

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 5月 29日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790823

研究課題名（和文）：胆管細胞癌浸潤における癌組織内間質構築の意義

研究課題名（英文）：Significance of the structure of cancer stroma in intra-hepatic cholangiocellular carcinoma

研究代表者

桑原 礼一郎（KUWAHARA REIICHIRO）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30389275

## 研究成果の概要（和文）：

胆管細胞癌（IHCCC; intra-hepatic cholangiocellular carcinoma）の病理学的基本像は腺癌で、線維性間質がよく発達しているのがIHCCCの特徴である。癌間質組織中の線維芽細胞は癌関連線維芽細胞（CAF; cancer-associated fibroblast）と呼ばれ、癌細胞の増殖・浸潤に適した細胞外環境を構築する。CAFの起源については、①組織中に存在していた線維芽細胞の増殖・分化、②骨髄細胞の生着・分化、③癌細胞からのEMT、などが想定されているが、IHCCCではCAFの由来について検討を行った報告はない。

まず、胆管細胞癌組織内での間質細胞の由来を検討するための動物実験を開始した。久留米大学病理学講座にて樹立したヒト由来胆管細胞癌細胞株（KMC-1）にretroviral vector pRetroQ-AcGFPN1（Clontech社）を用いて遺伝子導入を行い、恒常的にGFP蛋白を発現する胆管細胞癌細胞株（以下GFP/KMC-1）を樹立した。この細胞株は実験動物において癌細胞由来の細胞を容易に検出するために樹立した。上記の作製したGFP/KMC-1のphenotypeを免疫細胞化学、Western blotting法により検討し、異種移植に用いる細胞クローンの選択を行った。作成したGFP/KMC-1をBALBc/nudeマウスの複数部位に接種し、腫瘍形成能が安定した接種部位は皮下及び腹腔内投与であった。BALBc/nudeマウスにGFP/KMC-1を接種し腫瘍を作成し、腫瘍組織の採取を行った。マウスから採取した腫瘍組織をFISH法と免疫組織化学の技法を用いてCAFの由来を検索中である。また、臨床検体の検討では、腫瘍組織におけるEMT遺伝子の発現を免疫組織化学で解析を行い、CAFに囲まれる癌浸潤先進部においてSnailやTwistといったEMT関連遺伝子の発現亢進があることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Intra-hepatic cholangiocellular carcinoma (IHCCC) is adenocarcinoma, characterized by the enrichment of fibrous stroma. Fibroblasts, recognized as cancer-associated fibroblasts (CAF), are surrounding the solid tumor and promote invasion and metastasis of the cancer cells. The putative origins of CAF are ① fibroblast in the organ, ② bone marrow, ③ epithelial-mesenchymal transition of cancer cells. No investigation for the origin of CAF in IHCCC is reported to date.

By the transfection method with the retroviral vector pRetroQ-AcGFPN1 (Clontech), the human IHCCC cell line (GFP/KMC-1) which expresses GFP protein constantly was established. The clone was characterized by immunohistochemistry and western blotting of epithelial

and mesenchymal markers and selected for xenografts in BALB c/nude mice. The optimum injection sites for the tumor formation were subcutaneous tissue and abdominal cavity. Tumor tissue were taken approximately day 20 following xenograft of GFP/KMC-1. The analyses of immunohistochemistry and FISH are underway to investigate the origin of CAF in IHCCC.

