

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19900

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞(CAF)を標的とした胆道癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic implication for cancer-associated fibroblasts (CAF) in cholangiocarcinoma

研究代表者

今井 克憲 (IMAI, Katsunori)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60555746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胆管癌はサンプル採取法の検証が難しかったため、胃癌からのCAF分離に取り組んだ。胃癌腫瘍組織より細胞を分離培養し、継代の後 SMA染色でMyofibroblastであることを確認した。胃癌症例より分離したCAF細胞において6例中3例にてCXCL12の高発現を認めた。CXCL12高発現CAFとCXCR4発現胃癌細胞OACM5.1Cを共培養すると、癌細胞の浸潤能が有意に亢進し、CXCR4 antagonistであるAMD3100を投与すると、その作用は抑制された。

研究成果の概要(英文)：Cancer associated fibroblasts (CAFs) were hardly isolated from human cholangiocarcinoma tissue samples because tissue was stiff and elastic. Instead, CAFs were isolated from human gastric cancer tissues. Activation of CAFs was confirmed by expression of SMA by immunocytochemistry. Three out of six human CAFs overexpressed CXCL12. Co-culture of CXCL12-expressing human CAF and gastric cancer cell line, OACM5.1C expressing CXCR4 induced invasive capacity of cancer cell. On the other hand, this interaction was prohibited by CXCR4 antagonist.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：癌関連線維芽細胞(CAF) 胃癌 CXCL12 CXCR4

### 1. 研究開始当初の背景

胆管癌は根治手術のみが唯一の根治的治療法であり、化学療法・分子標的治療を含め、他の標準的な治療は確立していない。また、5年生存率は根治例においても30%前後と非常に不良である。我々は胆管癌の腫瘍間質に存在する Cancer-associated fibroblast (CAF)が癌の進展に極めて重要な集団であり、治療標的となる可能性をこれまで報告してきた。

### 2. 研究の目的

今研究では、胆管癌において豊富な間質に存在する CAF をターゲットとした治療、すなわち CAF を活性化させる因子 Hedgehog signaling をターゲットとした治療 (SMO, GLI antagonist) の有効性、またそのメカニズムについて解析を行う。

### 3. 研究の方法

胆管癌細胞と CAF の相互作用機序を明らかにすべく、3次元直接共培養モデルの作成および癌細胞と CAF の個別解析を行う。また、近年報告された胆管癌発癌モデルマウスの作成を行うこと。これらの modality を用いて、Hedgehog signal inhibitor の有効性について詳細な解析を行うことであった。これらのメカニズムのヒトにおける確認作業として、ヒト胆管癌腫瘍サンプルを用いた Hedgehog signaling の臨床的意義の確認を行う。CAF から産生され、癌との相互作用に極めて重要な分泌蛋白 Periostin が腫瘍内 CAF の存在の血清 predictive marker となるかについても検討を行う。

一方、3次元相互作用モデルに必要な傾向標識が困難であったことと、モデルマウス実験の計画中に地震による研究体制の一時的な崩壊があったことから、研究方法を以下変更した。胆管癌細胞 CAF を人腫瘍組織より分離し、in vitro における相互作用のに関するメカニズムを明らかにすること。その結果をもとにヒト癌細胞株を用いた検証、ヒトサンプルを用いた免疫組織学的検討も行う。

### 4. 研究成果

胆管癌細胞株と共培養モデルを行うヒト腫瘍組織内 Myofibroblast の分離に取り組んだ。ヒト胆管癌は症例が少ないことと、サンプル採取にとりくんだが、方法論の確立が難しかったため、胃癌からの CAF 分離に取り組んだ。Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いて胃癌腫瘍組織より細胞を分離培養し、継代の後 SMA 染色で Myofibroblast であることを確認した。細胞を増やした後凍結し、各種実験用にストックした。

これまで胃癌 (特に胃接合部癌) 組織における CXCL12 の発現を免疫組織学的に確認し、Myofibroblast が発現している症例を約50%に認めため、分離した CAF 細胞においても

