

令和 3 年 4 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08640

研究課題名(和文)胆道癌にて高頻度に同定されたGCF2遺伝子変異がもたらす転移形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation the mechanism of metastasis caused by GCF2 gene mutasion in bile duct cancer

研究代表者

深瀬 耕二 (fukase, koji)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00578677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では胆嚢癌の間質が誘導する転移能についての評価を行った。胆嚢癌手術検体からCAFを、正常組織から線維芽細胞(NF)を樹立し、移動能への影響を評価した。CAFではNFに比べ移動能が亢進し、そのConditioned Mediumが胆嚢癌細胞株の移動浸潤能を亢進した。網羅的遺伝子発現解析でTenascin-C (TNC)とPodoplanin (PDPN)が移動能亢進に寄与することが明らかとなった。胆嚢癌切除検体の免疫染色でTNC、PDPN高発現例では有意に無再発生存期間と全生存期間が不良であった。胆嚢癌でTNCやPDPNを発現するCAFが存在しこれらは癌の進行に促進的に働くことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により胆嚢癌のCAFを介した癌転移誘導メカニズムについて明らかになった。胆嚢癌は極めて予後不良な疾患であり、その原因として高い浸潤・転移能を有するといった特徴に加え、使用可能な抗癌剤の種類が乏しいことが挙げられる。本研究によってCAFを介した転移メカニズムの一つが解明され、転移形成を克服する上での新たな概念が提唱されたとともに、TNCとPDPNという抗癌剤治療の新規ターゲット因子の同定にもつなげることが可能となった。今後はCAFを介した転移メカニズムについての検討を行うとともに、TNCやPDPNといった新たな因子を標的とした治療法を開発することで、胆嚢癌の予後改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the metastatic potential induced by the cancer associated factor (CAF) of gallbladder cancer. CAF was established from surgical specimens of gallbladder cancer and fibroblasts (NF) were established from normal gallbladder tissue and their effects on mobility were evaluated. The mobility was enhanced in specific CAFs compared to NFs. It was shown that the Conditioned Medium (CM) from CAFs enhances the migration and invasion activity of gallbladder cancer cell lines. Microarray analysis revealed that Tenascin-C (TNC) and Podoplanin (PDPN) contribute to promote cell morbidity. Immunostaining showed that the recurrence-free survival and the overall survival were significantly poor in the cases with high expression of TNC and PDPN. From the above, it was shown that there are CAFs that express TNC and PDPN in gallbladder cancer and that they promote the progression of cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：胆嚢癌 CAF

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は消化器癌の転移・浸潤能に深く関与していることが示された GCF2 における遺伝子変異解析を行うことで、癌転移メカニズムを解明し、新規分子標的治療薬のターゲットとしての可能性を立証することにある。平成 30 年度及び令和元年度において胆道癌における GCF2 の役割に注目し研究を行った。研究は胆道癌における変異解析を行うとともに、これまでなされていなかった胆道癌における GCF2 の機能解析を施行することとした。しかしながら、機能解析については、これまでのところ胆管癌細胞株では期待される結果が得られず、研究計画に変更の必要性が生じた。

本研究では機能解析のために胆道癌症例の臨床検体を集積していたが、その過程において、胆嚢癌の間質成分が癌の転移・浸潤に関与する可能性があることに着目し、間質からの転移能についての評価を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は胆嚢癌における CAF の性質を評価するとともに、癌の転移形成能に及ぼす影響について明らかにすることにある。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

2018 年 5 月から 2020 年 8 月の期間に、東北大学病院総合外科で切除術を行った胆嚢癌手術症例および、胆嚢以外の疾患において胆嚢を合併切除により摘出した症例の切除標本から、線維芽細胞の初代培養を行った。胆嚢癌標本より得られた線維芽細胞を CAF とし、正常胆嚢から得られた線維芽細胞を NF とし、実験のコントロールとして用いた。

