

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08709

研究課題名(和文) 肝内胆管癌におけるCXCL12の肝転移促進機序の解明と革新的治療開発への基盤研究

研究課題名(英文) The mechanism of promoting liver metastasis caused by CXCL12 and fundamental research for innovative therapeutic development in intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

増田 稔郎 (MASUDA, Tosirou)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：50551256

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)：肝内胆管癌 (ICC)は肝癌の約5 - 10%を占めており、肝切除後も高率に再発をきたす予後不良な癌の一つである。本研究は、ICCにおける転移・再発のメカニズムを解明し、新規治療ターゲットを見出すことを目的とした。我々は、原発巣及び転移巣の切除標本をcDNAマイクロアレイ及び免疫化学組織染色で評価し、CXCL12が原発巣に比べ肝転移巣で有意に高発現していること、CXCL12高発現症例は肝切除後予後が有意に不良であることを示した。また、ヒト胆管癌細胞株のCXCL12抑制により、浸潤能及び遊走能が抑制されることを示し、CXCL12がICCにおける治療ターゲットになりうる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝内胆管癌 (ICC)は肝癌の約5 - 10%を占めており、肝切除後も高率に再発をきたす予後不良な癌の一つです。我々は、ケモカインCXCL12が転移巣の切除標本で有意に高発現すること、肝切除後の予後に関与していること、ヒト胆管癌細胞株におけるCXCL12抑制による浸潤能及び遊走能が抑制効果を示し、CXCL12がICCにおける治療ターゲットになりうる可能性を示しました。

研究成果の概要(英文)：Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) accounts for about 5-10% of primary liver cancers in Japan and is one of the poorest prognostic cancers with a high rate of recurrence after curative hepatic resection. The aim of this study was to elucidate the mechanism of metastasis and recurrence in ICC and to identify novel therapeutic targets. We evaluated resected specimens of primary and metastatic ICCs by cDNA microarray and immunohistochemical staining, and showed that CXCL12, which is one of chemokines, was significantly upregulated in liver metastases compared to primary tumors, and that the prognosis after liver resection was significantly worse in patients with high CXCL12 expression. In addition, we also showed that CXCL12 suppression in human cholangiocarcinoma cell lines suppressed their invasive and migratory potential, indicating that CXCL12 may be a potential therapeutic target in ICC.

研究分野：消化器外科、肝癌

キーワード：肝内胆管癌 CXCL12 転移 cDNAマイクロアレイ 免疫化学組織染色

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝胆膵系の癌は消化器癌の中でも依然として予後不良であり、外科的切除が唯一の根治的治療である。化学療法や分子標的治療、放射線治療を含め目覚ましい発展を遂げてはいるが、まだ十分満足する結果は得られておらず、新しい治療法の開発は急務である。肝内胆管癌 (ICC) を含む肝臓癌は、本邦において、男性の癌死亡数の第 4 位 (8%)、女性の癌死亡数の 6 位 (6%) を占めている。今回我々は、肝癌の中でも特に予後不良である ICC に焦点をあてることとした。ICC は原発性肝癌の約 5-10% を占めており、根治的切除後も高率に再発をきたす予後不良の癌の一つである。化学療法、放射線治療にも抵抗性を示し、集学的治療による治療をもってしても、その 5 年生存率は 20% に満たない。また、ICC は根治的肝切除後も高率に再発する (5 年無再発生存率は約 20%)。したがって、ICC の予後改善のためには、根治的肝切除のみでは不十分であり、いかに転移・再発を予測し、これを予防できるかが重要である。しかしながら、ICC における再発、転移機序は未だ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

我々は本研究において、ICC における転移・再発のメカニズムを解明するため、ICC の転移・再発に関する治療ターゲットを臨床サンプルより見出し、その転移に関連する蛋白の分子メカニズムを検証することを目的とした。

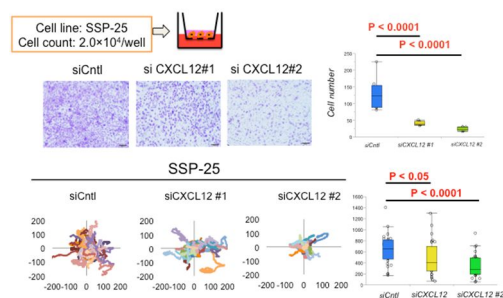
### 3. 研究の方法

ICC は稀な肝原発の悪性腫瘍であることに加え、再発時には切除不能であることも多く、再発巣の切除サンプルとのペアでサンプルを有することは極めてまれである。そうした背景下で、本研究は、切除したヒト ICC の原発巣及び転移巣のペアの凍結サンプルから RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイによりその遺伝子発現を検討し、その発現の差から転移・再発と関連の高い遺伝子群を抽出することとした。抽出した遺伝子は免疫化学組織染色により評価し、臨床病理学的背景・肝切除後予後との関連を評価した。さらに、抽出した遺伝子の ICC の転移における分子メカニズムを *in vitro* 及び *in vivo* で検討した。

### 4. 研究成果

(1) 凍結切除標本症例の原発巣及び転移巣 (肝) のペア (n=3) を用いた cDNA マイクロアレイおよび原発巣及び転移巣 (肝) のペアのホルマリン固定パラフィン包埋切片による免疫組織化学染色により、CXCL12 の発現が原発巣に比べ肝転移巣で有意に高発現することを確認した。次に CXCL12 の癌浸潤のメカニズムを検討するため、ヒト胆管癌細胞株 (Huh-28, SSP-25) を用いて siRNA による CXCL12 抑制下で浸潤能及び遊走能の実験を行った。浸潤能の検証では、常温に戻した Corning & reg; BioCoat™ マトリゲルインペジョンチャンパーを細胞株の培養液で中和した後、SSP-25 を 2000 個、HuH-28 を 3000 個、インサート内にそれぞれセットした (siControl, siRNA1 及び siRNA2 の各細胞株 n=3)。CO<sub>2</sub> インキュベーターで 48 時間保温した後、インサートを回収した。インサートのメンブレンを固定・乾燥させ、顕微鏡 100 倍率で 3 視野の細胞数を目視にて count した。両細胞株共に、control 群に比べて CXCL12 抑制株において有意に浸潤細胞の減少を認めた (SSP-25; p<0.0001, HuH-28; p<0.0001)。次に遊走能の検証として、siRNA を transfection した SSP-25 及び HuH-28 をそれぞれ 6 well dish にまき、オールインワン顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて 5 分毎 24 時間、細胞の遊走を観察した。両細胞株それぞれ 20 個の細胞の遊走状況を time-lapse tracking system (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて計測し解析した。両 ICC 株共に、control 群に比べて CXCL12 抑制株において有意な遊走距離の減少を認めた (SSP-25; p<0.0001, HuH-28; p<0.0001)。これらの結果より、CXCL12 抑制による ICC の浸潤能及び遊走能抑制効果を確認できた (図 1)。

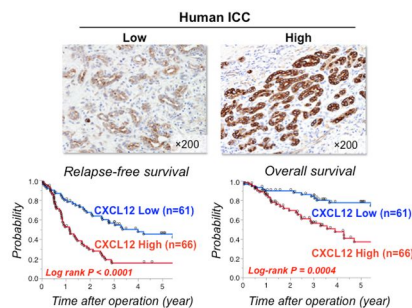
図 1 Invasion and migration assay



(2) ICC 切除原発巣 127 例を用いて、ICC における CXCL12 発現と臨床病理学的因子、肝切除後予後との関連を評価した。CXCL12 の発現は免疫化学組織染色にて評価し、蛋白発現の強度及び範囲によって定量化し、score の中央値で 2 群に分けた。CXCL12 高発現症例では肝切除後、有意に予後不良 (無再発生存率: Log-rank p<0.0001、全生存期間: Log-rank p =0.0004) であった (図 2)。加えて、臨床病理学的因子を CXCL12 の低発現及