In the investigation for the expression of EMT genes in the human resected tumors, we found that Snail and Twist genes are expressed at the invasive front of tumors surrounding by CAF.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器病学

キーワード：肝臓病学

#### 1. 研究開始当初の背景

胆管細胞癌 (IHCCC; intra-hepatic cholangiocellular carcinoma) は本邦で発生する原発性肝癌の約 1 割を占め、近年には本邦のみならず、世界的にも発生率、死亡率ともに増加していると言われている。IHCCC の長期予後を期待できる治療法は根治切除であるが、発見時にすでに進行し切除不能である症例や、切除後再発の頻度が高いのが現状である。IHCCC のハイリスク因子として肝内結石症、先天性胆道拡張症、原発性硬化性胆管炎、ウイルス性肝炎、肝吸虫などがある。肝硬変自体が、その成因に関わらず IHCCC の危険因子であり、正常人の 10~27 倍の危険率とされる。本邦での肝硬変の主因である B 型および C 型肝炎にも IHCCC との関連が示唆され、その発生率は正常人の 1000 倍であったと報告されている。IHCCC の病理学的基本像は腺癌で、高分化から低分化のものまで分化度は様々で、円柱状あるいは立方状の腫瘍細胞が、前者では乳頭状に、後者

では腺管状に増殖する。両者に共通して線維性間質がよく発達しているのが IHCCC の特徴であり、これは肝細胞癌 (HCC; hepatocellular carcinoma) 等の他の原発性肝癌と異なる病理学的特徴である。

ヒトの癌のほとんどは上皮由来であり、癌細胞はその発生初期においては明確な細胞極性 (apico-basal polarity) を有す。ところが、腫瘍の悪性化に伴って細胞は極性を失っていく。極性が崩壊すると上皮-間葉転換 (EMT; epithelial-mesenchymal transition) が起こり、それに伴い癌細胞は浸潤・転移能を獲得するようになる。病理学的には、癌浸潤というのは癌細胞が細胞外基質を部分的に壊しつつ、同時に基質への接着を足場に遊走し、移動していく現象とも言える。

癌組織は癌細胞と間質細胞から成り立っている。この間質組織は上皮細胞を支える結合組織であるが、線維芽細胞や血管内皮細胞、炎症細胞などの細胞成分と、

それを取り巻く間質から成り立っている。近年には、癌細胞と癌組織中の間質細胞との相互作用が癌組織形成、生存、浸潤、転移に寄与することが明らかにされてきた。病理学的検討からは、癌間質組織中の線維芽細胞は癌関連線維芽細胞 (CAF; cancer-associated fibroblast) と呼ばれ、正常組織中の線維芽細胞とは異なる性質を持つことが示唆されている。CAF が癌細胞と相互作用し、癌細胞の増殖・進展を促進させることはこれまでに多くの報告がある。CAF はコラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生して癌組織の線維化に関与し、さらには細胞外マトリックスを分解する MMP (matrix metalloproteinase) も産生し、癌細胞の増殖・浸潤に適した細胞外環境を構築する。

近年、癌幹細胞の存在が注目されており、CAF の一部が癌幹細胞ニッチの形成に関与していることが推測される。様々な組織幹細胞において幹細胞の特性を維持するための自己複製に関与する分子群として Wnt/ $\beta$ -catenin, Hedgehog, Notch シグナル系が同定された。肝腫瘍においてもこれらのシグナル系の異常が多数報告されている。FACS を用いて分離された肝幹/前駆細胞の自己複製異常が直接的に発癌に関与することが実験的に証明されており、この発生した腫瘍細胞の組織系が IHCCC に類似していることが確認されている。従来より肝発癌モデルにおいては、肝細胞と胆管細胞への二分化能を有した未分化な肝前駆細胞である oval cell が過剰増殖することが判明しており、組織中に存在する肝幹細胞/前駆細胞が発生母地とする仮説がある。臨床的にも HCC と IHCCC の中間的性格