線維芽細胞の分離に当たっては、まず切除標本から癌組織または正常胆嚢壁を採取し、PBS にて洗浄した。これを 2mm 程度の大きさに細切したものを培養ディッシュに移し初代培養を行った。ヒト胆嚢癌細胞株は OUCG1、TGBC2TKB を使用した。

### (2) 条件培地(Conditioned medium: CM)の調製

初代培養を行った NF と CAF において、それぞれの細胞より条件培地(conditioned medium: CM)を作成した。CM の調製にあたっては、NF または CAFDMEM 培地にて培養し、3 日後にこの培地の上清を回収し、シリンジフィルターを用いて細胞成分を除去したものとした。CM は実験に使用するまで -80℃ で凍結保存した。

### (3) CAF の細胞遊走試験

初代培養にて得られた CAF および NF の移動能を 8.0 μm Transparent PET membrane を用いた migration assay により測定した。チャンバーの下層には 10%FBS を含む DMEM を加え、上層には FBS を含まない DMEM 500 μL に 1.5 × 10<sup>4</sup> 個の CAF もしくは NF を懸濁した細胞溶液を加えた。16 時間培養した後にチャンバーを取り出し、Diff-Quick を用いて membrane 下層に付着する細胞の固定・染色を行い光学顕微鏡を用いて撮影した。撮影した画像は解析ソフトを用いて細胞数をカウントした。

### (4) CM を用いた細胞増殖試験

MTS 試験により細胞増殖能を評価した。96 ウェルプレートに胆嚢癌細胞株の OUCG1 と TGBC2TKB をそれぞれ播種し、24 時間培養した。培養液を吸引除去した後、CM に 2%FBS を添加した溶液 100 μL/well を加え、96 時間培養した。細胞数の評価には、CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent を用い 1 時間反応させたのちに 490nm の吸光度を測定した。NF の平均吸光度に対する相対吸光度を増殖能として評価した。

### (5) CM を用いた胆嚢癌細胞株の創傷治癒試験

Scratch assay により細胞遊走試験を行った。6 ウェルプレートに OUCG1 と TGBC2TKB を播種し、90%以上の細胞密度になったことを確認した後、スクラッチ後に培地を CM に変更し、OUCG1 では 20 時間、TGBC2TKB では 8 時間培養した後、同一箇所の間隙の面積を同様に測定した。細胞遊走能を以下の通り算出した。細胞遊走率 = 1 - (24 時間培養後の間隙の面積 / CM で培養する前の間隙の面積)

### (6) CM を用いた胆嚢癌細胞株の浸潤試験

マトリゲルインベーションチャンバーを用いた invasion assay を行った。チャンバーの下層には CM に FBS10%を添加した培養液を加え、上層には OUCG1、TGBC2TKB を懸濁した FBS を含まない DMEM 溶液 500 μL を加えた。OUCG1 では 40 時間後に、TGBC2TKB では 20 時間後にチャンバーを取り出し、membrane 上層に残る細胞を除去し、測定を行った。

### (7) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

線維芽細胞の網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイにて行った。2~5 継代のサンプルより RNA の抽出を行い、GeneChip WT PLUS Reagent Kit を用いてマイクロアレイを行った。Gene chip は Clariom™ S Array, human (Product Number 902917, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いた。解析ソフト Transcriptome Analysis Console 4.0(TAC4.0)(Thermo Fisher Scientific,

MA, USA)を用いて結果の解析を行った。

#### (8) RT-PCRによる遺伝子発現解析

各サンプルより RNA の抽出を行い, PrimeScript™ RT Master Mix (Product Number RR036, Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した。RT-PCR は Step One Plus Real Time PCR System と TB Green® Premix Ex Taq™ II, ROX plus を用いて行った。反応条件は 95 30 秒、95 5 秒、60 30 秒を 1 サイクルとして 45 サイクル行い、2- Ct 法で算出した。内在性コントロールには GAPDH を用いた。

#### (9) 免疫組織化学と臨床予後の解析

当施設で 2005 年から 2019 年までに胆嚢癌に対して手術を行い、標本を摘出した症例について、Tenascin-C と Podoplanin について病理組織標本の免疫組織化学染色を行った。

