

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08996

研究課題名(和文) 肝胆膵領域のがん間質の線維化についての解析 新たなバイオマーカーや治療標的の探索

研究課題名(英文) Analysis of fibrosis of cancer stroma in the hepatobiliary and pancreatic tumors.

研究代表者

祝迫 恵子 (Iwaisako, Keiko)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：70625300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝胆膵領域のがん組織は「がん間質の線維化」という共通した病理組織学的所見が認められる。肝原発の悪性腫瘍のうち、がん間質の線維化が高度な肝内胆管がんについて、がん間質のコラーゲン組織と浸潤する免疫細胞を免疫組織学的に解析し、予後との関連を検討した。肝内胆管がんのがん間質に増生するコラーゲンは、type1と3が主体であり、正常肝組織と比較するとtype3の割合が高かったが予後との相関は認められなかった。リンパ球の組織面積当たりの浸潤細胞数は、多いほど予後(全生存、無再発生存)良好であった。肝内胆管がんに対するがん免疫療法は標準治療となっていないが、手術時にがん免疫が誘導されていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良な肝臓原発のがんである肝内胆管がんには、手術以外に有効な治療法がない。手術で切除された癌の組織を性状解析することにより、治療標的を見出し、有効な治療法開発につなげることを目的として行われた研究である。近年、新たながんの治療法として確立された免疫チェックポイント阻害薬の有効性について、薬物ががん細胞に辿り着くのを阻害すると考えられている間質の線維の状態や免疫チェックポイント阻害薬によって賦活化されるキラーT細胞の存在などを明らかにした。線維化は予後不良因子ではなく、キラーT細胞の浸潤が多いほど予後が良好であったことから、肝内胆管がんに対してもがん免疫療法が適応となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Hepatobiliary pancreatic cancer has a poor prognosis. Histopathologically, tumor tissues show "fibrosis of the carcinoma stroma. In this study, intrahepatic cholangiocarcinoma, a malignant tumor of hepatic origin with a high degree of fibrosis of the stroma, was analyzed immunohistologically for collagen and tumor infiltrating immune cells to examine their relationship with prognosis. The collagen was predominantly type 1 and 3, and the percentage of type 3 was higher than that of normal liver tissue. However, there was no correlation between the percentage of type 3 and prognosis. The number of infiltrating lymphocytes (CD8+ T cells, CD4+ T cells, and CD20+ B cells) was better prognosis (overall survival and recurrence-free survival) with more cells. These results suggest that cancer-specific immunity to intrahepatic cholangiocarcinoma was induced at the time of surgery and contributed to the prevention of postoperative recurrence and metastasis.

研究分野：肝臓学

キーワード：線維化 肝内胆管癌 癌免疫 腫瘍浸潤リンパ球

1. 研究開始当初の背景

肝胆膵領域のがん組織の多くは「がん間質の線維化」という共通した病理組織学的所見があることに着目した。肝原発の悪性腫瘍のうち、間質増生の強い肝内胆管癌の手術検体を用いて、がん間質に存在する筋線維芽細胞や免疫細胞の形態学的、分子生物学的解析を行い、その役割や相互作用を明らかにし、さらに、がん間質に豊富に存在する細胞外基質について、その由来と構成を解析することを計画した。間質の細胞や細胞外基質が、がんの増生に与える影響について検討することで、予後不良な肝内胆管癌の性状を理解し、予後との関連を検証することで、バイオマーカーや治療標的を見出し、長期予後を改善する研究開発につなげたいと考え研究を開始した。

2. 研究の目的

肝胆膵領域のがんのほとんどの症例で「がん間質の線維化」という共通した病理組織学的所見が認められることに着目し、外科手術によって摘出された臨床検体を用いて、がん細胞、およびがん間質に存在する筋線維芽細胞や免疫細胞についての解析を行い、その相互作用について検証する。さらに間質に豊富に存在する細胞外基質について、その由来と構成についても検討した。がん間質の線維化に複合的にアプローチすることで、肝胆膵領域のがんの性状を詳細に解析し、予後との関連を検証し、バイオマーカーや治療標的を見出すことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、京都大学肝胆膵・移植外科との共同研究で、2020年～2022年度の研究期間中に、保存されている臨床検体の抽出を行い、病理・免疫組織学的解析を行った。遺伝子発現解析の検体処理は、研究分担者が京都大学で行った。主な解析項目は、1)がん間質に存在する筋線維芽細胞、免疫細胞を免疫組織学的に同定し定量化、2)がん間質の細胞外基質について、偏光顕微鏡によるコラーゲンのサブタイプ解析、3)各々の結果と予後との関連を解析した。

4. 研究成果

用いた手術検体は、すべて治癒切除が行われた74症例である。偏光顕微鏡によりシリウスレッド染色スライドを観察すると、type1コラーゲンは赤く、type3コラーゲンは緑に染まり、画像解析で2次元的に定量化することが可能であった(図1)。がん組織のコラーゲンはtype3が正常肝組織に比べて多かったが、その割合と予後には関連が認められなかった。筋線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルが異なり、がん細胞に影響を与えている可能性はあり、今後の課題である。

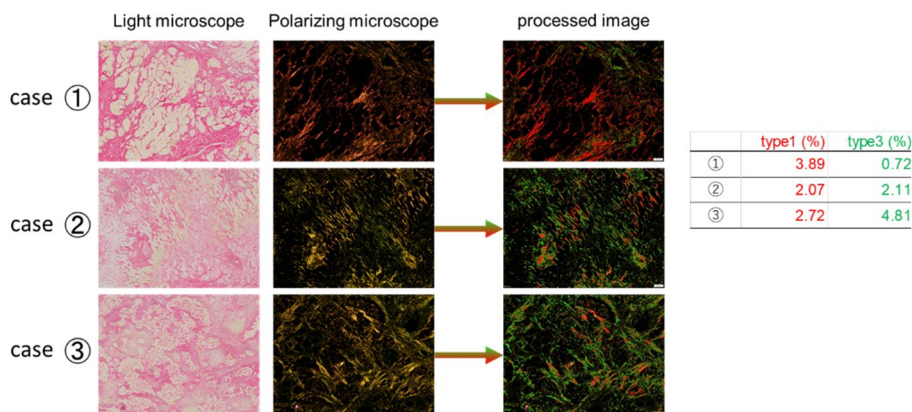


図1 偏光顕微鏡による肝内胆管がんのコラーゲンの観察
Case①はtype1優位、case③はtype3優位である。

肝内胆管がん組織へのリンパ球 (CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD20 陽性 B 細胞) の組織面積当たりの浸潤細胞数は、多いほど予後 (全生存、無再発生存) 良好で、FOXP3 陽性 T 制御性 T 細胞は少ないほど予後良好であった。ミエロイド系細胞 (CD68 陽性マクロファージ、CD66b 陽性好中球) は、極端に浸潤が多い症例があり、統計学的有意差は認められなかったもののリンパ球と同様に浸潤が多いほど予後良好な傾向がみられた。図2に各種の免疫細胞マーカーによる免疫組織染色の一例を示す。FFPE を対象としてこれらの免疫染色が可能であり、この方法であれば、保存された検体の解析が可能である。がん免疫と関連すると考えられるがん細胞側の因子として MHC クラス I 分子の発現を観察したが、リンパ球やミエロイド系細胞浸潤の多寡との関連性は認められなかった。これらの結果から、肝内胆管がんに対して、手術時にがん特異的な免疫が誘導され、術後の再発転移阻止に寄与していたことが推察される。MHC クラス I 分子の発現が認められない症例はなく、ネオアンチゲンなどの探索が必要である。現時点では、肝内胆管がんに対するがん免疫療法は標準治療となっていないが、手術時に十分ながん免疫が誘導されて

いる症例では、術後補助化学療法として免疫チェックポイント阻害薬が予後を改善することが期待される。

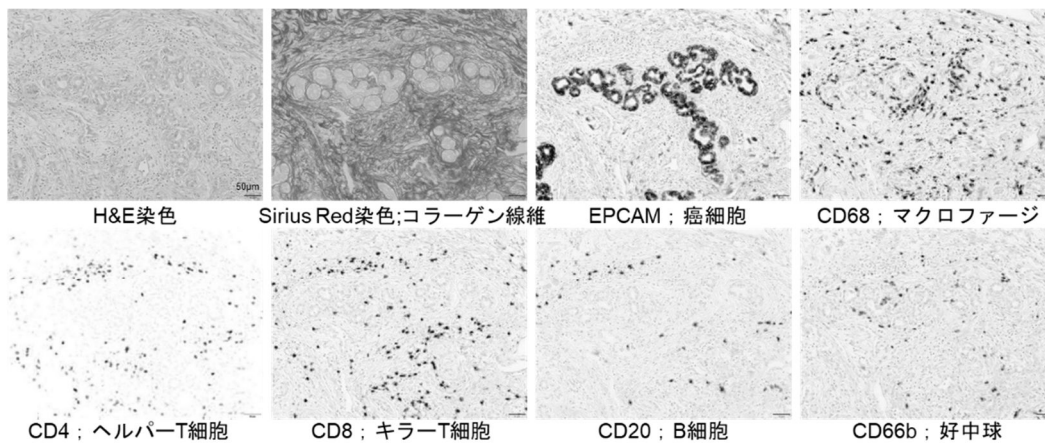


図2 肝内胆管がんの連続切片を用いた組織学的解析
コラーゲン線維と癌細胞、各種の免疫細胞の浸潤を観察することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okada H, Takahashi K, Yaku H, Kobiyama K, Iwaisako K, Zhao X, Shiokawa M, Uza N, Kodama Y, Ishii KJ, Seno H.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 In situ vaccination using unique TLR9 ligand K3-SPG induces long-lasting systemic immune response and synergizes with systemic and local immunotherapy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 2132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05702-0.	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 -
1. 著者名 Mikami T, Kato I, Wing JB, Ueno H, Tasaka K, Tanaka K, Kubota H, Saida S, Umeda K, Hiramatsu H, Isobe T, Hiwatari M, Okada A, Chiba K, Shiraishi Y, Tanaka H, Miyano S, Arakawa Y, Oshima K, Koh K, Adachi S, Iwaisako K, Ogawa S, Sakaguchi S, Takita J.	4. 巻 113(1)
2. 論文標題 Alteration of the immune environment in bone marrow from children with recurrent B cell precursor acute lymphoblastic leukemia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 41-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15186.	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 Yoshino K, Taura K, Iwaisako K, Masano Y, Uemoto Y, Kimura Y, Nam NH, Nishino H, Ikeno Y, Okuda Y, Nishio T, Yamamoto G, Seo S, Uemoto S.	4. 巻 36(9)
2. 論文標題 Novel mouse model for cholestasis-induced liver fibrosis resolution by cholecystojejunostomy. J Gastroenterol Hepatol. 2021;36(9):2493-2500. doi: 10.1111/jgh.15406.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 2493-2500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.15406.	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 Nishino H, Okuno M, Seo S, Toda R, Yoshino K, Kasai Y, Satoh M, Iwaisako K, Taura K, Hatano E.	4. 巻 41(4)
2. 論文標題 Sinusoidal Obstruction Syndrome Promotes Liver Metastatic Seeding of Colorectal Cancer Cells in a Rat Model. Anticancer Res. 2021;41(4):1803-1810. doi: 10.21873/anticancer.14946.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 1803-1810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.14946.	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 Honda K, Hishiki T, Yamamoto S, Yamamoto T, Miura N, Kubo A, Toh M, Chen WY, Takano M, Yoshikawa T, Kasamatsu T, Sonoda S, Yoshizawa H, Nakamura S, Itai Y, Shiota M, Koike D, Naya M, Hayakawa N, Naito Y, Matsuura T, Iwaisako K, Masui T, Uemoto S, Nagashima K, Hashimoto Y, Sakuma T, Matsubara O, Huang W, Ida T, Akaike T, Masugi Y, Suematsu M et al.	4. 巻 41
2. 論文標題 On-tissue polysulfide visualization by surface-enhanced Raman spectroscopy benefits patients with ovarian cancer to predict post-operative chemosensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Redox Biol.	6. 最初と最後の頁 101926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2021.101926	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 Nishio T, Koyama Y, Liu X, Rosenthal SB, Yamamoto G, Fuji H, Baglieri J, Li N, Brenner LN, Iwaisako K, Taura K, Hagood JS, LaRusso NF, Bera TK, Pastan I, Brenner DA, Kisseleva T.	4. 巻 118(29)
2. 論文標題 Immunotherapy-based targeting of MSLN + activated portal fibroblasts is a strategy for treatment of cholestatic liver fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 e2101270118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2101270118.	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 該当する

1. 著者名 Fukuyama Keita, Asagiri Masataka, Sugimoto Masahiro, Tsushima Hiraki, Seo Satoru, Taura Kojiro, Uemoto Shinji, Iwaisako Keiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Gene expression profiles of liver cancer cell lines reveal two hepatocyte-like and fibroblast-like clusters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 245939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245939	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 Yoshino Kenji, Taura Kojiro, Iwaisako Keiko, Masano Yuki, Uemoto Yusuke, Kimura Yusuke, Nam Nguyen Hai, Nishino Hiroto, Ikeno Yoshinobu, Okuda Yukihiro, Nishio Takahiro, Yamamoto Gen, Seo Satoru, Uemoto Shinji	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel mouse model for cholestasis induced liver fibrosis resolution by cholecystojejunostomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15406	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 Kimura Yusuke, Taura Kojiro, Hai Nam Nguyen, Uemoto Yusuke, Yoshino Kenji, Ikeno Yoshinobu, Okuda Yukihiko, Nishio Takahiro, Yamamoto Gen, Tanabe Kazutaka, Koyama Yukinori, Anazawa Takayuki, Fukumitsu Ken, Ito Takashi, Yagi Shintaro, Kamo Naoko, Seo Satoru, Iwaisako Keiko, Hata Koichiro, Imai Takumi, Uemoto Shinji	4. 巻 27
2. 論文標題 Utility of Mac 2 Binding Protein Glycosylation Isomer to Evaluate Graft Status After Liver Transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Liver Transplantation	6. 最初と最後の頁 403 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lt.25870	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 Jiang Chunyan, Iwaisako Keiko, Cong Min, Diggle Karin, Hassanein Tarek, Brenner David A, Kisseleva Tatiana	4. 巻 4
2. 論文標題 Traditional Chinese Medicine Fuzheng Huayu Prevents Development of Liver Fibrosis in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Clinical and Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26502/acbr.50170125	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 Nam Nguyen Hai, Taura Kojiro, Kimura Yusuke, Uemoto Yusuke, Yoshino Kenji, Fukumitsu Ken, Ishii Takamichi, Seo Satoru, Iwaisako Keiko, Uemoto Shinji	4. 巻 168
2. 論文標題 Extent of liver resection is associated with incomplete liver restoration and splenomegaly a long period after liver resection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 40 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2020.02.022	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 Kashima S, Maeda T, Masuda K, Nagano S, Inoue T, Takeda M, Kono Y, Kobayashi T, Saito S, Higuchi T, Ichise H, Kobayashi Y, Iwaisako K, Terada K, Agata Y, Numakura K, Saito M, Narita S, Yasukawa M, Ogawa O, Habuchi T, Kawamoto H	4. 巻 23
2. 論文標題 Cytotoxic T Lymphocytes Regenerated from iPS Cells Have Therapeutic Efficacy in a Patient-Derived Xenograft Solid Tumor Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100998 ~ 100998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100998	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fuji H, Iwaisako K, Ohkubo S, Seo S, Taura K, Asagiri M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Kisseleva T, Brebber D, Hatano E.
2. 発表標題 The association of regulatory T cells with tumor infiltrating lymphocytes and fibrosis in non-HCC liver cancer.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsushima H, Zhao X, Ohkubo S, Hatano E, Shinkura R, Iwaisako K.
2. 発表標題 Oral administration of IgA attenuates cholestatic liver injury via microbiota modulation in mice. AASLD The Liver Meeting, 2021/11/12-15, 国外, ポスター.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸田 怜、瀬尾智、堀佑太郎、上本裕介、森野甲子郎、楊知明、奥野将之、佐藤元彦、萩原孝史、中川俊作、松井宏行、新井康之、中川貴之、祝迫恵子、川口博明、鶴山竜昭、波多野悦朗、田浦康二郎.
2. 発表標題 FOLFOX誘導性マイクロミニプタSOSモデルにおける肝障害と神経障害についての検証ならびにリコモジュリンを併用した予防モデルに関する検証
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

1. 発表者名 金光瑛彰、趙向東、祝迫恵子、八木真太郎、萩原正敏
2. 発表標題 外科医が行う臓器保存の研究とその副次的効果
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

1. 発表者名 對馬啓、藤浩明、大久保咲希、祝迫恵子
2. 発表標題 肝細胞株は遺伝子発現プロファイルによって肝細胞様と線維芽細胞様の2つのクラスターに分けられる對馬啓、藤浩明、大久保咲希、祝迫恵子. 第80回日本癌学会学術総会, 2021/9/30-10-2, 国内, ポスター.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大久保咲希、藤浩明、對馬啓、祝迫恵子
2. 発表標題 肝内胆管癌における免疫細胞浸潤と予後との関連
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小濱仁志、祝迫恵子
2. 発表標題 膵癌における所属リンパ節でのCD169陽性マクロファージの発現と予後との関連の解明
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
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	趙 向東 (Zhao Xiangdong) (00444464)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定助教 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	瀬尾 智 (Seo Satoru) (70646546)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	

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