この発現を確認したところ、6例中3例にて CXCL12 の高発現を認めた。CXCL12 の受容体である CXCR4 を介した癌細胞-CAF 相互作用が存在するかを確認した。CXCL12 高発現 CAF と CXCR4 発現胃癌細胞 OACM5.1C を共培養すると、癌細胞の浸潤能が有意に亢進し、CXCR4 antagonist である AMD3100 を投与すると、その作用は抑制された。ヒト胃接合部癌組織における CXCL12 の免疫組織学的評価を行ったところ、間質の特に線維芽細胞に CXCL12 の発現を認めた。間質における CXCL12 の発現と臨床病理学的因子との関連性を調べると、CXCL12 の高発現はリンパ節転移陽性率・リンパ管浸潤と関連し、さらに根治切除後の5年生存率が有意に不良であった。

### 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 18 件)

1. Sugihara H, Ishimoto T, Yasuda T, Izumi D, Eto K, Sawayama H, Miyake K, Kurashige J, Imamura Y, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Takamori H, Baba H. Cancer-associated fibroblast-derived CXCL12 causes tumor progression in adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Med Oncol.* 2015 ;32:618. 査読有 DOI: 10.1007/s12032-015-0618-7.
2. Imai K, Allard MA, Castro Benitez C, Vibert E, Sa Cunha A, Cherqui D, Castaing D, Bismuth H, Baba H, Adam R. Nomogram for prediction of prognosis in patients with initially unresectable colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2016 Apr;103(5):590-9. 査読有 DOI: 10.1002/bjs.10073. Epub 2016 Jan 18.
3. Kaida T, Nitta H, Kitano Y, Yamamura K, Arima K, Izumi D, Higashi T, Kurashige J, Imai K, Hayashi H, Iwatsuki M, Ishimoto T, Hashimoto D, Yamashita Y, Chikamoto A, Imanura T, Ishiko T, Beppu T, Baba H. C5a receptor (CD88) promotes motility and invasiveness of gastric cancer by activating RhoA. *Oncotarget.* 2016 20;7:84798-84809. 査読有 DOI: 10.18632/oncotarget.12656.
4. Higashi T, Hayashi H, Kitano Y, Yamamura K, Kaida T, Arima K, Taki K, Nakagawa S, Okabe H, Nitta H, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Beppu T, Baba H. Statin attenuates cell proliferative ability via TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 2016 ;33:123. 査読有

