

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09113

研究課題名(和文)肝内胆管癌癌源・癌細胞の可塑性と癌間質微小環境制御による新規治療法の開発

研究課題名(英文)Plasticity of cancer-initiating and cancer cells in intrahepatic cholangiocarcinoma and regulation of the cancer stromal microenvironment

研究代表者

大塚 将之(Ohtsuka, Masayuki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90334185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌症例の56%にNotch2発現が、72%にLGR5発現が認められ、Notch2は肝内胆管癌細胞をより成熟した胆管細胞様に分化させる方向に働き、その悪性度を低下させているのに対し、LGR5は肝内胆管癌細胞のstemnessに関与し、悪性度を高めていることが示唆された。また、WntシグナルはEMTやstemnessの獲得に関与し、肝内胆管癌において癌源細胞の誘導あるいは維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに肝内胆管癌症例の60%にp-FAK発現がみられ、それらの予後は不良であることを明らかにするとともに、p-FAKがCAFの活性化に関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝内胆管癌は、生物学的多様性に富む腫瘍であり、その予後も症例によって大きく異なる。本研究ではそのような疾患に対し、その異なる悪性度を引き起こすメカニズムを癌細胞の分化動態に注目し、NotchシグナルとWntシグナルがその過程に重要であることを明らかにした。また、癌間質微小環境のCAFの活性化が本疾患の悪性度を高め、そこにはp-FAKの発現が重要である可能性を見出した。これらは本疾患に対する新たな治療法開発の基礎となるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Notch2 and LGR5 were expressed in 56% and 72% of cases with intrahepatic cholangiocarcinoma, respectively. In vivo and in vitro studies suggested that Notch2 is involved in the differentiation of intrahepatic cholangiocarcinoma cells into more mature cholangiocyte-like cells, resulting in reduced aggressiveness, while LGR5 may be involved in the stemness of intrahepatic cholangiocarcinoma cells, and increase their aggressiveness. In addition, Wnt signaling is also involved in the acquisition of EMT and stemness and was suggested to play an important role in the induction and maintenance of cancer-initiating cells. Furthermore, p-FAK was expressed in 60% of intrahepatic cholangiocarcinoma cases, and the survival of patients with positive p-FAK expression was significantly worse than that of patients with negative p-FAK expression. It was also found that p-FAK may be involved in the CAF activation.

研究分野：医歯薬系 外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝内胆管癌 癌源細胞 Notchシグナル Wntシグナル 上皮間葉転換 stemness 癌間質微小環境 p-FAK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝臓を構成する肝細胞と胆管細胞は、胎生時、いずれも肝芽細胞が分化することによって発生する。また、成体においては、肝障害時、とくに成熟肝細胞や胆管細胞の複製が制限された状態ではcanals of Heringや大型胆管にみられる胆管附属腺に存在するとされる組織幹細胞・前駆細胞が活性化し組織修復にあたりとされ、それらは肝細胞・胆管細胞両者に分化する能力をもつ、とされている。それらの過程において、分化の方向、すなわち肝細胞へ分化するか胆管細胞へ分化するか、を決定するための、Notchシグナルをはじめとした、いくつかのシグナル経路が報告されている。一方、近年、終末分化を遂げた細胞からのリプログラミングによっても幹細胞様の特徴を有する細胞や別の性質・表現型を有する細胞が誘導し得ることが明らかとなり、成熟肝細胞が胆管上皮へ分化転換しうること、その際、胆管への分化を決定づけるNotchシグナルが誘導されること、また、一定条件下では肝細胞の形質・表現型へ回復すること、が報告されている。これらの結果は肝細胞と胆管細胞間で両方向性に分化転換しうる、可塑性を有することを示している。

(2) 肝臓に発生する癌の一つである肝内胆管癌においても、その発生において成熟肝細胞のリプログラミングが注目されている。マウスモデルでは、Notchシグナルを強制発現させることで成熟肝細胞から胆管癌が発生することが証明され、AKT/Yap-induced胆管癌が肝細胞由来であること、その胆管癌においてはNotchシグナルの発現亢進がみられ、Notchシグナルをblockすることで腫瘍形成が遅れて腫瘍細胞増殖が抑制されること、特にNotch2を除去すると胆管癌としての形質・表現型が失われ、少数の肝細胞癌を伴う肝細胞腺腫の形質・表現型に転換する現象がみられること、が報告されている。われわれも肝内胆管癌切除例の58%においてNotch2発現の亢進が認められることを明らかにしている。さらに、肝内胆管癌の臨床検体によるオルガノイド培養では、肝内胆管癌癌源細胞が肝細胞機能を有する細胞へ分化しうるということが報告され、その際のメカニズムとして重要なものはWntシグナルの抑制であることが示されている。これらの結果は、胆管癌癌源細胞においても成熟肝細胞・胆管細胞と同様な可塑性を有し、その分化、性質や表現型の獲得に大きく関与している可能性を示すものである。実際、肝臓には肝細胞癌と肝内胆管癌両者の形質・表現型をもつ混合型肝癌の存在も知られており、これらの知見の正しさを示唆するものと考えられる。したがって、肝内胆管癌において、Notchシグナル、あるいはWntシグナルの抑制は、肝内胆管癌癌源細胞を肝細胞系に分化誘導し、肝内胆管癌の発生・形成抑制、悪性度の低下に結び付けられる可能性があると考えられる。

