

令和 2 年 8 月 26 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04057

研究課題名(和文)胆膵癌の高悪性度形質の制御機構解明と臨床への展開

研究課題名(英文) Pathophysiological modulation of high-grade malignant potentials of pancreato-biliary cancer, and its clinical application

研究代表者

鬼島 宏 (KIJIMA, Hiroshi)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：90204859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌・膵癌が高悪性度形質を示す微小環境特性は、早期浸潤病巣より癌細胞の上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)が生じ、線維化・脈管侵襲・神経浸潤を伴う顕著な浸潤性増殖と表現できる。癌細胞・間葉系細胞との単層共培養法では、間葉系幹細胞存在下における癌細胞の遊走能・浸潤能の特性が解析され、三次元培養法では、癌細胞の浸潤性増殖・リンパ管侵襲の形態学的特徴が解明された。画像解析技術を用いて癌間質に存在する癌関連線維芽細胞・幼若な線維化の存在が患者予後と相関するが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、癌細胞の上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)が癌の増殖・進展に重要であることが唱えられている。今回の研究で、胆道癌・膵癌が高悪性度形質を示す微小環境特性が、早期浸潤病巣より認められる癌細胞の上皮間葉転換によることが明らかとなった。特に、癌細胞と間葉系幹細胞との直接的な相互作用が、癌の高悪性度に関連していることが示された点は、高悪性度形質の制御に向けた大きな成果と言える。一方で、今後は、胆道癌・膵癌の高悪性度形質を制御し、患者予後を改善させるような臨床応用に向けた研究が求められる。

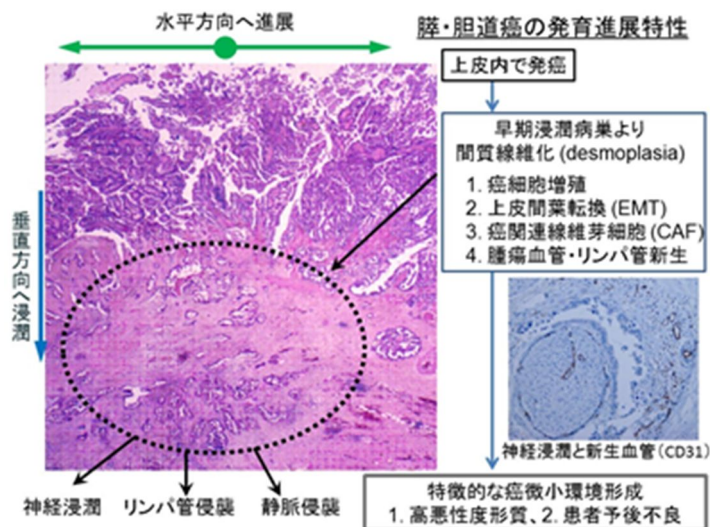
研究成果の概要(英文)： High-grade malignant potentials of pancreato-biliary cancer is characterized by the cancer microenvironment with rapid cancer cell growth, epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells, and lymphatic/venous/perineural invasion. In this study, we clarified several pathological properties of pancreato-biliary cancer cells as follows: (1) Co-culture assay demonstrated that the mesenchymal stem cells affected the aggressive migration/invasion abilities of cancer cells. (2) Three-dimensional culture study revealed characteristic steps of lymphatic invasion. (3) Image analysis showed immature fibrosis (desmoplasia) and cancer-associated fibroblasts (CAF) played important roles in patients' prognosis.

研究分野：病理学

キーワード：胆道癌 膵癌 上皮間葉転換 浸潤性増殖 癌微小環境 時計遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 胆道癌(特に、胆管癌・胆嚢癌)ならびに膵癌(その大部分を占める浸潤性膵管癌)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。我々はこれまでに、胆膵癌を中心にヒト癌における高悪性度形質の解析とその制御を遺伝子レベルで行い、実績を上げてきた(Nature Commun 2013; Cancer Cell 2002)。癌細胞の増殖や転移に関わる因子として、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)が関与する腫瘍血管新生の解析でも成果をあげてきた(Int J Oncol 2005)。
- (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、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は世界に先駆けた研究を行い、評価を受けている(Int J Mol Med 2006; Eur J Biochem 2004; Nature 2002)。さらに我々は、DECをはじめとする時計遺伝子産物がbHLH型転写因子として機能し、血管新生・アポトーシス制御や腫瘍細胞増殖などの病態との関連を報告し、実績を重ねている(Genes Cells 2010; Genes Cells 2008)。
- (3) 胆膵癌の発育進展には、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)。これは、早期浸潤病巣での間質線維化であり、癌細胞の上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)や癌関連線維芽細胞(CAF)の動員によって生じる。我々は、これまでの予備的研究から、bHLH型転写因子として機能するDEC遺伝子産物により、膵癌細胞の上皮間葉転換が惹起されることを証明している(Int J Oncol 2012)。



## 2. 研究の目的

前述の背景と実績に基づき、以下の2項目を証明することを目的とした。

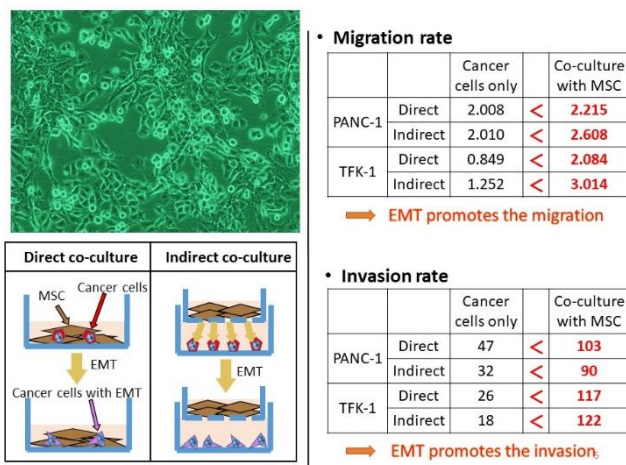
- (1) 高悪性度形質を呈する胆膵癌の微小環境特性は、早期浸潤病巣より癌細胞の上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)が生じ、線維化・脈管侵襲・神経浸潤を伴う顕著な浸潤性増殖にあること。
- (2) 胆膵癌の微小環境は、概日リズムを形成する時計遺伝子産物(bHLH型転写因子)の制御を基盤とした、癌幹細胞の分化・癌細胞増殖・腫瘍血管新生によって生じること。

## 3. 研究の方法

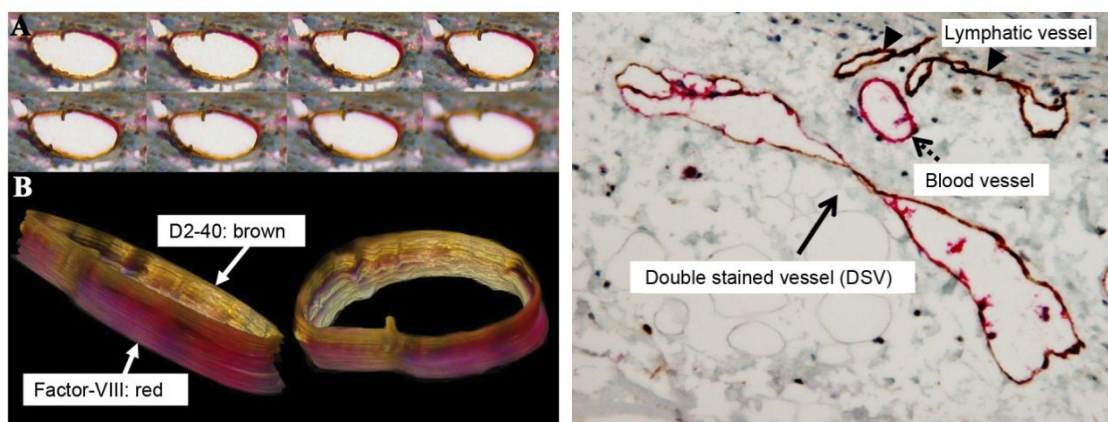
- (1) 癌細胞と間葉系幹細胞の共培養系におけるEMT誘導: ヒト膵癌(PANC-1)および胆道癌(TFK-1)培養細胞株を用いて、間葉系幹細胞(MSC)の有無と、癌細胞の遊走能・浸潤能をそれぞれscratch migration assay, Matrigel invasion assayにより検討した。
- (2) 癌微小環境における腫瘍血管新生: ヒト癌組織の内視鏡切除材料で、血管マーカー(factor VIII) / リンパ管マーカー(D2-40)を用いて、癌組織およびその周囲組織における脈管(血管・リンパ管)形成について検討した。
- (3) 癌微小環境における浸潤性増殖と線維化: ヒト膵癌組織の外科切除材料で、AZAN染色および線維筋細胞細胞マーカー(-SMA)を用いて、癌浸潤病巣における線維化の特性について検討した。

#### 4. 研究成果

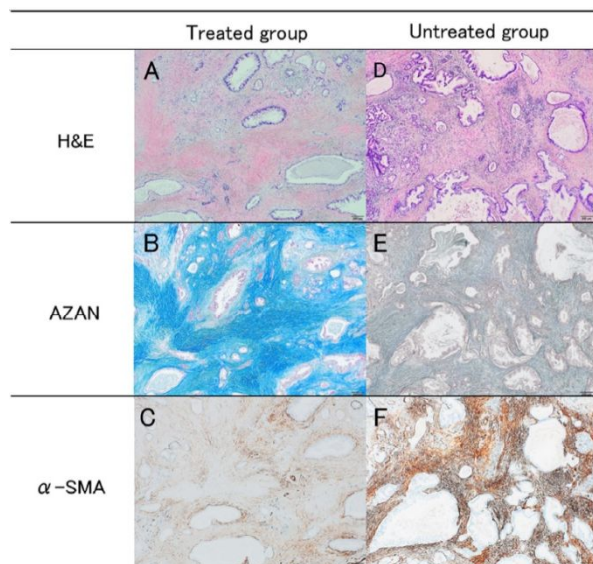
- (1) 癌細胞と間葉系幹細胞の共培養系における EMT 誘導: ヒト膵癌細胞 (PANC-1) では, 癌細胞単独に比べて, ヒト間葉系幹細胞 (MSC) を癌細胞と直接単層培地で共培養する場合 (直接共培養) でも, 2 層培地で間接的に共培養した場合 (間接共培養) でも, 癌細胞の移動能・浸潤能の増加を明らかにした。胆道癌細胞 (TFK-1) でも同様で, 被と間葉系幹細胞 (MSC) との直接共培養・間接共培養ともに, 癌細胞の移動能・浸潤能の増加を確認した。



- (2) 癌微小環境における腫瘍血管新生: ヒト癌微小環境において, 癌組織の周囲には, 非浸潤部・浸潤部を問わず, factor VIII-陽性の腫瘍血管 (静脈相当) が多数認められた。一方, 発育先進部に相当する浸潤病巣では, D2-40-陽性のリンパ管に加えて, factor VIII, D2-40 の両者が陽性の double stained vessel (DSV) (血管リンパ管) が形成され, 特徴的な癌微小環境が形成されていることを解明した。



- (3) 癌微小環境における浸潤性増殖と線維化: ヒト膵癌組織の外科切除材料で, 術前化学療法の施行例と非施行例を比較検討した。非施行例 AZAN 染色および線維筋細胞細胞マーカー (-SMA) を用いて, 癌浸潤病巣における線維化の特性について検討した。高悪性度形質を呈する膵管癌組織に相当する非施行例では, アニリン青染色性 (AZAN 染色) が低い膠原線維を含む線維性間質を有し, 多数の -SMA-陽性の筋線維芽細胞を密に含んでいた。一方, 相対的に悪性度が低下したと判断される施行例では, アニリン青染色性の高い密な膠原線維を含む線維性間質を有し, -SMA-陽性の筋線維芽細胞は疎に存在していたことを解明した



今回の研究成果として, 高悪性度形質を呈する胆膵癌の微小環境の本質に迫ることができた。一方で, 概日リズムを形成する時計遺伝子産物 (bHLH 型転写因子) との直接的な関連性については, 今後の課題となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 13件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Tadashi Yoshizawa, Toshihiro Haga, Shintaro Goto, Daisuke Kudo, Shinnosuke Yonaiyama, Shingo Sakuraba, Naoki Wajima, Satoko Morohashi, Kenichi Hakamada, Hiroshi Kijima. | 4. 巻<br>4               |
| 2. 論文標題<br>Polypoid Neuroendocrine Tumor G1 of Gallbladder.  | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>BioMed Res J   | 6. 最初と最後の頁<br>174-178   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Yuta Tsugeno, Tadashi Yoshizawa, Yunyan Wu, Shintaro Goto, Toshihiro Haga, Takahiro Suzuki, Hiroko Seino, Satoko Morohashi, Hiroshi Kijima.                              | 4. 巻<br>3               |
| 2. 論文標題<br>Type I Collagen Induces DEC Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Human Breast Cancer MCF-7 Cells.  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>BioMed Res J   | 6. 最初と最後の頁<br>125-131   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Shintaro Goto, keinosuke Ishido, Tadashi Yoshizawa, Toshihiro Haga, Satoko Morohashi, Yunyan Wu, Hiroko Seino, Kenichi Hakamada, Hiroshi Kijima.                         | 4. 巻<br>3               |
| 2. 論文標題<br>Histopathological Characteristics of Pancreatic Cancer Stroma Induced by Neoadjuvant Chemotherapy.  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>BioMed Res J   | 6. 最初と最後の頁<br>61-64     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Hanae Sasaki, Satoko Morohashi, Takahito Toba, Hiroko Seino, Tadashi Yoshizawa, Hideaki Hirai, Toshihiro haga, Yunyan Wu, Hiroshi Kijima.                                | 4. 巻<br>16              |
| 2. 論文標題<br>Neoangiogenesis of gastric submucosa?invasive adenocarcinoma  | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Oncology Letters   | 6. 最初と最後の頁<br>3895-3900 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3892/ol.2018.9116  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-               |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Tadashi Yoshizawa, Satoko Morohashi, Shintaro Goto, Toshihiro Haga, Hiroko Seino, Yunyan Wu, Kenichi Hakamada, Hiroshi Kijima | 4. 巻<br>2           |
| 2. 論文標題<br>Jaundice as an Initial Manifestation of Pancreatic Dedifferentiated Liposarcoma  | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>Biomed Res J  | 6. 最初と最後の頁<br>12-17 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-           |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Yunyan Wu, Hiroshi Kijima   | 4. 巻<br>2           |
| 2. 論文標題<br>BHLH Transcription Factors DEC1 and DEC2: From Structure to Various Diseases | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>Biomed Res J  | 6. 最初と最後の頁<br>28-33 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-           |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Liu Qiang, Imaizumi Tadaatsu, Kawaguchi Shogo, Aizawa Tomomi, Matsumiya Tomoh, Watanabe Shojiro, Tsugawa Koji, Yoshida Hidemi, Tsuruga Kazushi, Joh Kensuke, Kijima Hiroshi, Tanaka Hiroshi | 4. 巻<br>139           |
| 2. 論文標題<br>Toll-Like Receptor 3 Signaling Contributes to Regional Neutrophil Recruitment in Cultured Human Glomerular Endothelial Cells   | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Nephron   | 6. 最初と最後の頁<br>349-358 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1159/000489507   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-             |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Aruga N, Kijima H, Masuda R, Onozawa H, Yoshizawa T, Tanaka M, Inokuchi S, Iwazaki M.                           | 4. 巻<br>43         |
| 2. 論文標題<br>Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) is Correlated with Patient's Prognosis of Lung Squamous Cell Carcinoma | 5. 発行年<br>2018年    |
| 3. 雑誌名<br>Tokai J Exp Clin Med  | 6. 最初と最後の頁<br>5-13 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-          |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nishishita Rie, Morohashi Satoko, Seino Hiroko, Wu Yunyan, Yoshizawa Tadashi, Haga Toshihiro, Saito Kensuke, Hakamada Kenichi, Fukuda Shinsaku, Kijima Hiroshi | 4. 巻<br>15              |
| 2. 論文標題<br>Expression of cancer-associated fibroblast markers in advanced colorectal cancer  | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Oncology Letters   | 6. 最初と最後の頁<br>6195-6202 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3892/ol.2018.8097   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Okano K, Yoshizawa T, Miura T, Ishido K, Kudo D, Kimura N, Wakiya TI, Wu Y, Morohashi S, Hakamada K, Kijima H. | 4. 巻<br>8           |
| 2. 論文標題<br>Impact of the histological phenotype of extrahepatic bile duct carcinoma.                                     | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>Mol Clin Oncol.  | 6. 最初と最後の頁<br>54-60 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3892/mco.2017.1472.   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-           |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshizawa T, Ishido K, Saito K, Haga T, Seino H, Wu Y, Morohashi S, Hakamada K, Kijima H.                              | 4. 巻<br>10             |
| 2. 論文標題<br>Prognostic Impact of Extracapsular Lymph Node Invasion and Myofibroblastic Activity in Extrahepatic Bile Duct Cancer. | 5. 発行年<br>2017年        |
| 3. 雑誌名<br>Clin Med Insights Pathol.  | 6. 最初と最後の頁<br>557-652. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1177/1179555717729652.  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-              |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Liu Q, Wu Y, Seino H, Yoshizawa T, Haga T, Morohashi S, Kijima H.               | 4. 巻<br>1          |
| 2. 論文標題<br>DEC1 and DEC2 Regulate Apoptosis of Human Prostate Adenocarcinoma LNCap Cells. | 5. 発行年<br>2017年    |
| 3. 雑誌名<br>Biomed Res J.   | 6. 最初と最後の頁<br>6-11 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-          |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Murakami K, Wu Y, Imaizumi T, Aoki Y, Liu Q, Yan X, Seino H, Yoshizawa T, Morohashi S, Kato Y, Kijima H.        | 4. 巻<br>38            |
| 2. 論文標題<br>DEC1 promotes hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human hepatocellular carcinoma cells. | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>Biomed Res.   | 6. 最初と最後の頁<br>221-227 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2220/biomedres.38.221.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-             |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Sato H, Wu Y, Kato Y, Liu Q, Hirai H, Yoshizawa T, Morohashi S, Watanabe J, Kijima H.                 | 4. 巻<br>16          |
| 2. 論文標題<br>DEC2 expression antagonizes cisplatin-induced apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma. | 5. 発行年<br>2017年     |
| 3. 雑誌名<br>Mol Med Rep.  | 6. 最初と最後の頁<br>43-48 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3892/mmr.2017.6571.  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-           |

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hiroshi Kijima.   |
| 2. 発表標題<br>Functional analysis of clock gene products DEC1 and DEC2, as bHLH transcription factors.                      |
| 3. 学会等名<br>International Conference on Biomedical and Cancer Research. SciTech Biomed-Cancer Science 2019. (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shintaro Goto, Tadashi Yoshizawa, Hiroko Seino, Toshihiro Haga, Satoko Morohashi, Hiroshi Kijima.      |
| 2. 発表標題<br>Microenvironment of Pancreatic Cancer and Clinicopathological Significance.                            |
| 3. 学会等名<br>International Conference on Biomedical and Cancer Research. SciTech Biomed-Cancer Science 2019. (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shintaro Goto, Tadashi Yoshizawa, Kana Saito, Takuya Shimanaka, Hiroko Seino, Takanobu Akaishi, Toshihiro Haga, Satoko Morohashi, Hiroshi Kijima. |
| 2. 発表標題<br>Transrational study between pancreatic carcinoma stroma and clinical image.   |
| 3. 学会等名<br>Hirosaki Medical Science Forum 2019. (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shintaro Goto, Hiroko Seino, Tadashi Yoshizawa, Toshihiro Haga, Satoko Morohashi, Kenichi Hakamada, Hiroshi Kijima.    |
| 2. 発表標題<br>Correlations between contrast enhanced CT image and histopathological characteristics of the pancreatic cancer stroma. |
| 3. 学会等名<br>第16回日本病理学会カンファレンス.   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>齋藤佳南, 後藤慎太郎, 吉澤忠司, 羽賀敏博, 清野浩子, 諸橋聡子, 鬼島 宏. |
| 2. 発表標題<br>膵癌の造影CT画像と病理学的特性との関連解析.                    |
| 3. 学会等名<br>第108回日本病理学会総会.                             |
| 4. 発表年<br>2019年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>嶋中拓弥, 後藤慎太郎, 吉澤忠司, 羽賀敏博, 清野浩子, 諸橋聡子, 鬼島 宏. |
| 2. 発表標題<br>浸潤性膵管癌における癌間質の特性解析.                        |
| 3. 学会等名<br>第108回日本病理学会総会.                             |
| 4. 発表年<br>2019年                                       |



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

弘前大学大学院医学研究科病理生命科学講座  
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~patho2/>

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-------|--|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 後藤 慎太郎<br><br>(GOTO Shintaro)<br><br>(00826901)    | 弘前大学・医学研究科・助手<br><br><br>(11101) |    |
| 研究分担者 | 吉澤 忠司<br><br>(YOSHIZAWA Tadashi)<br><br>(70761071) | 弘前大学・医学研究科・助教<br><br><br>(11101) |    |
| 研究分担者 | 袴田 健一<br><br>(HAKAMADA Kenichi)<br><br>(30271802)  | 弘前大学・医学研究科・教授<br><br><br>(11101) |    |
| 研究分担者 | 呉 雲燕<br><br>(WU Yunyan)<br><br>(40636586)          | 弘前大学・医学研究科・助教<br><br><br>(11101) |    |
| 研究分担者 | 猪口 貞樹<br><br>(INOKUCHI Sadaki)<br><br>(60160008)   | 東海大学・医学部・教授<br><br><br>(32644)   |    |