- DOI: 10.1007/s12032-016-0845-6
5. Hashimoto D, Chikamoto A, Arima K, Taki K, Inoue R, Imai K, Yamashita Y, Baba H. Co-occurrence of liver metastasis of gastrointestinal stromal tumor and hepatocellular carcinoma: a case report. *J Surg Res*. 2016 ;205:38-42. 査読有  
DOI: 10.1016/j.jss.2016.02.044.
  6. Adam R, Imai K, Castro Benitez C, Allard MA, Vibert E, Sa Cunha A, Cherqui D, Baba H, Castaing D. Outcome after associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy and conventional two-stage hepatectomy for colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2016 ;103:1521-9. 査読有  
DOI: 10.1002/bjs.10256.
  7. Imai K, Allard MA, Benitez CC, Vibert E, Sa Cunha A, Cherqui D, Castaing D, Bismuth H, Baba H, Adam R. Early Recurrence After Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases: What Optimal Definition and What Predictive Factors? *Oncologist*. 2016 ;21:887-94. 査読有  
DOI:10.1634/theoncologist.2015-0468.
  8. Okabe H, Kinoshita H, Imai K, Nakagawa S, Higashi T, Arima K, Uchiyama H, Ikegami T, Harimoto N, Itoh S, Ishiko T, Yoshizumi T, Beppu T, Monga SP, Baba H, Maehara Y. Diverse Basis of -Catenin Activation in Human Hepatocellular Carcinoma: Implications in Biology and Prognosis. *PLoS One*. 2016 21;11:e0152695. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0152695.
  9. Arima K, Okabe H, Hashimoto D, Chikamoto A, Tsuji A, Yamamura K, Kitano Y, Inoue R, Kaida T, Higashi T, Taki K, Imai K, Komohara Y, Beppu T, Takeya M, Baba H. The diagnostic role of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting pancreatic ductal adenocarcinoma in patients with pancreatic diseases. *Int J Clin Oncol*. 2016 ;21:940-945. 査読有  
DOI: 10.1007/s10147-016-0975-z
  10. KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations, and patient prognosis in 126 pancreatic cancers: pyrosequencing technology and literature review. Zhou L, Baba Y, Kitano Y, Miyake K, Zhang X, Yamamura K, Kosumi K, Kaida T, Arima K, Taki K, Higashi T, Imai K, Hashimoto D, Yamashita Y, Chikamoto A, Beppu T, Tan X, Baba H. *Med Oncol*. 2016 ;33:32. 査読有  
DOI: 10.1007/s12032-016-0745-9.
  11. Imai K, Benitez CC, Allard MA, Vibert E, Cunha AS, Cherqui D, Castaing D, Bismuth H, Baba H, Adam R. Failure to Achieve a 2-Stage Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases: How to Prevent It? *Ann Surg*. 2015 ;262:772-8; discussion 778-9. 査読有  
DOI: 10.1097/SLA.0000000000001449.
  12. Masuda T, Beppu T, Okabe H, Nitta H, Imai K, Hayashi H, Chikamoto A, Yamamoto K, Ikeshima S, Kuramoto M, Shimada S, Baba H. Predictive factors of pathological vascular invasion in hepatocellular carcinoma within 3 cm and three nodules without radiological vascular invasion. *Hepatol Res*. 2016 ;46:985-91. 査読有  
DOI: 10.1111/hepr.12637.
  13. Okabe H, Hayashi H, Nakagawa S, Imai K, Nitta H, Arima K, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Beppu T, Baba H. Inducible factors for cancer-associated fibroblasts in liver cancer versus myofibroblasts in inflammatory liver disease. *Histol Histopathol*. 2016 ;31:141-8. 査読有  
DOI: 10.14670/HH-11-668.
  14. Higashi T, Hayashi H, Kaida T, Arima K, Takeyama H, Taki K, Izumi D, Tokunaga R, Kosumi K, Nakagawa S, Okabe H, Imai K, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Beppu T, Baba H. Prognostic Impact of Visceral Fat Amount and Branched-Chain Amino Acids (BCAA) in Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2015 ;22 Suppl 3:S1041-7. 査読有  
DOI: 10.1245/s10434-015-4796-5.
  15. Sakamoto K, Imai K, Higashi T, Taki K, Nakagawa S, Okabe H, Nitta H, Hayashi H, Chikamoto A, Ishiko T, Beppu T, Baba H. Significance of P-cadherin overexpression and possible mechanism of its regulation in intrahepatic cholangiocarcinoma and pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2015 ;106:1153-62. 査読有  
DOI: 10.1111/cas.12732.
  16. Beppu T, Nitta H, Hayashi H, Imai K, Okabe H, Nakagawa S, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Yoshida M, Yamashita Y, Baba H. Effect of branched-chain amino acid supplementation on functional liver regeneration in patients undergoing portal vein embolization and sequential hepatectomy: a randomized controlled trial. *J Gastroenterol*. 2015 ;50:1197-205. 査読有  
DOI: 10.1007/s00535-015-1067-y.