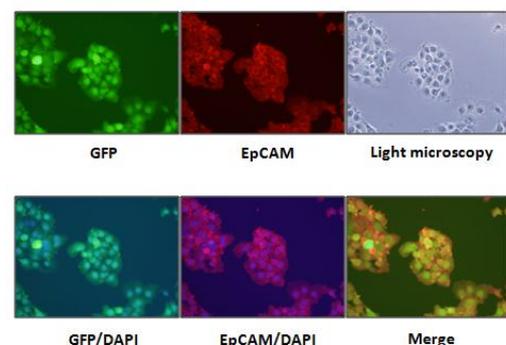
を呈する混合性肝癌 (combined hepatocellular and cholangiocarcinoma) が存在することも知られており、肝臓においては組織幹細胞を発生母地とした癌化プロセスの可能性が示唆されている。申請者らは Label-Retaining Cell Assay の実験系を用いて、肝幹細胞ニッチとして解剖学的に 4 か所の候補を同定したが、このニッチ近傍に存在する線維芽細胞などの間葉系細胞と肝幹細胞との相互作用に癌化プロセスの一因があるのではないかと推測している。

CAF の起源については、①組織中に存在していた線維芽細胞の増殖・分化、②骨髄細胞の生着・分化、③癌細胞からの EMT、などが想定されている。①については、近接する癌細胞からの刺激によって線維芽細胞、あるいはその前駆細胞からの増殖が起こると考えられる。②については骨髄細胞を担癌マウスに移植すると、癌間質に生着して筋線維芽細胞を構成し得るとの報告もある。また、乳癌組織では間葉系幹細胞を取り込み、この間葉系幹細胞が筋線維芽細胞に分化し得るとの報告もある。IHCCC では CAF の由来について検討を行った報告はなく、また IHCCC と CAF の相互作用は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、胆管細胞癌組織内で起こる間質の構築が、癌細胞浸潤を支持し悪性度を上げるものであるのか、あるいは生体側の防御機構であるのかを知ることであ

## 3. 研究の方法



胆管細胞癌組織内での間質細胞の由来の検討（実験動物を用いた検討）

- 恒常的に GFP を発現する胆管細胞癌細胞株の樹立
- 形質変換した胆管細胞癌細胞株の至適接種部位および至適接種細胞数の検討
- 免疫組織化学と *FISH* 法を用いた腫瘍組織内細胞の由来の同定

胆管細胞癌での EMT regulator の発現パターンと臨床的特徴の検討（臨床研究）

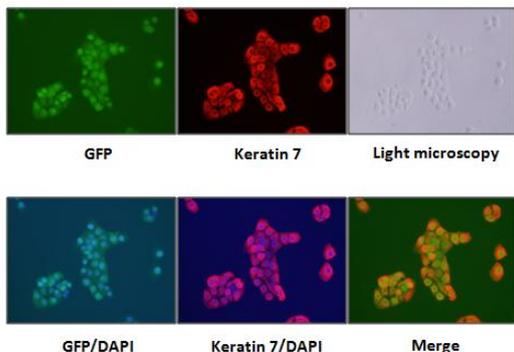
- 免疫組織化学を用いた腫瘍組織構築における間葉マーカー発現の検討

#### 4. 研究成果

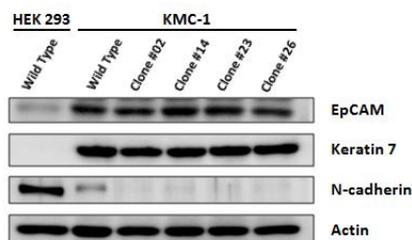
胆管細胞癌組織内での間質細胞の由来の検討（実験動物を用いた検討）

① 恒常的に GFP を発現する胆管細胞癌細胞株の確立

本学病理学講座にて樹立された胆管細胞癌細胞株 (KMC-1) に retroviral vector pRetroQ-AcGFPN1 (Clontech 社) 用いて遺伝子導入を行い、恒常的に GFP を発現する胆管細胞癌細胞株 (以下 GFP/KMC-1) を作成した。



次に、この細胞株を single clone 化し、western blot 法によって遺伝子導入により細胞特性に変化がないことを確認し、異種移植に用いる細胞株の選択を行った。



② 形質変換した胆管細胞癌細胞株の至適接種部位および至適接種細胞数の検討

GFP/KMC-1 を BALBc/nude マウスの皮下、脾臓、肝臓、腹腔内に接種し、細胞株の生着性の検討を行った。この実験では、腫瘍形成能が安定した接種経路は皮下と腹腔内投与であった。これらの接種部位では GFP/KMC-1 の至適投与細胞数は 100,000 であった。

