

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10200

研究課題名(和文) Sulfataseの胆管癌における役割の解明と治療への応用

研究課題名(英文) The role of Sulfatase in cholangioma

研究代表者

中村 育夫 (NAKAMURA, IKUO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10625312

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)：研究代表者は最近、Sulfatase(SULF)が肝細胞癌で増殖、浸潤において重要な役割を示すことを見出した。SULFは胆管癌細胞株においても発現しており、本研究は胆管癌でのSULFの増殖、浸潤に対する作用機序を明らかにし、治療応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。本研究で肝内胆管癌に対して肝切除術を受けた患者の摘出標本においてSULF1とSULF2の発現を確認し定量化すると、SULF2の発現と予後に明らかな相関は認めなかったが、SULF1は有意に術後無再発生存と累積生存に関連することが示唆された。今後、SULF1は腫瘍マーカーの一つとしての有用性の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have reported that Sulfatase (SULF) plays an important role in tumor growth and invasion in hepatocellular carcinoma (HCC). The expression of SULF in cholangioma was also found. The aim of this study is to investigate the effect of SULF on tumor growth and invasion in cholangioma and to apply it to the clinical treatment. In this study, we found and quantified the expression of SULF1 and SULF2 in the resected specimens of the patients with intrahepatic cholangiocellular carcinoma (ICC) by immunohistochemistry. Although the expression of SULF2 was not related to the outcome in patients with ICC, low expression of SULF1 showed poor prognosis in recurrence free survival and overall survival. SULF1 could be useful as a tumor marker for cholangioma.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：胆管細胞癌 Sulfatase 癌増殖 EMT

1. 研究開始当初の背景

研究代表者が所属していた米国 Mayo Clinic の研究室は、Sulfatase 1(SULF1)と Sulfatase 2(SULF2)が肝細胞癌(HCC)の癌増殖、浸潤において重要な役割を果たすことを明らかにした。HCCにおいてSULF1とSULF2は反対の作用を持つ。細胞株実験では、SULF1はHCCの増殖抑制作用を持ち、SULF2はHCCの増殖作用を有するとの報告があった。また、SULF2が発現している腫瘍(HCC)を有する患者は、再発が早く予後が悪いことが示されている。

様々な growth factor(GF)とサイトカインは、癌細胞の増殖、浸潤と癌間質細胞の活性化や増殖を制御している。癌細胞と癌間質細胞との相互作用は癌の増殖や浸潤、転移に重要な役割を持つ。Heparan sulfate glycosaminoglycans (HSGAGs)は heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) (プロテオグリカン)を構成する硫酸化多糖の複合体で、HSGAGsの硫酸化された状態がHSGAGsと growth factor (GF)とサイトカインとの結合を決定する。また、HSGAGsはGFがそのレセプターに結合する際の co-receptor として働く。

SSULF1とSULF2は、ヘパリンに存在する硫酸エステルを分解する硫酸エステル加水分解酵素で、特にHSGAGsの6-0位の硫酸エステルを加水分解し、HSGAGsに結合している様々な growth factor(PDGF、TGF-、FGF、Wnt など)とサイトカインに関与し、癌細胞の増殖、浸潤、Epithelial-mesenchymal

transition(EMT)、その腫瘍微小環境に重要な役割を果たす。最近、研究代表者は肝細胞癌細胞株(HCC)でSULF2はTGF-betaシグナルを通じてEMTに関与することを見出した。

胆管癌(CCC)による患者死亡数は年間約1万5000人と癌の死亡者数の第6位ではある。しかし近年、その患者数は明らかに増加傾向にあり10年後には患者数が2倍になると言われている。胆管癌は肝細胞癌に比べ転移、浸潤する頻度が高く、例え手術で治癒切除したとしても予後が非常に悪いとされている。胆管癌では、PDGFとTGF-シグナルが癌増殖において重要な役割を果たしている。胆管癌において、SULF1とSULF2がどのような役割をするのかは未だ解明されていない。

2. 研究の目的

SULFは胆管癌細胞株においても発現している。本研究はSULFの肝内胆管癌での増殖、浸潤、EMT、アポトーシスの作用機序、癌微小環境での役割を明らかにし、SULFの胆管癌での治療応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

3. 研究の方法

(1)2006年11月から2015年12月までに当科で手術を行った肝内胆管癌55例のうち、亜鉛固定をした臨床検体は29例であった。この29例を用いて検討した。

切除標本の免疫染色: SULF1、SULF2

手術時の切除標本を用いて、免疫染色法にてSULF1、SULF2の発現を調べる。

患者の無再発生存率、転移状況、累積生存率との関係を調べて、SULF1, SULF2 の再発危険因子、予後予測因子としての有用性を調べる。SULFの免疫染色について、その陽性所見(染色域)からGrade1(25%未満)、Grade2(25%以上50%未満)、Grade3(50%以上)に分類した。

切除標本の免疫染色: EMT マーカー (E-cadherin, Vimentin) 免疫染色法にてEMT マーカー (E-cadherin, Vimentin) の発現を調べ、SULF とEMT との関連性、また、EMT と患者の無再発生存率、転移状況、累積生存率との関係を調べる。

(2)胆管細胞株を用いて、SULFの発現をreal time PCRにて確認する。SULF (SULF1 およびSULF2) をknockdown、または強発現させて、癌増殖、浸潤、アポトーシス、EMT にどのように関与するかを研究する。

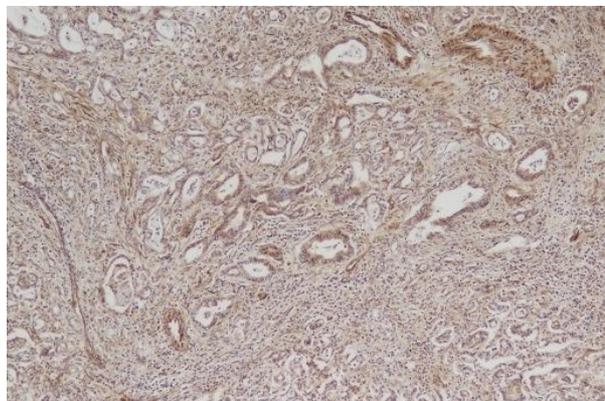
4. 研究成果

(1)

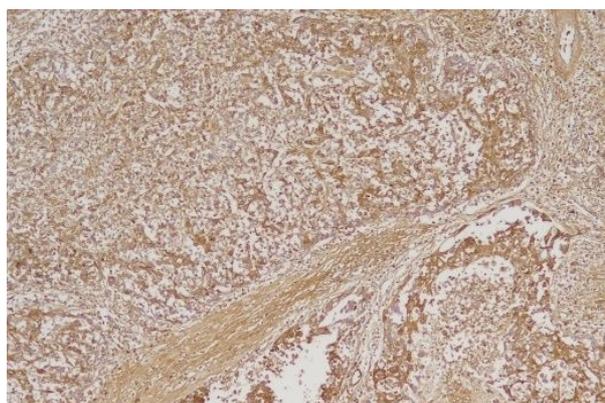
SULF1 の発現では、Grade1:3 例、Grade2:7 例、Grade3:19 例に、SULF2 の発現では、Grade1:10 例、Grade2:5 例、Grade3:14例に分類された (Fig.1A)。SULF1について、Grade1の無再発生存率は0%で、Grade2(28.6%)、Grade3(46.8%)に比べて有意に不良で (P=0.0049) (Fig.2A)。また、累積生存率でも有意に低かった(1年累積生存率、Grade1:33.3%、Grade2:71.4%、Grade3:84.2%、P=0.0268)(Fig.2B)。SULF2について、無再発生存率(1年無再発生存率、Grade1:30.0%、Grade2:40.0%、Grade3:40.8%、P=0.9072) (Fig.2C) と累積生存率(1年累積生存率、Grade1:70.0%、

Grade2:80.0%、Grade3:85.7%、P=0.6532) (Fig.2D) とともに各群間に有意差は認めなかった。また、無再発生存の再発危険因子と累積生存の予後予測因子を単変量解析と多変量解析を用いて検討した。その結果、無再発生存の再発危険因子と累積生存の予後予測因子は、ともにリンパ節転移の有無であった。当科での肝内胆管癌の臨床病理学的検討において、SULF2の発現と予後に明らかな相関は認めなかったが、SULF1の低発現で無再発生存率、累積生存率は有意に不良であった。

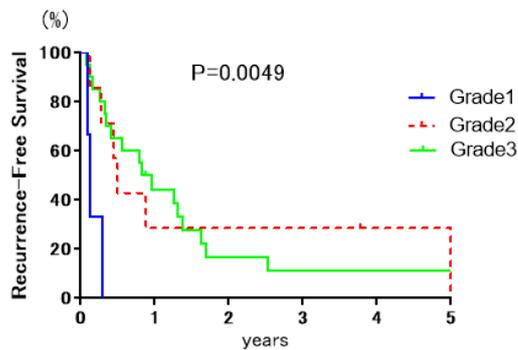
SULF1 (Grade3) (Fig.1A)



SULF2 (Grade3) (Fig.1B)

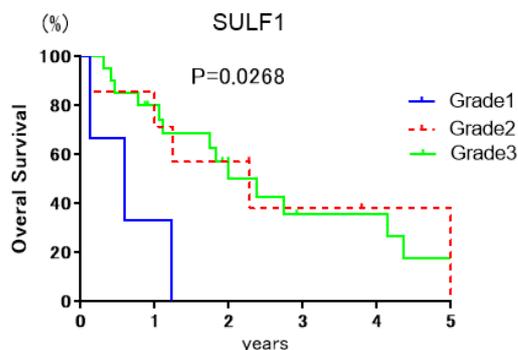


Recurrence free survival (SULF1)



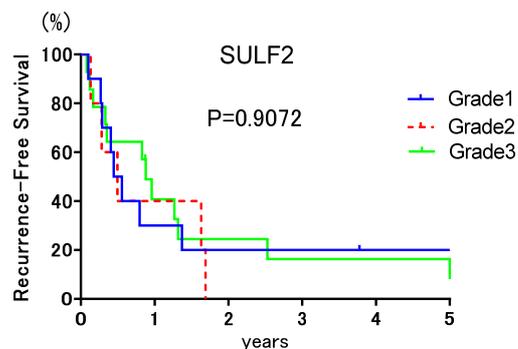
(Fig.2A)

Overall survival (SULF1)



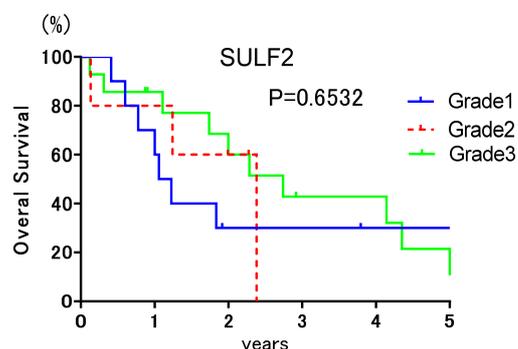
(Fig.2B)

Recurrence free survival (SULF2)



(Fig.2C)

Overall survival (SULF2)



(Fig.2D)

E-cadherin, Vimentinの免疫染色の結果、E-cadherin, Vimentinの発現とSULFの発現との関連についてはみられなかった。また、E-cadherin, Vimentinの発現と患者の無再発生存率、累積生存率、転移状況との間に有意な関連はみられなかった。

(2)

数種類の胆管細胞株でのSULF1, SULF2の発現を確認できた。以前に肝細胞癌の細胞株でSULFのknockdownと強発現は可能であったが、胆管細胞癌の細胞株でSULFのknockdownと強発現が困難であったため、癌増殖、浸潤、アポトーシス、EMTについて検討できなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

中村育夫、波多野悦朗、裏正寛、岡田敏弘、麻野泰包、宇山直樹、鈴村和大、近藤祐一、山中潤一、藤元治朗、肝内胆管癌におけるSulfataseの役割、第72回消化器外科学会総会 2017年7月 (口演発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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
兵庫医科大学 肝胆膵外科 ホーム
ページ（現在作成中）にて研究内容を
発表予定。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 育夫 (IKUO, NAKAMURA)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10625312

(2) 研究分担者

藤元 治朗 (JIRO, FUJIMOTO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199373

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()