

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08715

研究課題名（和文）近赤外蛍光標識抗体によるclaudin18.2を標的とした胆管癌可視化技術の開発

研究課題名（英文）Visualization of Cholangiocarcinoma Targeting Claudin 18.2 by Near-Infrared Fluorescently Labeled Antibody

研究代表者

及能 大輔（Kyuno, Daisuke）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70563485

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、胆管癌の進展範囲を可視化させるために、claudin-18.2を標的として胆管癌細胞を蛍光発色させる新規技術を開発することである。

切除組織では、胆管癌と前癌病変のBillNで細胞膜上にclaudin-18.2の発現がみられ、正常胆管上皮では発現がほぼみられなかった。癌とBillNの間で発現強度に差は見られず、高分化癌で発現が高度であった。また胆管癌細胞株を用いた実験では、claudin-18.2が特定の胆管癌細胞株の細胞表面に発現しており、培養時にその進展部にも過剰発現することが判明した。市販の複数の抗体と独自に作成した抗体で実験を行い、細胞膜上へ結合する抗体を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Claudin-18.2は胆道の癌細胞や異型上皮において高発現し、正常上皮細胞との鑑別に有用であることが示された。この研究成果は、蛍光染色技術などと組み合わせることにより、胆道癌の診断および手術中のナビゲーション技術の進歩に貢献すると期待される。また、claudin-18.2が腫瘍先進部に発現していた事実などをもとに、発現機構の解析と発現パターンの解明を進めることで、発癌機構の解明や胆道癌の切除支援による治療成績の向上に繋がる可能性がある。さらに、癌細胞特有の発現プロファイルを利用した新たな治療法の開発にも寄与することが予想される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a novel technique for labeling claudin-18.2 in cholangiocarcinoma cells to visualize the extent of cholangiocarcinoma progression. In resected tissue, claudin-18 expression was found on cell membranes in cholangiocarcinoma and BillN, whereas expression was absent in the normal bile duct epithelium. Claudin-18 was highly expressed in well-differentiated carcinomas, and there was no difference in claudin-18 expression between carcinomas and BillNs. In vitro experiments have shown that claudin-18.2 is expressed on the surface of certain cholangiocarcinoma cell lines and is overexpressed in migrating cells. Several original and commercially available antibodies were used in the experiments, and we identified antibodies that bind to the membrane of cancer cells.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：胆道癌 claudin-18.2 術中ナビゲーション技術

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は本邦死因の7番目の悪性新生物で、5年生存率が27%と難治の癌である(国立がん研究センター がん情報サービス)。胆道癌は胆管癌、胆嚢癌、乳頭部癌に分類され、いずれも有効な化学療法に限られるために、外科的治癒切除のみが唯一根治を望める治療である。

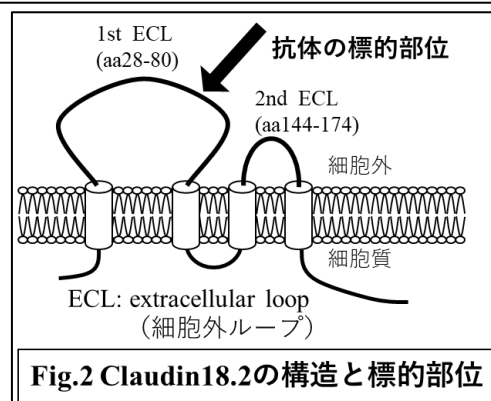
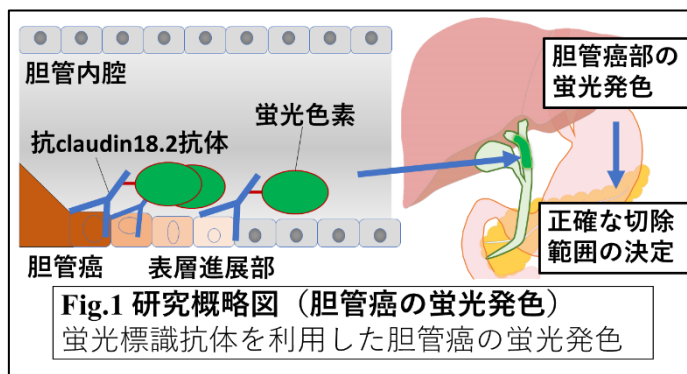
胆管癌の手術は癌の局在により術式が異なり、膵頭十二指腸部、肝臓、あるいはその両者の切除が必要となるため、進展範囲の診断が重要である。癌の局在診断をするために、胆道鏡、胆道造影、胆管狙撃生検などが行われているが、癌部と非癌部の鑑別は容易ではない。特に、胆管炎の影響や癌が胆管上皮を進展する性質(表層進展)により、その正診率は72-90%まで低下する(Kawashima H. Dig Endosc. 2012)。胆管切離端の癌遺残は予後を低下させるため(Tsukahara T. Ann Surg 2017)、癌遺残が無いように切除部位を決定する必要がある。癌の遺残を減らし、かつ過度の臓器切除を回避するために、胆管癌の進展範囲を正確に描出する技術の開発が求められている。

癌細胞と正常上皮細胞の差異のなかで、診断や治療の標的として細胞間接着装置のタイト結合が注目されている。タイト結合とは、claudinを中心に構成される膜貫通蛋白質・膜裏打ち蛋白質の複合体で、胆管癌の細胞表面にはclaudin18が過剰発現している(Shinozaki A. Virchows Arch. 2011)。Claudin18のなかで、癌細胞に高発現するclaudin18.2は、正常胆管上皮には発現していないことから、胆管癌の診断、治療標的として期待されている。これまでに申請者の研究室から、claudin18の免疫染色を行うことで胆管癌部と正常胆管上皮を96.1%の正診率で鑑別可能であり、胆管癌細胞の進展部にclaudin18.2が高発現することを報告している(Keira Y. Virchows Arch. 2015; Takasawa K. Cancer Lett. 2017)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胆管癌の進展範囲を可視化するために、胆管癌細胞に特異的なclaudin18.2を標的として、胆管癌細胞のみを蛍光発色させる新規技術を開発することである。これまでの研究で、胆管癌細胞の表面にはclaudin18.2がびまん性に高発現していることが判明している。

この研究結果を利用して、claudin18.2の抗体に近赤外蛍光色素を結合させて胆管癌部に投与し、癌細胞の蛍光発色を利用した局在診断の有効性を検証する(Fig.1,2)。



3. 研究の方法

(1) 手術標本を利用した胆管癌組織の claudin18.2 発現の評価

胆管癌組織について claudin18.2 の免疫染色を行い、癌組織における claudin18.2 の発現強度と範囲を評価する。当院外科にて切除した胆管癌手術標本を利用して、癌部とその表層進展部、正常胆管上皮について claudin18.2 の発現の有無と強度を免疫染色で評価する。

(2) 胆管癌細胞株を利用した抗 claudin18.2 抗体の結合能の評価

胆管癌細胞株に抗 claudin18.2 抗体を投与して、抗体の結合能や claudin18.2 の局在を評価する。Claudin18.2 を発現する胆管癌細胞株 (TKKK など) と発現していない細胞株 (HEK など) を利用して、抗体の細胞表面への結合を免疫蛍光染色で観察する。抗体は市販されている抗体に加えて、細胞外ドメインをエピトープとした抗体を作成し、その結合能を評価する (Fig.2)。

(3) マウスモデルにおける胆管癌組織への抗体結合能の評価

ヌードマウスの皮下にヒト胆管癌細胞株を移植し、腫瘍を形成した時点で摘出して、腫瘍細胞への claudin18.2 抗体の結合能を評価する。

4. 研究成果

(1) 手術標本を利用した胆管癌組織の claudin18.2 発現の評価

当院で切除した胆道癌 66 症例について、癌部、BiIIN、正常位胆管上皮で Claudin-18 の免疫染色を実施した。抗体は C 末端に結合する抗体を使用した。その結果、Claudin-18 は癌細胞全てに陽性で正常胆管上皮で陰性であった(Fig.3)。

癌細胞の細胞膜の全周性に発現し細胞質にも弱く発現し、分化度と発現強度が比例していた。Claudin-18 は BiIIN でも発現していたが、BiIIN1-3 で発現強度に差は見られなかった。発現強度と範囲の積を発現スコアとしたとき、癌と BiIIN は、正常上皮と有意に異なる発現スコアを示した (Fig.4)。

また、分化度の低下に伴い発現スコアは低下したが、分化度の差に伴う有意差はみられなかった。癌/BiIIN と正常上皮の鑑別を目的に発現スコアで ROC 曲線を引くと、感度: 0.956, 特異度: 0.968 と高値を示し、鑑別に有用であることが示唆された。Claudin-18 の発現強度と予後の関係について、遠位胆管癌 22 例の生存解析を行ったところ、発現スコアと生存率に有意な相関はなかったが、cld18 発現強度が低い症例で生存期間が長い傾向がみられた (Fig.5)。

以上より、癌/BiIIN と正常胆管上皮の間で、claudin-18 の発現スコアに有意差がみられ、高分化型胆道癌および BiIIN で claudin-18 が強く発現しており、細胞の分化度と claudin-18 発現スコアの相関、そして鑑別への応用が示唆される結果となった。

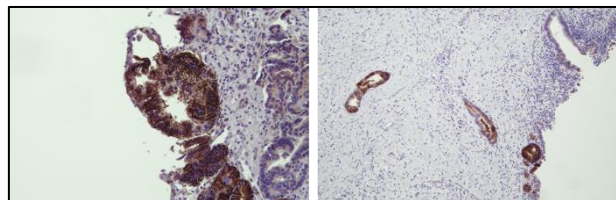


Fig.3 胆管癌の Claudin-18 染色像

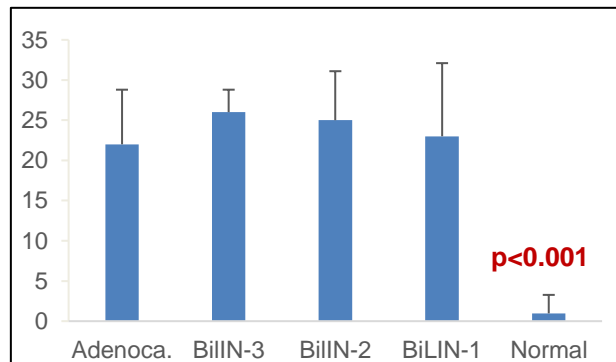


Fig.4 胆管組織と Claudin-18 発現スコア

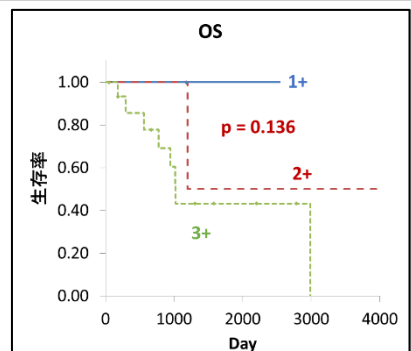


Fig.5 発現強度による生存解析

(2) 胆管癌細胞株を利用した抗 claudin18.2 抗体の結合能の評価

Claudin18.2 は細胞外ドメインを 2 つ有しており、Claudin18.1 と 18.2 では細胞外ドメイン-1 が異なる。細胞外ドメイン-1 をエピトープとした抗体をウサギ血清から作成した。また、マウスからも作成中である。さらに、市販抗体から理論上細胞外ドメイン-1 に結合する抗体を 1 抗体、理論上細胞外ドメイン-2 に結合を 1 抗体、C 末端に結合する抗体を 3 抗体購入した。それぞれを用いて胆管癌切除標本およびマウス皮下で生成された胆管癌細胞株標本に対する免疫染色、胆管癌細胞株に対する蛍光免疫染色を施行したところ、それぞれ染色される部位が異なり、細胞膜上に結合する抗体を 2 抗体同定した (Fig.6)。これらの抗体は今後蛍光物質を付加し、胆管癌を含めた癌切除標本の染色性があるかどうかを調べる予定である。

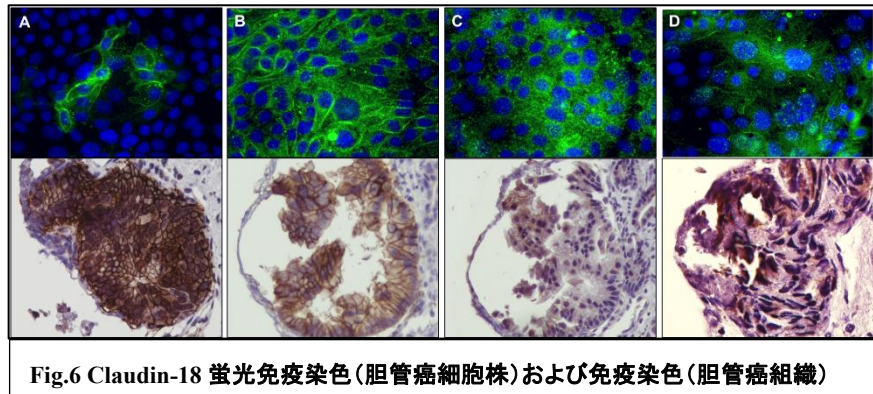


Fig.6 Claudin-18 蛍光免疫染色(胆管癌細胞株)および免疫染色(胆管癌組織)

(3) マウスモデルにおける胆管癌組織への抗体結合能の評価

ヌードマウスに胆管癌細胞株を皮下移植し、形成した腫瘍に対して抗体 A、B で claudin-18 の免疫染色を行ったところ、腫瘍外側に染色性が高く内部では染色が乏しい結果であった (Fig.7)。部位により染色される腫瘍細胞内局在が異なっており、解析をすすめている。

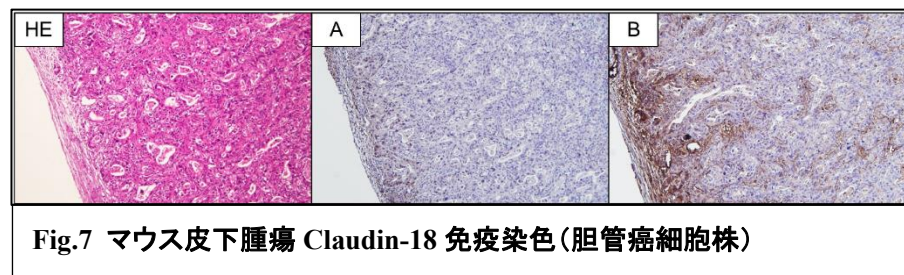


Fig.7 マウス皮下腫瘍 Claudin-18 免疫染色(胆管癌細胞株)

今後は特定した抗体に蛍光色素を結合させて、in vitro/in vivo で腫瘍に対して投与を行うことで、抗体の結合能と蛍光発色能について評価する予定である。さらにその結果を受けて、胆管癌切除標本について蛍光発色が得られる条件を特定したいと考えている。

これらの研究成果は、胆道癌の診断および手術中のナビゲーション技術の進歩に貢献すると期待される。Claudin-18 の発現パターンの解明により、胆道癌の精密な切除を支援し、患者の治療成績の向上に繋がる可能性がある。また、癌細胞特有の発現プロファイルを利用した新たな治療法の開発にも寄与することが予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kyuno Daisuke, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Ono Yusuke, Aoyama Tomoyuki, Magara Kazufumi, Nakamori Yuna, Takemasa Ichiro, Osanai Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Claudin-18.2 as a therapeutic target in cancers: cumulative findings from basic research and clinical trials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 1967080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2021.1967080	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 Kyuno Daisuke, Takasawa Akira, Kikuchi Shin, Takemasa Ichiro, Osanai Makoto, Kojima Takashi	4. 巻 1863
2. 論文標題 Role of tight junctions in the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183503 ~ 183503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183503	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 Takasawa Kumi, Takasawa Akira, Akimoto Taishi, Magara Kazufumi, Aoyama Tomoyuki, Kitajima Hiroshi, Murakami Taro, Ono Yusuke, Kyuno Daisuke, Suzuki Hiromu, Osanai Makoto	4. 巻 565
2. 論文標題 Regulatory roles of claudin-1 in cell adhesion and microvilli formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 36 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.070	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 Ito Yui, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Murakami Taro, Akimoto Taishi, Kyuno Daisuke, Kawata Yuka, Shano Kodai, Kirisawa Kurara, Ota Misaki, Aoyama Tomoyuki, Murata Masaki, Sugimoto Kotaro, Chiba Hideki, Saito Tsuyoshi, Osanai Makoto	4. 巻 113
2. 論文標題 Aberrant expression of claudin 6 contributes to malignant potentials and drug resistance of cervical adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1519 ~ 1530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15284	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 及能大輔、木村康利、高澤啓、計良淑子、太田盛道、永山稔、今村将史、西舘敏彦、沖田憲司、信岡隆幸、小山内誠、竹政伊知朗
2. 発表標題 胆道癌におけるタイト結合分子claudin18の発現状態を利用した病理学的診断および根治切除後の予後予測への有用性
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 真柄 和史、高澤 啓、高澤 久美、小野 佑輔、及能 大輔、仲盛 優菜、小山内 誠
2. 発表標題 乳がんにおけるタイト結合分子JAM-Aの役割
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高澤 啓、伊藤 祐衣、高澤 久美、村上 太郎、太田 未咲、青山 智志、小野 祐輔、及能 大輔、小山内 誠
2. 発表標題 子宮頸部腺癌で異所性高発現するclaudin-6はがん悪性化に寄与する
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田 未咲、高澤 啓、高澤 久美、青山 智志、小野 祐輔、及能 大輔、小山内 誠、長谷川 匡
2. 発表標題 乳がんにおけるタイト結合関連タンパク質LSRの膜型エストロゲン受容体GPR30を介した発現調節とその意義
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 及能 大輔, 高澤 啓, 高澤 久美, 真柄 和史, 小山内 誠
2. 発表標題 膵癌患者の予後と癌進展におけるJAM-Aの役割(Junctional Adhesion Molecule-A may play a role in the progression of pancreatic cancer)
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高澤 啓, 秋元 太志, 高澤 久美, 及能 大輔, 小山内 誠
2. 発表標題 子宮頸部腺がんで異所性発現するCLDN6はがん悪性化と薬剤耐性に寄与する(Aberrant expression of claudin-6 contributes to malignant potentials and drug resistance of cervical adenocarcinoma.)
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真柄 和史, 高澤 啓, 高澤 久美, 及能 大輔, 小山内 誠
2. 発表標題 タイト結合分子JAM-Aの異常高発現が乳がんの悪性化に關与する(Elevated expression of JAM-A contributes malignant progression of breast cancer)
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 及能 大輔, 高澤 啓, 高澤 久美, 小野 佑輔, 真柄 和史, 仲盛 優菜, 小山内 誠
2. 発表標題 膵癌におけるJAM-Aの機能
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高澤 啓, 高澤 久美, 青山 智志, 村上 太郎, 真柄 和史, 小野 佑輔, 及能 大輔, 小山内 誠
2. 発表標題 タイト結合蛋白質Claudin-1は細胞接着、微絨毛形成を制御する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真柄 和史, 高澤 啓, 高澤 久美, 小野 佑輔, 及能 大輔, 小山内 誠
2. 発表標題 乳がんにおいてJAM-Aの異常高発現が悪性化に関与する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真柄和史, 高澤啓, 高澤久美, 青山智志, 小野佑輔, 及能大輔, 小山内誠
2. 発表標題 乳癌におけるJAM-Aの発現とその意義
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤祐衣, 高澤啓, 車野晃大, 桐澤くらら, 高澤久美, 青山智志, 小野祐輔, 及能大輔, 小山内誠
2. 発表標題 子宮頸部腺癌におけるclaudin-6発現とその意義
3. 学会等名 第67回日本病理学会秋季特別総会
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	高澤 啓 (Takasawa Akira) (00593021)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究 分担者	木村 康利 (Kimura Yasutoshi) (80311893)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	

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