③ 免疫組織化学と *FISH* 法を用いた腫瘍組織内細胞の由来の同定

免疫組織化学（多重染色法）を用いて行った検討は下記の項目である。

- FSP-1/GFP
- Vimentin/GFP
- Alpha SMA/GFP
- TEM-1/GFP
- N-cadherin/GFP

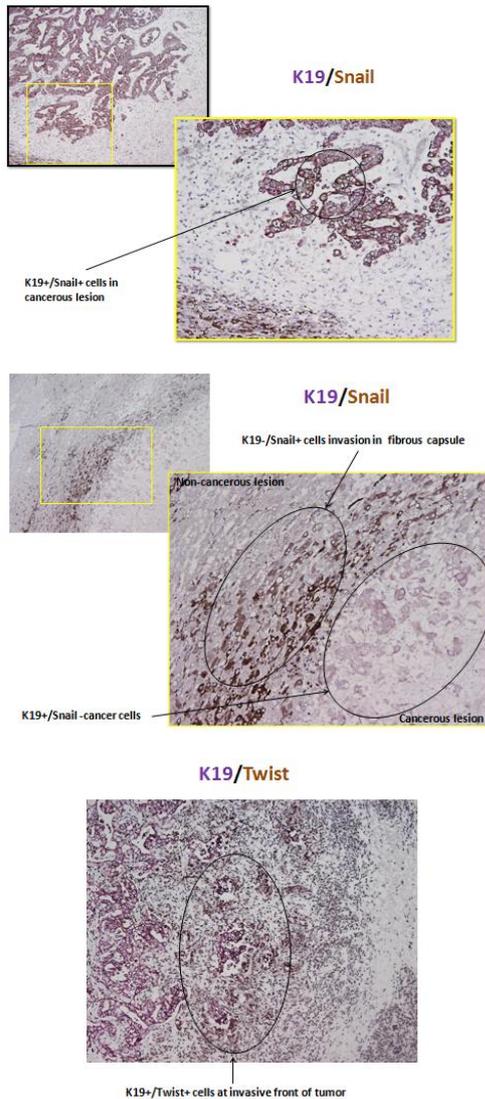
免疫組織化学 + *FISH* 法を用いて行った検討は下記の項目である。

- FSP-1/human Y chromosome
- Alpha SMA/human Y chromosome

何れの検討項目も間質細胞の由来を検討するために、組織染色法の確立のために至適条件の設定を確認中である。

胆管細胞癌での EMT regulator の発現パターンと臨床的特徴の検討（臨床研究）

④ 免疫組織化学を用いた腫瘍組織構築における間葉マーカー発現の検討



癌切除標本を用いた検討では、EMT 関連遺伝子の発現は、CAF に囲まれた癌浸潤先進部において認められる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Japanese patients with autoimmune hepatitis type 1. Hino-Arinaga T, Ide T, Kuromatsu R, Miyajima I, Ogata K, Kuwahara R, Hisamochi A, Torimura T, Sata M; Autoimmune Hepatitis Study Group. J Gastroenterol 2012, 47 (5): 569-576. (査読有)

2. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. Yoon SM, Gerasimidou D, Kuwahara R, Hytiroglou P, Yoo JE, Park YN, Theise ND. Hepatology 2011, 53 (3): 964-973. (査読有)

3. Metronomic S-1 chemotherapy and vandetanib: an efficacious nontoxic treatment for hepatocellular carcinoma. Iwamoto H, Torimura T, Nakamura T, Hashimoto O, Inoue K, Kurogi J, Niizeki T, Kuwahara R, Abe M, Koga H, Yano H, Kerbel RS, Ueno T, Sata M. Neoplasia 2011, 13 (3): 187-197. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑原 礼一郎 (KUWAHARA REIICHIRO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30389275

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者