(3) 生体内の癌組織は癌細胞と微小環境によって構成される。癌源細胞の維持、分化、癌細胞の増殖などは癌間質微小環境の非上皮細胞からのニッチ因子供給により成り立っているとされる。マウスモデルでは、肝内胆管癌周囲のマクロファージからのWnt3aがWntシグナルを活性化している可能性が見出され、tumor-associated macrophage (TAM)などの免疫担当細胞と癌細胞とのcrosstalkは肝内胆管癌の、肝内胆管癌としてのidentityの維持に重要であると考えられている。そもそも、胆管の発生においては、門脈周囲の間質から供給されるTGF β やNotch2のリガンドであるJagged1が重要な役目を果たしている。また、慢性肝障害時における肝前駆細胞からの胆管細胞分化には筋線維芽細胞に発現しているJagged1が重要とする報告もあり、われわれの検討ではJagged1は肝内胆管癌の間質細胞にも発現していることを見出している。これらの結果は肝内胆管癌において、TAMなどの制御が肝内胆管癌としてのidentityを失わせ、より悪性度の低い肝細胞系の性質・表現型への転換を誘導できる可能性を示唆するものである。一方、肝内

胆管癌の多くが有している血管に乏しい豊富な線維性間質は化学療法剤の癌細胞への到達を抑制し、cytotoxic T cell の浸潤も抑制していると考えられる。したがって、癌間質微小環境の制御は、肝内胆管癌における有効な治療となる可能性がある。肝内胆管癌と同様な豊富な癌間質を有する膵癌における focal adhesion kinase (FAK)をターゲットとした報告では、癌線維化の抑制、cancer-associated fibroblast (CAF)や TAM の減少とともに免疫抑制環境の改善から有効な治療法となりうることを示されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は

- (1) 実際の肝内胆管癌や混合型肝癌、胆嚢癌の臨床検体（外科切除材料）を用いて、Notchレセプターとそのリガンド、Wnt3a、 β カテニンの発現状況、TAM、FAK/p-FAKの発現をmRNA及びタンパクレベルで評価し、それらと臨床病理学的因子を比較する、
- (2) 肝内胆管癌の臨床検体と肝内胆管癌細胞株を用いてWntシグナルと癌源細胞、stemnessとの関連を検討する、
- (3) p-FAK を標的とし、肝内胆管癌の微小環境修飾を狙った新たな、かつ従来よりも有効な治療法を開発するための基盤を確立することにある。

3. 研究の方法

(1) 肝内胆管癌における Notch シグナル、Wnt シグナル、TAM の発現解析

肝内胆管癌外科切除材料を用いてNotch2、Wntシグナル経路を形成する受容体のLGR5、 β カテニン、CD163につき市販の抗体を用いて免疫組織染色を行い、その結果と臨床病理学的因子、予後との関連について比較検討する。さらにEMTマーカーであるE-cadherinやvimentinとの関係を検討するとともに、特にLGR5においてはstemnessマーカーであるCD133、EpCAMとの関連も検討する。

(2) 肝内胆管癌細胞株を用いた Wnt シグナルの抑制評価

肝内胆管癌細胞株HuCCT1とHuH-28細胞において、Wntシグナル抑制効果をもつIWP-2を用いたときのE-cadherinやvimentinの発現変化やCD133、EpCAMの発現変化をwestern blottingで評価するとともに、浸潤能の変化、3D培養における形態変化、anoikis assayによるanoikis耐性を評価することで癌源細胞の動態解析を行う。さらに、HuCCT1とHuH-28細胞において、LGR5をノックダウンさせたときの変化を同様に解析する。

(3) 肝内胆管癌における FAK/p-FAK の発現解析

肝内胆管癌外科切除材料を用いてFAK/p-FAKにつき市販の抗体を用いて免疫組織染色を行い、その結果と臨床病理学的因子、予後との関連について比較検討するとともに、周囲に発現する α SMA やCD163陽性細胞との関連を評価する。また、オルガノイド培養を試み、in vitroでの評価を試みる。

4. 研究成果

(1) 肝内胆管癌における Notch シグナル、Wnt シグナル、TAM の発現解析

61例の肝内胆管癌臨床検体を用いて、Notch2、LGR5、 β カテニンの発現を検討したところ、Notch2陽性例を34例(56%)、LGR5高発現例を44例(72%)に認めた。Notch2の陽性頻度は以前の検討結果と同様であり、Notch2陽性例はCA19-9高値例が少なく、陰性例よりも予後が良

好であることが確認された。一方、LGR5 の発現とβカテニンの核内陽性率をみると正の相関があり、LGR5 が Wnt シグナルの活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、LGR5 と臨床病理学的因子との関係を見ると、LGR5 高発現例ではリンパ節転移や血行性転移再発例が多いことが明らかになり、LGR5 高発現例は有意に予後不良であることを見出した。さらに、LGR5 発現と Vimentin 発現は正の相関を示し、epithelial-mesenchymal transition (EMT) を誘導すること、また、EpCAM とも関連することから cancer-stem cell (CSC)-like property にも関与していることが示唆された。すなわち、Notch2 を中心とした Notch シグナルは、肝内胆管癌細胞をより成熟した胆管細胞様に分化させる方向に働き、その悪性度を低下させているのに対し、Wnt シグナルは肝内胆管癌細胞の stemness に関与し、悪性度を高めていることが明らかになった。このことは、Notch を抑制するだけでは肝細胞系の形質・表現型に誘導することはできず、何らかの能動的なメカニズムが存在することが推測され、過去の報告からすると、Wnt シグナルの抑制がそれに関与している可能性も考えられた。TAM については、マクロファージマーカーである CD163 陽性細胞数と PD-L1 発現につき、その関係性を胆嚢癌組織で明らかにした。

(2) 肝内胆管癌細胞株を用いた Wnt シグナルの抑制評価

肝内胆管癌細胞株2種類、HuCCT1、HuH-28を用いて、WntインヒビターであるIWP-2を投与することでβカテニンやEMT(vimentin, E-cadherin)やCSCマーカー(EpCAM, CD133)の動態を検討したところ、βカテニンの発現低下、vimentinの発現低下、E-cadherinの発現増強、EpCAMやCD133の発現低下が観察された。また、IWP-2投与による浸潤能の変化を検討したところ、有意な浸潤能の低下が認められた。3D培養による形態変化を観察すると、IWP-2の投与により上皮様の spheroid cyst構造が維持され、間葉系のspindle shapeあるいはirregular cyst構造の細胞数は減少していた。すなわち、Wntシグナルが肝内胆管癌細胞のEMTに関与することが明らかになった。一方、anoikis assayにおいてはanoikis耐性能が有意に低下することが判明した。これらの結果は、Wntシグナルが肝内胆管癌において癌源細胞の誘導あるいは維持に重要な役割を果たしていることを示唆するものと考えられた。

次にLGR5をノックダウンすることによる変化を検討したところ、IWP-2を投与したときとほぼ同じ結果が得られ、Wntシグナルの、肝内胆管癌における癌源細胞の誘導あるいは維持に対する役割を裏付けるものと考えられた。

(3) 肝内胆管癌における FAK/p-FAK の発現解析

95例の肝内胆管癌臨床検体を用いて、FAK、p-FAKの発現を検討したところ、60例(63%)において細胞質に高い発現を認めた。p-FAK発現と臨床病理学的因子との関連をみるとp-FAK高発現例では腫瘍サイズが有意に大きく、脈管侵襲やリンパ節転移が多いことが明らかにされたが、患者年齢、性別、腫瘍マーカー、腫瘍分化度、被膜浸潤には関連が認められなかった。その一方、p-FAK高発現例は有意に切除後の予後が不良なことがわかり、p-FAKが何らかの機序により臨床的なheterogeneityに貢献していることが明らかになった。また、p-FAKとCAFのマーカーであるαSMAとの関連を免疫組織学的に検討したところ、弱いながら正の相関がみられ、p-FAKがCAFの活性化に関与している可能性が示唆されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawasaki Ki, Kuboki S, Furukawa K, Takayashiki T, Takano S, Ohtsuka M	4. 巻 41
2. 論文標題 LGR5 induces catenin activation and augments tumour progression by activating STAT3 in human intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Liver Int	6. 最初と最後の頁 865 ~ 881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/liv.14747	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Kanzaki H, Chiba T, Ao J, Koroki K, Kanayama K, Maruta S, Maeda T, Kusakabe Y, Kobayashi K, Kanogawa N, Kiyono S, Nakamura M, Kondo T, Saito T, Nakagawa R, Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Muroyama R, Nakamoto S, Yasui S, Tawada A, Arai M, Kanda T, Maruyama H, Mimura N, Kato J, Zen Y, Ohtsuka M, Iwama A, Kato N	4. 巻 11
2. 論文標題 The impact of FGF19/FGFR4 signaling inhibition in antitumor activity of multi-kinase inhibitors in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84117-9	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Yokota T, Nojima H, Kuboki S, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Takano S, Ohtsuka M	4. 巻 259
2. 論文標題 Sphingosine-1-phosphate Receptor-1 Promotes Vascular Invasion and EMT in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Surg Res	6. 最初と最後の頁 200 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2020.11.044	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Sapisochin G, Javle M, Lerut J, Ohtsuka M, Ghobrial M, Hibi T, Kwan NM, Heimbach J	4. 巻 104
2. 論文標題 Liver Transplantation for Cholangiocarcinoma and Mixed Hepatocellular Cholangiocarcinoma: Working Group Report From the ILTS Transplant Oncology Consensus Conference	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 1125 ~ 1130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.0000000000003212	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Ashizawa Y, Kuboki S, Nojima H, Takano S, Ohtsuka M, et al	4. 巻 3
2. 論文標題 OLFM4 Enhances STAT3 Activation and Promotes Tumor Progression by Inhibiting GRIM19 Expression in Human Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 954 ~ 970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1361	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Sugiura K, Mishima T, Takano S, Kuboki S, Ohtsuka M, et al	4. 巻 189
2. 論文標題 The Expression of Yes-Associated Protein (YAP) Maintains Putative Cancer Stemness and Is Associated with Poor Prognosis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1863 ~ 1877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.05.014	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Sasaki K, Takano S, Tomizawa S, Miyahara Y, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Takada M, Ohtsuka M.	4. 巻 40
2. 論文標題 C4b-binding protein γ -chain enhances antitumor immunity by facilitating the accumulation of tumor-infiltrating lymphocytes in the tumor microenvironment in pancreatic cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Exp Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-021-02019-0	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川原健治、高野重紹、賀川真吾、大塚将之
2. 発表標題 化学療法後の膵癌の低間質量は肝転移再発を来たし予後不良である
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保木知、古川勝規、高屋敷史、高野重紹、鈴木大亮、酒井望、賀川真吾、細川勇、小西孝宣、大塚将之
2. 発表標題 肝内胆管癌に対する積極的リンパ節郭清の予後延長効果を再考する
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川崎圭史、久保木知、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷史、高野重紹、鈴木大亮、酒井望、賀川真吾、三島敬、中台英里、小西孝宣、大塚将之
2. 発表標題 LGR5-WntシグナルはSTAT3活性亢進を介して肝内胆管癌のstemness及びEMTを促進することにより腫瘍悪性を高める
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野重紹、三島 敬、吉富秀幸、大塚将之
2. 発表標題 YAP expression maintains cancer stemness and is associated with poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 豊、久保木 知、高野重紹、三島 敬、中台英里、他
2. 発表標題 肝内胆管癌に対する積極的リンパ節郭清はR0切除後の予後改善に寄与する
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中台英里、久保木 知、高野重紹、三島 敬、大塚将之、他
2. 発表標題 局所進行切除不能肝内胆管癌に対するDownsizing chemotherapyとConversion surgeryの意義
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ashizawa Y, Kuboki S, Takano S, Mishima T, Nakadai E, Ohtsuka M, et al.
2. 発表標題 OLFM4 enhances STAT3 activation and promotes tumor progression by inhibiting GRIM-19 expression in human hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第31回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦謙典、三島 敬、高野重紹、久保木 知、中台英里、大塚将之、他
2. 発表標題 肝内胆管癌におけるYAP発現の臨床病理学的意義と機能解析
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 豊、久保木 知、高野重紹、三島 敬、大塚将之、他
2. 発表標題 進行胆嚢癌におけるPD-L1発現の臨床的意義
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高野 重紹 (Shigetsugu Takano) (20436380)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	久保木 知 (Satoshi Kuboki) (50571410)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	
研究分担者	中台 英里 (Eri Nakadai) (60831500)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	
研究分担者	三島 敬 (Takashi Mishima) (70802560)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	

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
---------	---------