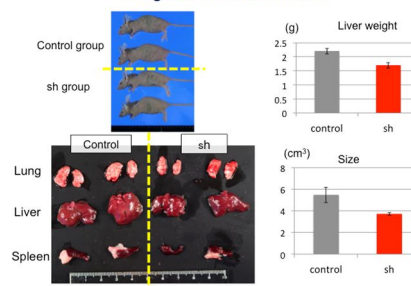
び高発現にわけ評価をしたところ、CXCL12 高発現群では有意にリンパ節転移 ( $p=0.018$ )、脈管侵襲が高く( $p=0.047$ )、CA19-9 も有意に高値であった( $p=0.004$ )。さらに、肝転移も有意に増加する(低発現群:24.6%、高発現群:53%,  $p = 0.0012$ )ことがわかった。これらの結果はCXCL12が転移浸潤を促進するという、初年度に得られた *in vitro* の結果をサポートする data と考えられた。すなわち、CXCL12 が ICC の悪性度を示唆するバイオマーカーであり、治療ターゲットにもなり得る可能性が human sample においても示唆された。また、CXCL12 の受容体である、CXCR4 及び CXCR 7 の発現についても、CXCL12 同様、定量化し評価した。CXCR4 の発現による 2 群間において予後との関連は認めなかったが(RFS: Log-rank  $p=0.301$ , OS: Log-rank  $p=0.425$ )、CXCR 7 高発現群では有意に RFS が不良であった (RFS: Log-rank  $p=0.010$ , OS: Log-rank  $p=0.920$ )。

図 2 Prognosis according to CXCL12 expression



(3) 次に、*vivo* モデルにおける CXCL12 の機能を評価した。CXCL12 を抑制した ICC 細胞株の生体内の動向を、免疫不全マウス (BALB/c Nude) を用いて検証した。具体的には、CXCL12 のヒト shRNA を組み込んだレンチウイルス粒子を SSP-25 に transfection し、CXCL12 を低発現する ICC 安定株 (4 株) を作成した。作成した安定株を免疫不全マウスの脾臓に直接投与する肝転移モデルを用いて、細胞株接種後 4~6 週後の肝における ICC 株の転移巣形成能を sh control 群と比較した (図 3)。しかしながら、ICC 細胞株自体の肝内転移巣を確認することはできなかつたため、より免疫不全マウスに生着しやすい ICC 細胞株の選択や手技、転移モデルのさらなる検討が必要である。

図 3 Evaluation of metastasis ability using liver metastasis model



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Ogawa Katsuhiko, Nitta Hidetoshi, Masuda Toshiro, Matsumoto Katsutaka, Okino Tetsuya, Miyamoto Yuji, Baba Hideo, Takamori Hiroshi   | 4. 巻<br>8                 |
| 2. 論文標題<br>Efficacy of delayed primary closure with intrawound continuous negative pressure and irrigation treatment after surgery for colorectal perforation   | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Acute Medicine & Surgery  | 6. 最初と最後の頁<br>-           |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/ams2.633   | 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>Ogawa K, Shiraishi Y, Maruno M, Shimizu K, Karashima R, Nitta H, Masuda T, Matsumoto K, Ikuta Y, Okino T, Takamori H.   | 4. 巻<br>47(1)             |
| 2. 論文標題<br>Perforated Marginal Ulcer after Subtotal Stomach Preserving Pancreaticoduodenectomy-Report of Five Cases.  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Gan To Kagaku Ryoho   | 6. 最初と最後の頁<br>156-158     |
| 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>Maeda Shimpei, Moore Alexandra M., Yohanathan Lavanya, Hata Tatsuo, Truty Mark J., Smoot Rory L., Cleary Sean P., Nagorney David M., Grotz Travis E., Park Eugene J., Girgis Mark D., Reber Howard A., Motoi Fuyuhiko, Masuda Toshiro, Unno Michiaki, Kendrick Michael L., Donahue Timothy R. | 4. 巻<br>167               |
| 2. 論文標題<br>Impact of resection margin status on survival in pancreatic cancer patients after neoadjuvant treatment and pancreatoduodenectomy  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Surgery   | 6. 最初と最後の頁<br>803 ~ 811   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.surg.2019.12.008   | 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>該当する              |
| 1. 著者名<br>Miyata Tatsunori, Yamashita Yo Ichi, Yoshizumi Tomoharu, Shiraishi Masayuki, Ohta Masayuki, Eguchi Susumu, Aishima Shinichi, Fujioka Hikaru, Baba Hideo   | 4. 巻<br>110               |
| 2. 論文標題<br>CXCL 12 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma is associated with metastasis and poor prognosis   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science  | 6. 最初と最後の頁<br>3197 ~ 3203 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/cas.14151  | 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>Nakao Y, Yamashita YI, Arima K, Miyata T, Itoyama R, Yusa T, et al.  | 4. 巻<br>39(5)             |
| 2. 論文標題<br>Clinical Usefulness of Perioperative C-reactive Protein/Albumin Ratio in Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Retrospective Single Institutional Study. | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Anticancer research  | 6. 最初と最後の頁<br>2641 ~ 2646 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.21873/anticancer  | 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>-                 |

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Toshiro Masuda, Kenichi Ogata, Taishi Yamane, Hideaki Takeyama, Katsuhiro Ogawa, Hiromitsu Hayashi, Shinichi Akahoshi, Katsutaka Matsumoto, Yoshiaki Ikuta, Hiroshi Takamori |
| 2. 発表標題<br>International Observership Report  |
| 3. 学会等名<br>第30回日本肝胆膵外科学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Toshiro Masuda, Kenichi Ogata, Taishi Yamane, Hideaki Takeyama, Katsuhiro Ogawa, Hiromitsu Hayashi, Shinichi Akahoshi, Katsutaka Matsumoto, Yoshiaki Ikuta, Hiroshi Takamori |
| 2. 発表標題<br>Endoscopic Retrograde Gall Bladder Drainage followed by cholecystectomy for acute cholecystitis with more than 72 hours after its onset                                      |
| 3. 学会等名<br>第30回日本肝胆膵外科学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hiromitsu Hayashi, Yoshiaki Ikuta, Toshiro Masuda, Kenichi Ogata, Katsutaka Matsumoto, Shinichi Akaboshi, Katsuhiro Ogawa, Hideaki Takeyama, Taishi Yamane, Hiroshi Takamori |
| 2. 発表標題<br>A benefit of laparoscopic approach in hepatic posterior sectionectomy  |
| 3. 学会等名<br>第30回日本肝胆膵外科学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>林 洋光、生田義明、増田稔郎、緒方健一、松本克孝、赤星慎一、小川克大、武山秀晶、山根大侍、高森啓史 |
| 2. 発表標題<br>肝細胞癌再発に対して経横隔膜アプローチによる胸腔鏡下肝切除を行った1例               |
| 3. 学会等名<br>第111回日本消化器病学会九州支部例会・第105回日本消化器内視鏡学会九州支部例会         |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>光浦智証、林洋光、生田義明、赤星慎一、増田稔郎、緒方健一、松本克孝、小川克大、武山秀晶、山根大侍、高森啓史 |
| 2. 発表標題<br>高齢者肝切除における栄養評価CONUTの臨床的意義                             |
| 3. 学会等名<br>第54回日本肝癌研究会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>林 洋光、生田義明、増田稔郎、緒方健一、松本克孝、赤星慎一、小川克大、武山秀晶、山根大侍、高森啓史 |
| 2. 発表標題<br>腔鏡下肝後区域切除のコツとピットホール ～定型化へ向けて～                     |
| 3. 学会等名<br>第73回日本消化器外科学会総会                                   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>沖野哲也、松村和季、東孝暁、清水健次、小川克大、新田英利、赤星慎一、増田稔郎、松本克孝、生田義明、高森啓史、馬場秀夫 |
| 2. 発表標題<br>胆嚢管結石嵌頓による急性胆嚢炎に対する緊急手術症例の検討                               |
| 3. 学会等名<br>第80回日本臨床外科学会総会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>生田義明、松村和季、東孝暁、清水健次、小川克大、新田英利、赤星慎一、増田稔郎、松本克孝、沖野哲也、高森啓史 |
| 2. 発表標題<br>抗血栓内服薬が脾頭十二指腸切除術の術後早期アウトカムに及ぼす影響                      |
| 3. 学会等名<br>第80回日本臨床外科学会総会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>清水健次、土居浩一、松村和季、東孝暁、小川克大、新田英利、増田稔郎、赤星慎一、松本克孝、生田義明、沖野哲也、高森啓史 |
| 2. 発表標題<br>成人における小腸腫瘍33例の臨床病理学的検討                                     |
| 3. 学会等名<br>第80回日本臨床外科学会総会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>林 洋光、高森啓史、山下洋市、生田義明、増田稔郎、岡部弘尚、中川茂樹、今井克憲、近本亮、馬場秀夫 |
| 2. 発表標題<br>腹部手術歴を有する例に対する鏡視下肝切除の問題点と胸腔を活用したアプローチの工夫         |
| 3. 学会等名<br>第31回日本内視鏡外科学会総会                                  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Miyata T, Yamashita Y, Yoshizumi T, Shiraishi M, Ota M, Eguchi S, Aishima S, Baba H, Fujioka H |
| 2. 発表標題<br>CXCL12 is involved in liver metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma                      |
| 3. 学会等名<br>The 27th Meeting of the Japanese Association of Metastasis and Research                        |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Miyata T, Yamashita Y, Yoshizumi T, Shiraishi M, Ota M, Eguchi S, Aishima S, Baba H, Fujioka H |
| 2. 発表標題<br>CXCL12 is involved in liver metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma                      |
| 3. 学会等名<br>The 72nd General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterological Surgery                |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Miyata T, Yamashita Y, Yoshizumi T, Shiraishi M, Ota M, Eguchi S, Aishima S, Baba H, Fujioka H |
| 2. 発表標題<br>CXCL12 is involved in liver metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma.                     |
| 3. 学会等名<br>The 30th Meeting of the Japanese Society of HBP Surgery  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Miyata T, Yamashita Y, Yoshizumi T, Shiraishi M, Ota M, Eguchi S, Aishima S, Baba H, Fujioka H |
| 2. 発表標題<br>CXCL12 is involved in liver metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma                      |
| 3. 学会等名<br>The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association                                     |
| 4. 発表年<br>2018年   |

〔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<br>分担者 | 山下 洋市<br><br>(YAMASHITA Youichi)<br><br>(00404070) | 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授<br><br><br>(17401) |    |



6. 研究組織（つづき）

|       | 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 | 岡部 弘尚<br><br>(OKABE Hirohisa)<br><br>(40573621)   | 熊本大学・病院・非常勤診療医師<br><br><br><br>(17401)       |    |
| 研究分担者 | 今井 克憲<br><br>(IMAI Katsunori)<br><br>(60555746)   | 熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教<br><br><br><br>(17401) |    |
| 研究分担者 | 中川 茂樹<br><br>(NAKAGAWA Shigeki)<br><br>(10594872) | 熊本大学・病院・非常勤診療医師<br><br><br><br>(17401)       |    |
| 研究分担者 | 日比 泰造<br><br>(HIBI Taizo)<br><br>(10338072)       | 熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授<br><br><br><br>(17401) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |