

令和元年5月31日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19328

研究課題名(和文)胆道癌初期浸潤病巣における微小環境の機序解明

研究課題名(英文) Mechanism elucidation of microenvironment in biliary tract cancer at initial infiltration lesion.

研究代表者

羽賀 敏博 (Haga, Toshihiro)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：80771625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌の微小環境特性としては、初期浸潤病巣においても癌細胞周囲に線維化が生じ、脈管侵襲や神経周囲浸潤が顕著になることが挙げられ、微小環境が癌の悪性度に重要な役割を果たしている。

今回、胆道癌細胞株とヒト間葉系幹細胞の共培養モデルを用い、癌細胞の形態変化並びに癌細胞に起こる上皮間葉系転換を確認した。概日リズムを形成する時計遺伝子も微小環境下において癌細胞の時計遺伝子の発現が上昇することなどを明らかにし癌微小環境形成において重要な働きを担っていることを明らかにした。さらに微小環境下において抗腫瘍性・抗炎症性サイトカインと時計遺伝子の相互作用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道癌の初期浸潤病巣において時計遺伝子が関与することが示唆された。今後は間質や時計遺伝子を標的とする新たな胆道癌治療(時計遺伝子DEC阻害剤の開発と臨床応用研究など)への基礎的研究として発展できる可能性が期待できる。さらに、本研究が胆道癌の早期発見・治療へと繋がり胆道癌全体の予後改善へ礎を成したと考えられる。

研究成果の概要(英文)： The microenvironmental characteristics of biliary tract cancer include fibrosis around the cancer cells even in early infiltration lesions, vascular invasion and perineurial infiltration. The microenvironment plays an important role in cancer malignancy.

Here, using a co-culture model of biliary cancer cell lines and human mesenchymal stem cells, we confirmed morphological changes of cancer cells and epithelial-mesenchymal transformation (EMT) that occurs in cancer cells. The clock gene, which forms circadian rhythms, also shows that the expression of the clock gene of cancer cells is elevated under the microenvironment, and it has been shown to play an important role in the formation of the cancer microenvironment. Furthermore, under the microenvironment, the interaction between cytokines (e.g. anti-tumor cytokines anti-inflammatory cytokines) and clock genes was suggested.

研究分野：消化器内科

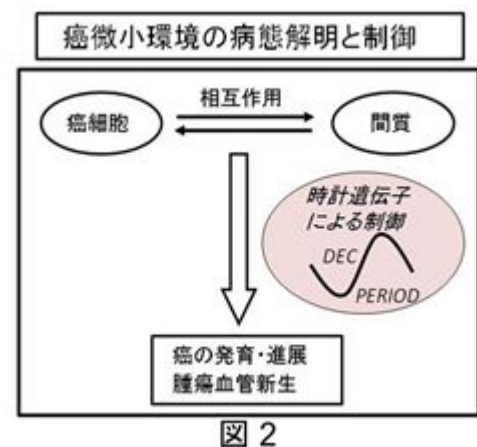
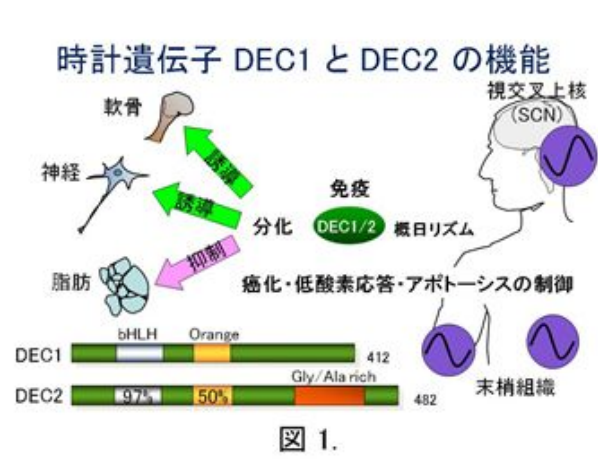
キーワード：早期胆道癌 初期浸潤病巣 時計遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

胆道癌は、いまだ予後不良の疾患である。初期の段階ではしばしば無症状であり、腫瘍マーカーも特異的なものはなく 早期診断は困難 である。しかし、早期症例での予後は決して悪くなく、いかに早期発見・早期治療を行うかが今後の課題 である。腫瘍の増殖・浸潤・転移といった生物学的特性は、腫瘍自体によって決定されるものではなく、腫瘍細胞のおかれた微小環境 (ニッチ) 下での間質細胞との相互作用が影響していると考えられている。他臓器の癌と比較し、胆道癌は初期浸潤病巣においても間質の線維化が認められることが病理学的特徴の一つである (J Hepatobiliary PancreatSci, 2014)。この間質の線維化は、SMA 陽性であり筋線維芽細胞の特徴を有し、癌関連線維芽細胞 (CAF: Cancr A ssociated F ibr o blast) として注目されている。この CAF は癌細胞の上皮間葉転換 (EMT: E pithelial M esenchymal T ransition) にも関与していることが明らかとなりつつある。従って、胆道癌の微小環境を考慮した発育進展制御の解析は、従来の癌細胞のみの細胞解析法に比べ、より生体と近い環境を反映していると考えられ、新たな癌増殖制御機構の構築に繋がると考えられる。胆道癌初期浸潤病巣を解析することは、早期胆道癌の解析の一助になる。一方、生物の生理機能・代謝・行動は、脳視床下部 視床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整されている。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解明するなど、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、DEC が概日リズム (生物時計) の調節に加え、EMT や血管新生・アポトーシス制御、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 (Int J Oncol 41: 1337 1346, 2012; Genes Cell 15: 315 325, 2010; genes Cells 13: 131 144, 2008) (図 1)。

以上の実績と背景をもとに、「胆道癌初期浸潤病巣では、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る」という仮説に基づき、個体レベルで証明することを研究目標とした。本研究は、現在早期発見が困難であり難治性癌の一つである胆道癌の悪性度を間質の影響を含めた、時計遺伝子の機能解析で明らかにしようとする点が特徴的な研究である (図 2)。



## 2. 研究の目的

本研究は、微小環境を考慮した胆道癌初期浸潤病巣の解析を行うことで、早期胆道癌の病態解析に繋げ、胆道癌における新たな癌増殖制御機構の構築を目指したものである。

胆道癌の微小環境特性として、初期浸潤病巣においても癌細胞周囲に線維化が生じ、脈管侵襲や神経周囲浸潤が顕著になることが挙げられる。癌細胞と周囲の間質の相互作用を含む微小環境が癌の悪性度に重要な役割を果たしている。これらの相互作用は概日リズムを形成する時計遺伝子 (bHLH (Basic-helix-loop-helix) 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により、胆道癌初期浸潤病巣における癌微小環境の病態解明と増殖抑制機構の構築を目標とする。

### 3 . 研究の方法

胆道癌初期浸潤病巣における微小環境形成は、時計遺伝子機能が基盤として形成されることを証明するため、以下の概要で時計遺伝子発現による癌微小環境の解明を試みた。

- (1) 胆道癌幹細胞の特性を評価するため、癌幹細胞分離・同定を行い、時計遺伝子発現と癌細胞の増殖能・浸潤能の相互作用を証明する。
- (2) 癌微小環境を形成するために、まずヒト間葉系幹細胞を癌関連線維芽細胞 (CAF) へ分化誘導を行う。その後、胆道癌細胞へ及ぼす影響を調べるため、CAF へ誘導されたヒト間葉系幹細胞と共培養し、間質線維化を伴う癌微小環境を誘導する。
- (3) 胆道癌細胞と CAF の共培養により、癌の悪性形質転換、時計遺伝子の発現を確認する。
- (4) リンパ管・血管を有する3次元培養組織モデルを作製し、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。さらに、時計遺伝子を過剰発現ないし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換への影響を検討する。
- (5) 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) 胆道癌細胞株とヒト間葉系幹細胞株との共培養モデルで、癌細胞の形態変化を確認した。さらに、免疫組織化学染色を施行し癌細胞の vimentin の発現上昇や E-cadherin の発現低下を確認した。これらは、上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transformation: EMT) と考えられる。
- (2) 胆道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 (DEC1, DEC2 など) を検討したところ、DEC の高発現を確認した。時計遺伝子の制御のもと、微小環境が形成されることが示唆された。
- (3) 癌微小環境下においても抗腫瘍性・抗炎症性サイトカインと時計遺伝子の相互作用が示唆された。

### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

1. Sasaki H, Morohashi S, Toba T, Seino H, Yoshizawa T, Hirai H, **Haga T**, Wu Y, Kijima H: Neovascularization of gastric submucosa-invasive adenocarcinoma. *Oncol Lett* 16:3895-3900, 2018.(査読あり)
2. Liu Q, Wu Y, Seino H, **Haga T**, Yoshizawa T, Morohashi S, Kijima H: Correlation between DEC1/DEC2 and epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer PC-3 cells. *Mol Med Rep* 18: 3859-3865, 2018. (査読あり)
3. Yoshizawa T, Morohashi S, Goto S, **Haga T**, Seino H, Wu Y, Hakamada K, and Kijima H: Jaundice as an Initial Manifestation of Pancreatic Dedifferentiated Liposarcoma. *BioMed Research Journal* 1: 12-17, 2018. (査読あり)
4. Liu Q, Wu Y, Seino H, Yoshizawa T, **Haga T**, Morohashi S, and Kijima H: DEC1 and

- DEC2 Regulate Apoptosis of Human Prostate Adenocarcinoma LNCap Cells. BioMed Research Journal 1: 6-11, 2018. (査読あり)
5. Nishishita R, Morohashi S, Seino H, Wu Y, Yoshizawa T, **Haga T**, Saito K, Hakamada K, Fukuda S, Kijima H: Expression of cancer-associated fibroblast markers in advanced colorectal cancer. Oncol Lett 15:6195-6202, 2018. (査読あり)
  6. Yoshizawa T, Ishido K, Saito K, **Haga T**, Seino H, Wu Y, Morohashi S, Hakamada K, Kijima H: Prognostic Impact of Extracapsular Lymph Node Invasion and Myofibroblastic Activity in Extrahepatic Bile Duct Cancer. Clin Med Insights Pathol 10, 2017. (査読あり)
  7. **Haga T**, Yoshizawa T, Morohashi S, Hirai H, Saito 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. 67: 28-38, 2016. (査読あり)
  8. Morohashi S, Morohashi H, Yoshizawa T, Tanaka M, Mikami T, Kagiya T, Saito T, Hirai H, **Haga T**, Wu Y, Hakamada K, and Kijima H: Morphological analysis of the residual rectal mucosa in 12 postoperative ulcerative colitis patients. Hirosaki Med. J. 67: 92-101, 2016. (査読あり)
  9. Takatsuna M, Morohashi S, Yoshizawa T, Hirai H, **Haga T**, Ota R, Saito K, Wu Y, Seino H, Aoyagi Y, Terai S, Kijima H: Myofibroblast distribution is associated with invasive growth types of colorectal cancer. Oncol Rep 36:3154-3160, 2016. (査読あり)
  10. 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 36: 1251-7, 2016. (査読あり)
  11. 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 37:77-84, 2016. (査読あり)
  12. 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 35:2592-8, 2016. (査読あり)
  13. 菊池英純, **羽賀敏博**, 三上達也, 宮澤邦昭, 澤谷学, 平賀寛人, 珍田大輔, 櫻庭裕丈, 下山克, 鬼島宏, 福田眞作: 3年の経過にて胃腺窩上皮化生を呈した十二指腸 Brunner腺過誤腫の1例. 胃と腸 53: 255-257, 2018. (査読あり)
  14. 清野浩子, 吉澤忠司, **羽賀敏博**, 諸橋聡子, 呉雲燕, 後藤慎太郎, 鬼島宏: 胆嚢癌の病理形態学的特徴と画像診断. 胆と膵 39: 201-210, 2018. (査読あり)
  15. **羽賀敏博**, 吉澤忠司, 後藤慎太郎, 呉雲燕, 清野浩子, 諸橋聡子, 福田眞作, 袴田健一, 鬼島宏: 十二指腸乳頭部の腫瘍性病変の病理. 胆と膵 38: 619-624, 2017. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。