H. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 functions as an anti-apoptotic factor during paclitaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Int J Mol Med*. 2016; 38(6):1727-33.
  2. Takatsuna M, Morohashi S, Yoshizawa T, Hirai H, Haga T, Ota R, Wu Y, Morohashi H, Hakamada K, Terai S, Kijima H. Myofibroblasts of the muscle layer stimulate the malignant potential of colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2016;36(3):1251-7.
  3. Hirai H, Yoshizawa T, Morohashi S, Haga T, Wu Y, Ota R, Takatsuna M, Akasaka H, Hakamada K, Kijima H. Clinicopathological significance of gastric poorly differentiated medullary carcinoma. *Biomed Res*. 2016;37(2):77-84.
  4. Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Tanaka M, Inokuchi S, Yoshizawa T, Morohashi S, Kijima H. Podoplanin-mediated TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition and its correlation with bHLH transcription factor DEC in TE-11 cells. *Int J Oncol*. 2016;48(6):2310-20.
  5. Morohashi S, Yoshizawa T, Seino H, Hirai H, Haga T, Ota R, Wu Y, Yoshida E, Hakamada K, Kijima H. A new histological therapeutic classification system to predict eradicated and residual lymph nodes in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Oncol Rep*. 2016;35(5):2592-8.
  6. Yokoyama H, Sasaki A, Yoshizawa T, Kijima H, Hakamada K, Yamada K. Imaging hamster model of bile duct cancer in vivo using fluorescent L-glucose derivatives. *Hum Cell*. 2016;29(3):111-21.
  7. Kimura Y, Morohashi S, Yoshizawa T, Suzuki T, Morohashi H, Sakamoto Y, Koyama M, Murata A, Kijima H, Hakamada K. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor, thymidine phosphorylase and microvessel density in colorectal cancer. *Mol Med Rep*. 2016;13(2):1551-7.
  8. Morohashi S, Morohashi H, Yoshizawa T, Tanaka M, Mikami T, Kagiya T, Saito T, Hirai H, Haga T, Wu Y, Hakamada K, Kijima H. Morphological analysis of the residual rectal mucosa in 12 postoperative colitis patients. *Hirosaki Med J*. 2016;67:92-101.
  9. Haga T, Yoshizawa T, Morohashi S, Hirai H, Saitou K, Ota R, Takatsuna M, Wu Y, Fukuda S, Kijima H. Phenotypic characterization of early biliary tract carcinomas proposes two carcinogenesis pathways. *Hirosaki Med J*. 2016;67:28-38.
  10. Wu Y, Sato H, Suzuki T, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino H, Kawamoto T, Fujimoto K, Kato Y, Kijima H. Involvement of c-Myc in the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells induced by bHLH transcription factor DEC2. *Int J Mol Med*. 2015;35(3):815-20. 8.
  11. Igarashi G, Endo T, Sawada N, Mikami K, Sato K, Kudo D, Toyoki Y, Hakamada K, Kakuta A, Shibusaki K, Takai Y, Yoshizawa T, Haga T, Kijima H, Fukuda S. Development of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C Patients 20 Years after Achieving a Sustained Virological Response with Interferon Therapy: A Report of Two Cases. *Journal of General and Family Medicine*. 2015;16(3):199-203.
  12. Wu Y, Sato H, Suzuki T, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino H, Kawamoto T, Fujimoto K, Kato Y, Kijima H. Involvement of c-Myc in the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells induced by bHLH transcription factor DEC2. *Int J Mol Med*. 2015;35(3):815-20.
  13. Sakuraba S, Morohashi S, Yoshizawa T, Tsutsumi S, Kimura N, Kudo D, Ishido K, Toyoki Y, Hakamada K, Kijima H. Muc5AC-negative phenotype is correlated with poor patient prognosis of pancreas head distal carcinoma. *Hirosaki Med J*. 2015;66:28-37.
- 〔学会発表〕(計 4 件)
1. Kijima H, Wu Y, Yoshizawa T, Seino H, Goto S, Haga T, Morohashi S. The bHLH transcription factor DEC plays an important role in epithelial-mesenchymal transition (EMT). 21st World Congress on Advances in Oncology and 19th International Symposium on Molecular Medicine, 6 October, 2016 (Oral presentation: Athens, Greece)
  2. 吉澤 忠司, 諸橋聡子, 清野 浩子, 呉 雲燕, 鬼島 宏. Dedifferentiated liposarcoma of the pancreas. 第 106 回日

本病理学会総会 2017年4月27日～29日  
京王プラザホテル(東京)

3. 吉澤 忠司, 諸橋 聡子, 清野 浩子, 呉 雲燕, 田中 幹二, 鬼島 宏. 羊水塞栓症の一剖検例. 第62回日本病理学会秋季特別総会 2016年11月10日～11日 金沢市文化ホール(石川県・金沢市)
4. 吉澤 忠司, 諸橋 聡子, 平井 秀明, 羽賀 敏博, 呉 雲燕, 鬼島 宏. Two synchronous intraductal papillary-mucinous carcinoma and bile duct carcinoma. 2016年5月12日～14日(宮城県・仙台市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 鬼島 宏, 吉澤 忠司, 平井 秀明, 諸橋 聡子, 袴田 健一【膵癌・胆道癌-基礎と臨床の最新研究動向-】胆道癌 特殊な組織型(臨床病理学的特徴) 胆道の浸潤性微小乳頭癌(解説/特集). 日本臨床. 2015;73(3):774-778 (総ページ数: 831)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉澤 忠司(Tadashi Yoshizawa)  
弘前大学医学研究科・客員研究員  
研究者番号: 70761071

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )