

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17645

研究課題名（和文）難治性胆道癌における癌悪性化に伴う周囲免疫反応の推移に関わる検討

研究課題名（英文）Changes in the surrounding immune response to malignant transformation of refractory biliary tract cancer

研究代表者

吉原 輝一（Yoshihara, Terukazu）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70850311

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：胆道癌では、IL-6とTGF β が相互刺激し、化学療法抵抗性や癌転移が誘導される。一方、炎症組織では、同サイトカインによって不均一にTリンパ球の分化を誘導するため、癌の進行に伴いサイトカインの腫瘍内不均一性が生じ、分化Tリンパ球の局在現象が起こりうる。このメカニズムを検討した。胆道癌切除検体を用いて、IL-6、TGF β の染色状況と局在、浸潤リンパ球のサブタイプを染色すると、サイトカイン局在とリンパ球浸潤局在に関連があり、切除後の予後が異なることが明らかとなった。in vitroでは、浸潤株と同様な特徴を持つ、化学療法抵抗株を樹立し、未分化T細胞と共培養すると、親株と異なるT細胞分化が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道癌におけるリンパ球の腫瘍内局在を検討した初めての研究であり、分化T細胞の局在により予後が異なることを初めて示した。さらに、in vitroでその現象を確認した。胆道癌における薬物療法では、免疫チェックポイント阻害剤が効果的であるため、今後これらの知見が治療法の選択に役立つ可能性がある。薬物療法では、免疫チェックポイント阻害剤を1次治療に用いる方法と2次治療に用いる方法と考えられるが、in vitro実験の結果からは、同等の治療成績が得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In biliary tract cancer, IL-6 and TGF β mutually stimulate each other, inducing chemotherapy resistance and cancer metastasis. On the other hand, in inflammatory tissues, the same cytokines induce heterogeneous differentiation of T lymphocytes, which may lead to intratumor heterogeneity of cytokines and localization phenomenon of differentiated T lymphocytes during cancer progression. We investigated this mechanism. In vitro, we established a chemotherapy-resistant strain with similar characteristics to the infiltrating strain and co-cultured it with undifferentiated T cells. When co-cultured with undifferentiated T cells, the T-cell differentiation was observed to differ from that of the parental strain.

研究分野：消化器外科

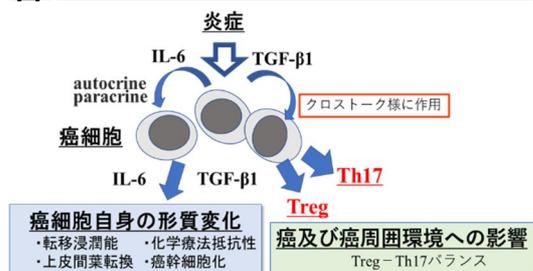
キーワード：胆道癌 免疫反応

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は罹患数のうち、77%が死亡する予後不良な疾患である。2012年の統計では、死亡者数は18,209人/年に及びが、希少疾患とされ、研究や治療開発が進んでいない。教室では、この胆道癌の治療抵抗性メカニズムについて、胆道癌では疾患治療中に炎症を伴うことから、炎症との関係から探ってきた。胆道癌は胆道という細い脈管系に生じ、閉塞しやすく、細菌感染を伴うだけでなく、胆汁が独特の炎症反応を惹起するため、他癌より圧倒的に炎症反応の影響を受ける。教室では、胆道癌において炎症性サイトカインのIL-6が自己分泌的に作用し、治療抵抗性を誘導し(Gastroenterology 2005, 2007)、TGF- β がクロストークして化学療法抵抗性や、上皮間葉系転換を誘導すること、癌先進部でIL-6やTGF- β の発現が亢進している、すなわちサイトカインの腫瘍内不均一性があることを証明した(Eur J Cancer. 2013)。これまで明らかにしてきた胆道癌から分泌されるサイトカインと癌悪性化の関係について図1に示す。

図1 IL-6/TGF- β 1が癌細胞に与える変化



近年、胆道癌における免疫チェックポイント阻害剤を使用した薬物療法が着目、開発されているが、免疫担当細胞に関する働きはまったく明らかでなかった。一方で、免疫細胞のうち、未熟なT細胞は、上述した癌から分泌されるサイトカインによって、分化することが知られている。すなわち、未熟なT細胞(Naive T cell)は様々なサイトカインによってTh1、Th2、Th17、Treg(Foxp3陽性細胞)へと分化し免疫応答を担っている。炎症モデルの研究から、これらのサイトカインの不均一性が、分化T細胞の局在に影響することが報告された。一方で、癌患者の血液、切除標本における分化T細胞が癌進展や予後に影響する研究はいくつかあるが、報告によって結果に「ずれ」がある。この「ずれ」の原因として、癌の進展に伴うサイトカインの不均一性が、Tリンパ球の異なった分化誘導に影響を与える(図1右)ことが推察された。

以上から、癌の進行(増殖・転移・不均一性)に伴い、免疫担当細胞の不均一性・局在が生じる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、癌が悪性形質を獲得するにつれサイトカインの腫瘍内不均一性が生じ、分化Tリンパ球の局在現象が起こりうるという仮説を検証し、そのメカニズムを検討し、胆道癌の予後への影響を探ることを目的とした。そのため、本研究では、以下のように臨床検体を用いた研究を先行させ、癌細胞とヒトリンパ球を用いたin vitro/in vivoで細胞/動物実験で検証する。まず、切除検体を用いた癌におけるサイトカイン・Tリンパ球の腫瘍内不均一性と関連性を明らかにするとともに、予後への影響を探り、そして、癌細胞と悪性形質獲得癌細胞を用いて、ヒトTリンパ球の分化誘導実験で検証することとした。

3. 研究の方法

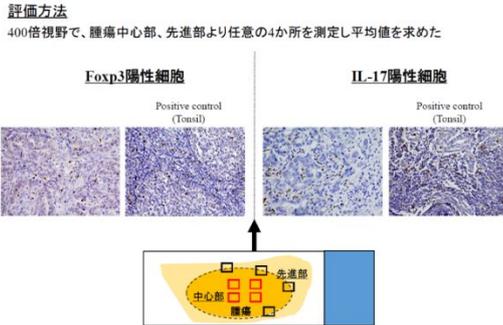
2000年から2012年までの胆道癌切除検体127例(肝内胆管癌57例、胆管癌36例、胆嚢癌18例、乳頭部癌16例)を対象とした。胆道癌切除127例の臨床病理学的背景を図2に示す。平均年齢は64.9歳。腫瘍は肝内胆管癌が57例(45%)、肝外胆管癌が36例(28%)、胆嚢癌が18例(14%)、乳頭部癌が16例(13%)で、Stage III以上が68例(61%)を占めていた。リンパ節転移は47例(37%)に認められた。

図2 胆道癌127例の臨床病理学的背景因子

	n=127
年齢 (years, 平均 \pm SD)	64.9 \pm 9.8
性別 (男性 / 女性)	72 (57%) / 55 (43%)
腫瘍部位 (肝内胆管 / 肝外胆管 / 胆嚢 / 十二指腸乳頭)	57 (45%) / 36 (28%) / 18 (14%) / 16 (13%)
手術時間 (min, 平均 \pm SD)	504.8 \pm 181.3
出血量 (ml, 平均 \pm SD)	1134.5 \pm 955.6
腫瘍径 (mm, 平均 \pm SD)	37.4 \pm 25.1
脈管侵襲 (あり / なし)	65 (51%) / 62 (49%)
UICC (7)-pT (1 / 2 / 3 / 4)	12 (10%) / 42 (33%) / 41 (32%) / 32 (25%)
UICC (7)-pN (0 / 1)	80 (63%) / 47 (37%)
UICC (7)-pStage (I / II / III / IV)	11 (9%) / 38 (30%) / 29 (23%) / 49 (38%)
UICC (7)-組織型 (G1 / G2 / G3 / Gx)	22 (17%) / 70 (55%) / 12 (10%) / 23 (18%)
全生存期間 (months, 平均 \pm SD)	46.3 \pm 40.6
無再発生存期間 (months, 平均 \pm SD)	22.5 \pm 42.0

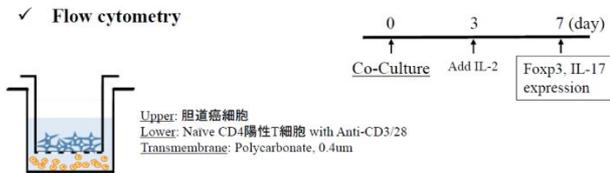
切除検体に対し、抗IL-6抗体、抗TGF- β 1抗体、抗Foxp3抗体、抗IL-17抗体による免疫組織化学染色を施行した。Foxp3陽性細胞およびIL-17陽性細胞は癌周囲に集簇するリンパ球を、図3のように腫瘍中心部と腫瘍先進部にわけて測定し、各染色群の特徴に関する病理臨床学的検討を行った。

図3 免疫組織化学染色法による Foxp3陽性細胞およびIL-17陽性細胞の評価方法



胆道癌細胞株親株(TFK-1)および樹立した化学療法(ゲムシタピン)耐性株を用いて、図4のように naïve T細胞と共培養を行い、Foxp3 陽性細胞および IL-17 陽性細胞への分化をフローサイトメトリーで評価した。

図4 細胞株によるnaive CD4陽性T細胞からFoxp3/IL-17陽性細胞への分化誘導(共培養)

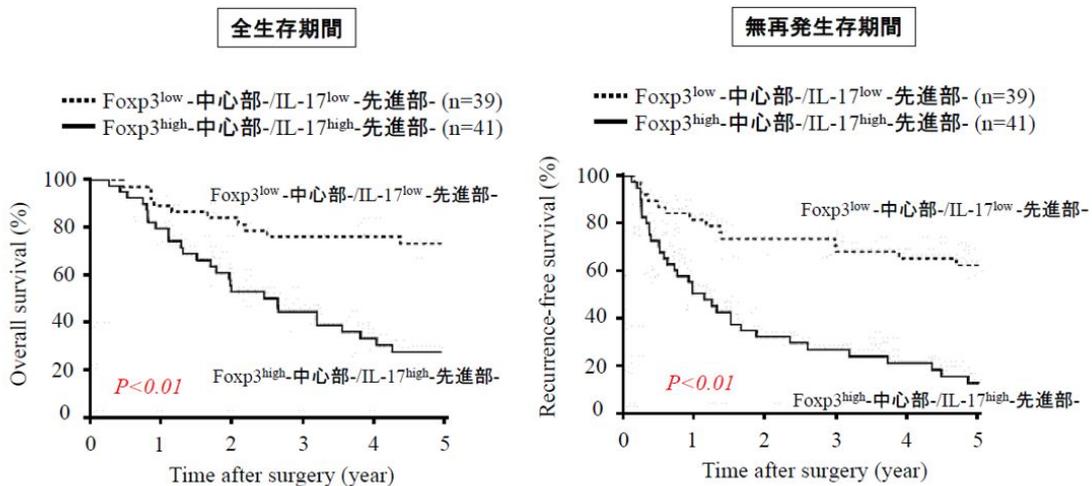


4. 研究成果

免疫染色において、図5に示す通り、Foxp3 陽性細胞は腫瘍中心部に発現が多く(11vs.6, $P<0.01$)、IL-17 陽性細胞は腫瘍先進部に多い傾向であり(14vs.18, $P=0.11$)、臨床病理学的因子解析では、腫瘍中心部での Foxp3 陽性細胞の高発現が全生存の独立予後因子であり[hazard ratio (HR)=2.41, $P<0.01$]、腫瘍マーカー(CEA)、腫瘍径、脈管侵襲に加えて、腫瘍先進部での IL-17 陽性細胞の高発現が無再発生存の独立予後因子であった[HR=2.48, $P<0.01$]。

図5 Foxp3陽性細胞とIL17陽性細胞の腫瘍局在

図6 Foxp3陽性細胞とIL17陽性細胞と治療成績

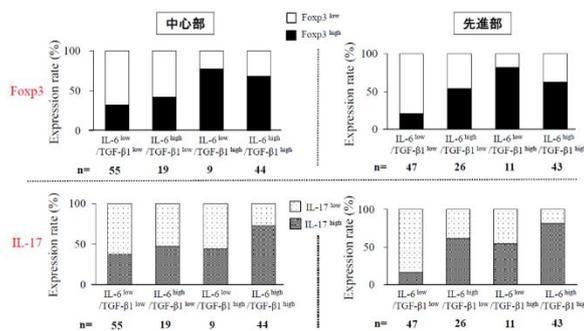


さらに両高発現群においては低発現群と比較して、進展度・リンパ節転移率が高く、予後不良であった[HR=3.81, $P<0.01$ 、図6]。

IL-6およびTGF- β 1の発現検討では、IL-6は腫瘍先進部における高発現例が、TGF- β 1は腫瘍中心部、腫瘍先進部の両方における高発現例が多く存在した(図7)。IL-6とTGF- β 1の発現を高発現群と低発現群に分類し、Foxp3 陽性細胞と IL-17 陽性細胞の発現割合を解析したところ、腫瘍中心部においては、TGF- β 1の高発現下で Foxp3 陽性細胞の発現が増加し、腫瘍先進部においては、IL-6の高発現下で IL-17 陽性細胞の発現が増加していた。多重ロジスティック回帰分析において、腫瘍中心部では年齢、脈管侵襲に加えて、TGF- β 1高発現が Foxp3 陽性細胞の高発現における独立した

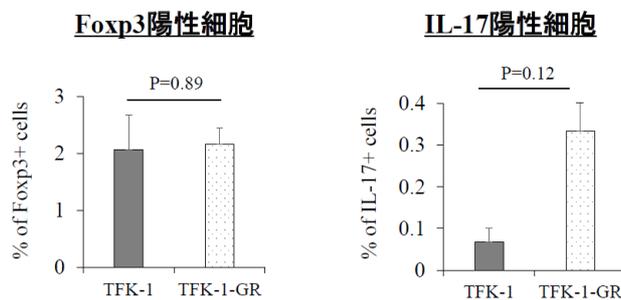
関連因子であり [odds ratio (OR)=6.00, P=0.04]、腫瘍先進部では腫瘍マーカー (CA19-9)、脈管侵襲、T 因子に加えて、IL-6 高発現が IL-17 陽性細胞の高発現における独立した関連因子であった [OR=58.48 P<0.01]。

図7 IL-6とTGF-βの発現とFoxp3陽性細胞とIL17陽性細胞



癌細胞と naïve T 細胞の共培養実験系で、上記の結果を確認した。実際には、腫瘍先進部特有の細胞株を作製することは困難であることから、先行する研究で、化学療法耐性株が腫瘍先進部における特徴を持つことを利用して、実験を行った。胆道癌細胞株親株と化学療法耐性株のそれぞれが腫瘍中心部と腫瘍先進部における特徴を持つことを MTT assay、invasion assay、qRT-PCR 法で確認した。さらに naïve T 細胞に IL-6、TGF-β1 を加えたところ、Foxp3 陽性細胞は TGF-β1 の濃度に依存して上昇し、IL-17 陽性細胞は IL-6 の濃度に依存して割合が増加することが示された。続いて、胆道癌細胞株親株および化学療法耐性株を用いて naïve T 細胞と共培養したところ、IL-6 の分泌が高い化学療法耐性株との共培養によって、より IL-17 陽性細胞への分化が高い傾向であった (親株 0.07% vs. 耐性株 0.33%, P=0.12)。

図8 胆道癌細胞株と胆道癌化学療法抵抗株による未分化T細胞からFoxp3陽性細胞、IL17陽性細胞への分化誘導実験



以上から、癌の進行に伴って、腫瘍中心部においては TGF-β1 存在下で Foxp3 陽性細胞の発現が増加すること、腫瘍先進部においては IL-6 存在下で IL-17 陽性細胞の発現が増加することが認められた。すなわち、胆道癌において自己産生サイトカインが T 細胞の不均一性をもたらし、癌進展および変容に与ることが示唆された。

<引用文献>

- ・ Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology*. 2005 Jun;128(7):2054-65.
- ・ Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Frank DA, Gores GJ. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology*. 2005 Dec;42(6):1329-38.
- ・ Xu X, Kobayashi S, Qiao W, Li C, Xiao C, Radaeva S, Stiles B, Wang RH, Ohara N, Yoshino T, LeRoith D, Torbenson MS, Gores GJ, Wu H, Gao B, Deng CX. Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2006 Jul;116(7):1843-52.
- ・ Yamada D, Kobayashi S, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Ishii H, Nagano H, Doki Y, Mori M. Role of crosstalk between interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 in epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in biliary tract cancer. *European Journal of Cancer*. 2013 May;49(7):1725-40.
- ・ Nakashima S, Kobayashi S, Nagano H, Tomokuni A, Tomimaru Y, Asaoka T, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Doki Y, Mori M. BRCA/Fanconi anemia pathway implicates chemoresistance to gemcitabine in biliary tract cancer. *Cancer Science*. 2015 May;106(5):584-91.
- ・ Asukai K, Kawamoto K, Eguchi H, Konno M, Nishida N, Koseki J, Noguchi K, Hasegawa S, Ogawa H, Yamada D, Tomimaru Y, Tomokuni A, Asaoka T, Noda T, Wada H, Gotoh K, Marubashi S, Nagano H, Doki Y, Mori M, Ishii H. Prognostic Impact of Peritumoral IL-17-Positive Cells and IL-17 Axis in Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*. 2015 Dec;22 Suppl 3:S1524-31.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Gakuhara Atsushi, Fukuda Shuichi, Yoshihara Terukazu, Fukuda Yasunari, Koga Chikato, Haraguchi Naotsugu, Hida Jin-ichi, Wakasa Tomoko, Kimura Yutaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Endometrioid adenocarcinoma arising from inguinal endometriosis during follow-up for gastric cancer surgery: a case report and literature review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Cancer Conference Journal	6. 最初と最後の頁 68～73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13691-023-00639-1	査読の有無 無
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 木村 豊, 額原 敦, 福田 周一, 福田 泰也, 吉原 輝一, 古賀 睦人, 原口 直紹, 肥田 仁一	4. 巻 57
2. 論文標題 進行食道癌に対する化学療法, 化学放射線療法における栄養管理	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Japanese Journal of SURGICAL METABOLISM and NUTRITION	6. 最初と最後の頁 183～191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11638/jssmn.57.6_183	査読の有無 無
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 Terukazu Yoshihara, Shingo Noura, Tsukasa Tanida, Takayuki Ogino, Kozo Noguchi, Hirotsugu Nagase, Masashi Hirota, Yoshito Tomimaru, Hiroshi Imamura, Keizo Dono	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 The Validity of a New Edition of Classification for Ovarian Metastasis from Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Anus, Rectum and Colon	6. 最初と最後の頁 40-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.23922/jarc.2020-047	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

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 額原 敦, 福田 周一, 吉原 輝一, 福田 泰也, 古賀 睦人, 原口 直紹, 肥田 仁一, 木村 豊
2. 発表標題 甲状腺癌脾臓転移に対して腹腔鏡下脾臓摘出術を施行した1例
3. 学会等名 第36回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田 周一, 額原 敦, 吉原 輝一, 福田 泰也, 古賀 睦人, 原口 直紹, 肥田 仁一, 木村 豊
2. 発表標題 右胃動脈根部引き抜き損傷に対する体腔内縫合とクリッピングを組み合わせた止血法
3. 学会等名 第36回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原口 直紹, 吉原 輝一, 古賀 睦人, 福田 周一, 額原 敦, 福田 泰也, 肥田 仁一, 木村 豊
2. 発表標題 腹腔鏡下結腸切除における体腔内吻合
3. 学会等名 第36回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉原 輝一, 原口 直紹, 福田 泰也, 額原 敦, 福田 周一, 古賀 睦人, 肥田 仁一, 木村 豊
2. 発表標題 当院における横行結腸癌に対する腹腔鏡下結腸切除術の治療成績
3. 学会等名 第36回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古賀 睦人, 辻江 正徳, 吉原 輝一, 額原 敦, 福田 泰也, 福田 周一, 原口 直紹, 肥田 仁一, 木村 豊, 赤丸 祐介
2. 発表標題 胃癌・肝門部胆管癌術後の重症誤嚥性肺炎加療中に診断治療に苦慮したサイトメガロウイルス腸炎の1例
3. 学会等名 日本外科感染症学会 第36回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉原 輝一, 原口 直紹, 大塚 正久, 福田 泰也, 額原 敦, 福田 周一, 古賀 睦人, 肥田 仁一, 木村 豊
2. 発表標題 当院における高齢者の結腸癌に対する腹腔鏡下結腸切除術についての考察
3. 学会等名 第78回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荻野 崇之, 関戸 悠紀, 森 良太, 吉原 輝一, 波多 豪, 浜部 敦史, 三吉 範克, 高橋 秀和, 植村 守, 山本 浩文, 水島 恒和, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 合併症予防や機能温存を目的とした炎症性腸疾患の手術の工夫 当院におけるクローン病に対する腹腔鏡手術と周術期管理の工夫
3. 学会等名 日本外科学会 第123回定期学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荻野 崇之, 吉原 輝一, 森 良太, 宮崎 葉月, 藤本 直斗, 泉谷 祐甫, 長谷川 誠, 関戸 悠紀, 波多 豪, 浜部 敦史, 三吉 範克, 高橋 秀和, 植村 守, 水島 恒和, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 炎症性腸疾患診療における内科と外科の連携アプローチ 潰瘍性大腸炎に対する緊急手術症例の検討
3. 学会等名 第59回日本腹部救急医学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉原 輝一, 荻野 崇之, 藤野 志季, 三吉 範克, 高橋 秀和, 植村 守, 松田 宙, 水島 恒和, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 クローン病に対する腸管再切除術の検討
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉原 輝一, 荻野 崇之, 藤野 志季, 三吉 範克, 高橋 秀和, 植村 守, 山本 浩文, 水島 恒和, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎手術における術前栄養指標と術後早期合併症の検討
3. 学会等名 第75回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉原 輝一, 植村 守, 藤野 志季, 荻野 崇之, 三吉 範克, 高橋 秀和, 山本 浩文, 水島 恒和, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 括約筋間直腸切除術施行後6年後に局所再発を来した早期直腸癌の1例
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉原 輝一, 三吉 範克, 藤野 志季, 荻野 崇之, 高橋 秀和, 植村 守, 山本 浩文, 水島 恒和, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 心移植術後に発症した絞扼性イレウスに対して小腸部分切除術を施行し、二期的に腸管吻合を行った1例
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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