17. Hayashi H, Beppu T, Okabe H, Kuroki H, Nakagawa S, Imai K, Nitta H, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H. Functional assessment versus conventional volumetric assessment in the prediction of operative outcomes after major hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2015 ;22:166-76. 査読有  
DOI: 10.1002/jhbp.175.
18. Imai K, Benitez CC, Allard MA, Vibert E, Cunha AS, Cherqui D, Castaing D, Bismuth H, Baba H, Adam R. Failure to Achieve a 2-Stage Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases: How to Prevent It? *Ann Surg*. 2015 Nov;262(5):772-8; discussion 778-9. 査読有  
DOI: 10.1097/SLA.0000000000001449.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 今井克憲, Marc-Antoine Allard, Carlos Castro Benitez, Eric Vibert, Antonio Sa Cunha, Daniel Cherqui, Denis Castaing, 山下洋市, 馬場秀夫, Rene Adam  
「大腸癌肝転移に対する肝切除とラジオ波凝固療法の併用: Propensity-Score matching による肝切除単独との比較」  
第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年 4 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
  2. 今井克憲, 馬場秀夫  
「切除不能大腸癌肝転移に対する conversion chemotherapy 後の肝切除症例を対象とした予後予測モデルの構築」  
第 103 回日本消化器病学会総会、2017 年 4 月 20 日、京王プラザホテル(東京都)
  3. 今井克憲, 山下洋市, 甲斐田剛圭, 山尾宣暢, 梅崎直紀, 山村謙介, 宮田辰徳, 有馬浩太, 北野雄希, 塚本雅代, 中川茂樹, 橋本大輔, 近本 亮, 石河隆敏, 馬場秀夫  
「肝ドーム下および尾状葉病変に対する内視鏡下肝切除術」  
第 29 回日本内視鏡外科学会総会、2016 年 12 月 9 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
  4. 今井克憲, Castro Benitez Carlos, Allard Marc-Antoine, Vibert Eric, Sa Cunha Antonio, Cherqui Daniel, Castaing Denis, Bismuth Henri, 山下洋市, 馬場秀夫, Adam Rene  
「大腸癌両葉多発肝転移に対する Two-stage hepatectomy : 治療成績と予後規定因子」  
第 78 回日本臨床外科学会総会、2016 年 11 月 24 日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都)
5. 今井克憲, M.-A. Allard, C. B. Castro, E. Vibert, A. S. Cunha, D. Cherqui, D. Castaing, H. Bismuth, 馬場秀夫, R. Adam  
「大腸癌肝転移に対する肝切除術後再発: 早期再発の定義および予測因子」  
JDDW2016、2016 年 11 月 5 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県)
  6. 今井克憲, Carlos Castro Benitez, Marc-antoine Allard, Cunha Antonio Sa, Daniel Cherqui, Denis Castaing, 山下洋市, 別府 透, 馬場秀夫, Rene Adam  
「両葉多発の高度進行大腸癌肝転移に対する Two-stage hepatectomy と ALPPS 手術」  
第 71 回日本消化器外科学会総会、2016 年 7 月 15 日、アスティとくしま(徳島県)
  7. 今井克憲, Allard Marc-Antoine, Castro Benitez Carlos, Vibert Eric, Sa Cunha Antonio, Cherqui Daniel, Castaing Denis, Bismuth Henri, 山下洋市, 別府 透, 馬場秀夫, Adam Rene  
「切除不能大腸癌肝転移に対する conversion chemotherapy と肝切除後の予後予測ノモグラム」  
第 28 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2016 年 6 月 2 日、大阪国際会議場(大阪府)
  8. 今井克憲, Carlos Castro Benitez, Marc-Antoine Allard, Eric Vibert, Antonio Sa Cunha, Daniel Cherqui, Denis Castaing, 別府 透, 馬場秀夫, Rene Adam  
「両葉多発大腸癌肝転移に対する ALPPS 手術 vs Two-stage hepatectomy : Early report of oncological outcomes」  
第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年 4 月 16 日、大阪国際会議場(大阪府)
- 〔図書〕(計 0 件)  
なし  
〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 克憲 (IMAI, Katsunori)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60555746

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

岡部 弘尚 (OKABE, Hirohisa)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：40573621