染色強度解析方法は、HistoQuest を用いて行った。各症例の染色スライドを光学顕微鏡を用い対物 20 倍レンズで代表的な 1 視野を撮影し、このうち間質を含む 0.02mm<sup>2</sup> の関心領域 (Region of Interest: ROI) を定めた。色調を基準に陽性部位を判定し ROI における陽性信号値の総和を計測し、これを陽性強度とした。

患者因子としては、性別、年齢、進行度、T 因子、N 因子、間質量、浸潤様式、脈管侵襲、神経侵襲、再発様式についてカルテ情報を収集し、TNC および PDPN の発現状態との比較を行った。また、予後の解析においては、TNC および PDPN の陽性群と陰性群に分けて再発・生存をイベントとした Kaplan-Meier 曲線を作成し無再発生存期間・全生存期間を解析した。

#### (10) 統計学的解析

データは平均 ± 標準誤差として表した。各実験はそれぞれ 3 回ずつ行った。実験データの比較検定は以下のごとく行った。NF 群全体と CAF 群全体の比較は Welch の t 検定を行った。コントロールに対する各サンプルの比較は Dunnett の検定にて行った。相関関係の解析には Pearson の相関係数を用いて行った。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて作成し、log-rank 検定にて有意差を検討した。免疫組織化学の判定と患者背景におけるサブグループ解析は Fisher の正確検定を用いて解析した。統計解析は JMP pro 14(SAS Institute Inc., NC, USA)を用いて行い、p 値 < 0.05 を統計学的に有意とした。

## 4. 研究成果

### (1) 癌関連線維芽細胞と正常線維芽細胞の初代培養

2018 年 5 月から 2020 年 8 月内に切除を施行した 11 例の胆嚢癌手術症例のうち 10 症例から CAF を樹立した。うち 2 例は凍結保存の培養ができなかったため、CM のみの採取となった。また正常胆嚢は、樹立を試みた 4 例全てから NF の樹立に成功した。

線維芽細胞のマーカーとして SMA の遺伝子発現を RT-PCR にて定量し、胆嚢癌細胞株ではその発現をほとんど認めなかった一方で、線維芽細胞である NF、CAF では発現が確認された。

### (2) CAF 及び NF の細胞遊走試験

線維芽細胞の細胞遊走能の比較のため transwell migration assay を施行した。全ての NF と及び大部分の CAF において membrane 下層への遊走がほとんど見られなかったが、CAF2 と CAF11 においては多くの細胞が membrane 下層へ遊走していた。NF 群全体と CAF 群全体の比較では CAF 群で有意に遊走能が亢進していた(NF 群 vs CAF 群,  $p < 0.05$ )。NF 群とそれぞれの CAF を比較すると、CAF2、11 は NF 群と比較し有意に遊走細胞数が増加していた( \*\* $p < 0.01$ )。

### (3) CM が胆嚢癌細胞株の細胞増殖能に及ぼす影響の検討

MTS assay により、CAF および NF から採取した CM を胆嚢癌細胞株に用いて、細胞増殖能に及ぼす影響を検討した。それぞれの CM で OCUG1 を 96 時間培養した際の増殖は、NF-CM 群全体と CAF-CM 群全体の比較では有意差を認めなかった(NF 群 vs CAF 群,  $p = 0.83$ )。NF-CM 群とそれぞれの CAF-CM を 1 つずつ比較検討したが、いずれの CAF-CM においても有意差を認めなかった。

一方 TGBC2TKB を用いた検討であり、それぞれの CM で 96 時間培養した際の増殖は、NF-CM 群と CAF-CM 群との比較では CAF-CM 群で有意に増殖能が亢進していた(NF-CM 群 vs CAF-CM 群,  $p < 0.01$ )。NF-CM 群とそれぞれ個別の CAF-CM を比較すると、CAF10-CM は NF-CM 群と比較し有意に TGBC2TKB の増殖を亢進した( $p < 0.01$ )。それ以外の CAF-CM では増殖能に有意な差を認めなかった。

### (4) CM が胆嚢癌細胞株の細胞遊走能に及ぼす影響の検討

Scratch assay により、それぞれの CM が胆嚢癌細胞株の細胞遊走能に及ぼす影響を検討した。OCUG1 で実験を行った結果では、NF-CM 群と CAF-CM 群を比較したところ、CAF-CM 群では有意に癌細胞の遊走能を亢進することが示された(NF-CM 群 vs CAF-CM 群,  $p < 0.05$ )。CAF の中でも症例により CM が癌細胞遊走に及ぼす影響にはばらつきがみられた。NF-CM 群とそれぞれの CAF-CM を個別に比較すると、CAF2、6、8、9、11 の CM は NF-CM 群と比較し有意に OCUG1 の遊走を亢進した。

TGBC2TKB で実験を行った結果では、CAF-CM 群は NF-CM 群に比べ有意に癌細胞遊走を亢進する事が示された(NF-CM 群 vs CAF-CM 群:  $p < 0.01$ )。OCUG1 の結果と同様に、CAF の中でも症例によりばらつきがみられ、CAF2、4、6、7、8、9、10、11 の CM では NF-CM 群と比較し有意に TGBC2TKB の遊走を亢進した。

### (5) CM が胆嚢癌細胞株の浸潤能に及ぼす影響の検討

上述の遊走能試験の結果から癌細胞遊走作用の亢進が大きい CAF2、11 の CM と、コントロー

ルとして NF1-CM を対象とし、Matrigel invasion assay により、それぞれの CM が胆嚢癌細胞株の浸潤能に及ぼす影響を検討した。OCUG1 で実験を行った結果では、CAF2、11 の CM は NF1-CM と比較しどちらも有意に OCUG1 の浸潤を亢進した。TGBC2TKB で実験を行った結果でも同様に、CAF2、11 の CM は NF1-CM と比較しどちらも有意に TGBC2TKB の浸潤を亢進した。

#### (6) CAF における遺伝子発現の網羅的解析

CAF における遺伝子発現を網羅的に解析するため、NF1、CAF1、CAF2 を対象として、マイクロアレイを行った。NF と性質の近い CAF として CAF1 を、NF と性質の異なる CAF として CAF2 を対象として選択した。

CAF における発現遺伝子のクラスタリング解析を行った。NF1、CAF1、CAF2 における遺伝子発現において F 検定で  $p < 0.01$  であった 4813 の遺伝子を対象として TAC4.0 でヒートマップを作製した。各サンプルの発現パターンは類似しているものの特に CAF1 と NF1 は発現パターンがより近い群として分類され、CAF2 は両群より離れていた。以上より CAF2 は NF1 および CAF1 と比較し遺伝子の発現パターンが異なっていることが示された。

続いて、機能解析の結果に影響を及ぼす候補遺伝子の抽出を行った。まず過去の報告から CAF のマーカーとして知られている 15 個の遺伝子をリストアップした。続いて CAF2 において NF1 よりも 5 倍以上の発現を認めた 225 個の遺伝子のうち、細胞遊走に関連する遺伝子を検索したところ 16 個 (が) 同定された。これら 15 個の CAF マーカーと 16 個の遊走関連遺伝子に共通する遺伝子として、Tenascin-C (TNC) と Podoplanin (PDPN) が同定された。この 2 つの遺伝子を本研究における検討遺伝子とした。

#### (7) RT-PCR による遺伝子発現解析

上述の結果から候補遺伝子として挙げた TNC と PDPN について、RT-PCR を行い CAF および NF における発現量を検討した。

TNC の発現量に関して、NF 群全体と CAF 群全体を比較すると発現量に有意差を認めなかった。NF 群と各 CAF の発現量を比較すると、CAF2、8、10、11 は NF 群と比較し有意に高い発現を示した。NF 群と胆嚢癌細胞株の発現量を比較すると、TGBC2TKB は NF 群に比べ有意に高い発現を示した。

PDPN の発現量に関しては、NF 群全体と CAF 群全体を比較するも発現量に有意差を認めなかった。NF 群と各 CAF それぞれの発現量を比較すると、CAF2、11 は NF 群と比較し有意に高い発現を示した。NF 群と各胆嚢癌細胞株の発現量を比較すると、OCUG1、TGBC2TKB は有意に PDPN の発現が低下していた。

#### (8) 免疫組織化学の結果と臨床予後の解析

当院で 2005 年から 2019 年までに胆嚢癌に対して手術を行い、標本を摘出した症例のうち周術期死亡例を除いた 56 症例を対象として、TNC、PDPN の間質における発現と臨床経過との解析を行った。

全生存期間 12 カ月以下をイベントとした Receiver Operator Characteristic (ROC) 曲線を TNC と PDPN についてそれぞれ作成しカットオフ値を決定した。カットオフ値未満の陽性強度を示す症例を低発現群、カットオフ値以上の陽性強度を示す症例を高発現群とした。TNC、PDPN のそれぞれについて各群での再発・死亡をイベントとした Kaplan-Meier 曲線を作成し無再発生存期間・全生存期間を解析した。

TNC 高発現群の無再発生存期間 (Disease Free Survival: DFS) と全生存期間 (Overall Survival: OS) は、低発現群と比較し有意に短いことが示された (DFS:  $p < 0.01$ 、OS:  $p < 0.01$ )。高発現群の 5 年無再発率は 0.28、陰性群では 0.66 であり、5 年全生存率は高発現群で 0.25、低発現群で 0.59 であった。サブグループ解析では pathological TNM Stage と ne (神経侵襲) に有意差を認め、陽性群では癌がより進行している結果が示された (TNM;  $p < 0.05$ , ne;  $p < 0.05$ )。

PDPN 高発現群においても、DFS と OS は低発現群と比較し有意に短いことが示された (DFS:  $p < 0.01$ 、OS:  $p < 0.01$ )。5 年無再発率は高発現群で 0.40、低発現群では 0.85 であり、5 年全生存率は高発現群で 0.34、低発現群で 0.81 であった。サブグループ解析では、TNM Stage、T 因子、INF (浸潤様式)、遠隔再発において PDPN の発現が高くなるほど有意に増悪することが示された (TNM Stage、T 因子、遠隔再発:  $p < 0.01$ 、INF:  $p < 0.05$ )。

## 考察

本研究では胆嚢癌における CAF の性質や、癌細胞との相互作用メカニズムについて解明するため、CAF と NF の初代培養細胞を用いた機能解析、遺伝子発現解析を行った。また、この結果から胆嚢癌における CAF が癌の進展に関与していることを示し、その原因遺伝子の候補として TNC、PDPN を同定し、その発現が臨床予後と関係していることを明らかにした。本研究結果から、CAF が CM を介して、また CAF-led invasion の機序を介して胆嚢癌の移動・浸潤に促進的に働くことが示され、その機序に関わる候補蛋白として同定された TNC と PDPN が予後に大きくかわることが示された。以上から胆嚢癌の CAF の機序の一つとして CAF-led invasion を考えているが、直接 CAF と癌細胞を共培養した実験を行っておらず、その浸潤様式については検証の余地がある。また in vivo での実験において CAF が胆嚢癌の進行に影響を与えるか実証することで、胆嚢癌における CAF の意義がより明確なものとなることが期待され、今後の課題になるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 | 有明 恭平<br><br>(ariake kyohei)<br><br>(10754921)      | 東北大学・大学病院・助教<br><br><br>(11301)          |    |
| 研究分担者 | 大塚 英郎<br><br>(ohtsuka hideo)<br><br>(50451563)      | 東北大学・大学病院・講師<br><br><br>(11301)          |    |
| 研究分担者 | 高館 達之<br><br>(takadate tatsuyuki)<br><br>(50772216) | 東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教<br><br><br>(11301) |    |
| 研究分担者 | 海野 倫明<br><br>(unno michiaki)<br><br>(70282043)      | 東北大学・医学系研究科・教授<br><br><br>(11301)        |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |