様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　23 年　4 月　12 日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：　2009～2010
課題番号：21790346
研究課題名（和文）　胆管癌の浸潤・転移に関する分子病理学的研究：癌細胞の上皮・間葉変換機構に着目して
研究課題名（英文）　Molecular pathology of the mechanism of the invasion and metastasis of cholangiocarcinoma - From the aspects of epithelial-mesenchymal transition
研究代表者
佐藤　保則（SATO YASUNORI）
金沢大学・医学系・講師
研究者番号：30324073

研究成果の概要（和文）：
上皮・間葉変換機構（epithelial-mesenchymal transition, EMT）は癌の浸潤・転移に深く関与している。本研究は胆管癌の浸潤・転移におけるEMTの関与を明らかにすることを目的とした。培養胆管癌細胞と胆管癌の外科的切除材料を用いた検討により、胆管癌の浸潤・転移にはtransforming growth factor-・1とSnailを介した癌細胞のEMTが深く関与しており、予後不良の難治性癌である胆管癌の増悪因子であることが示された。

研究成果の概要（英文）：
Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is an important mechanism behind the initiation of cancer invasion and metastasis. This study was performed to clarify the involvement of EMT in the progression of cholangiocarcinoma. Studies using cholangiocarcinoma cell lines and surgically resected specimens of cholangiocarcinoma demonstrated that EMT induced by transforming growth factor-β1/Snail activation was closely associated with the aggressive growth of cholangiocarcinoma, resulting in a poor prognosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総　計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：病理学
科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般
キーワード：人体病理学、肝臓、胆管癌、上皮・間葉変換

１．研究開始当初の背景

胆管癌は診断時、既に進行した症例が多く、代表的な難治性癌の一つである。胆管癌症例の全国調査では，胆管癌の５年生存率は外科的切除可能例で 26%，切除不能例はほぼ 0%となっており，その予後は不良である。

胆管癌の大部分は腺癌であり、慢性炎症などによる慢性胆管上皮障害を基盤とする胆管癌の発生は，前癌病変である胆管上皮ディスプラジアから上皮内癌、さらに浸潤癌へと多段階の発癌過程を示すことが明らかとなっている。

近年、癌の浸潤・転移は上皮-間葉変換（epithelial-mesenchymal transition、EMT）に基づくという考え方が広く検証されている。最も強力な EMT 誘導因子として transforming growth factor (TGF)-・が知られており、癌細胞は TGF-・の作用により間葉系細胞の形質を獲得し間質へと浸潤する。

２．研究の目的

本研究は、胆管癌として特に肝門部および肝外胆管癌に着目し、培養系および人体材料を用いて、TGF-・と転写因子 Snail を介した EMT の観点から胆管癌の浸潤・転移機構の解明を試みることを目的とした。

３．研究の方法

In vitro での検討として、胆管癌細胞株（CCKS-1, TFK-1）を使用し、TGF-・1 投与による上皮系細胞マーカー(E-cadherin, CK19)，間葉系細胞のマーカー（S100A4, vimentin）の発現や細胞増殖能，浸潤能の変化を評価した。細胞増殖能は WST-1 assay で，細胞浸潤能は Invasion chamber を用いて評価した。また、EMT 阻害分子として知られる可溶性 TGF-・ type II レセプターや bone morphogenic protein-7 (BMP7)投与で EMT の抑制を試みた。

In vivo での検討として、胆管癌細胞（CCKS-1）をヌードマウスに移植した xenograft model による解析を行った。ヌードマウスに CCKS-1 を移植後，腹膜播種の程度を検討した。形成された播種巣から組織切片を作製し，Snail，CK19，vimentin に対する免疫染色を行った。

さらに、胆管癌の外科的切除材料の組織切片を用い、Snail，CK19，vimentin に対する免疫染色を行った。染色結果を半定量的に評価し，EMT に関連した癌細胞の免疫組織化学的形質がリンパ節転移や癌の stage、生存期間と相関するかどうかを検討した。

４．研究成果

培養胆管癌細胞（CCKS-1，TFK-1）に EMT の誘導分子である TGF-・1 を作用させると，CCKS-1 の細胞形態は類上皮様から線維芽細胞様の紡錘形の形態に変化した。TFK-1 は類上皮様から多角形の大型細胞となった。

TGF-・1 の作用により，CCKS-1 と TFK-1 において上皮系細胞マーカー（E-cadherin，CK19）の発現が低下，間葉系細胞マーカー（S100A4，vimentin）の発現が誘導され、これらの変化は real-time PCR 法による遺伝子レベル，および免疫細胞化学による蛋白レベルで確認された。EMT 関連の転写因子である Snail も癌細胞の核においてその発現が誘導された。さらに、細胞浸潤能は TGF-・1 の作用により有意に亢進した。

これら TGF-・1 による一連の変化は可溶性 TGF-・ type II レセプターを用いた TGF-・1 のシグナル伝達ブロッキングにより抑制さ

れたが、TGF-・1 の Smad 経路の阻害効果を有する BMP-7 では抑制されず，TGF-・1 の作用は非 Smad 経路を介した細胞内シグナル伝達による可能性が示唆された。

CCKS-1 をヌードマウスの腹腔内に移植後、3 週間目に開腹すると、肉眼的にも観察可能な腹膜播種結節が散在性に認められた。CCKS-1 を移植後、リコンビナント TGF-・1 (200 ng)を連日腹腔内投与したところ、腹膜にびまん性の播種巣が形成され、腹膜播種は悪化した。TGF-・1 投与と同時にリコンビナント可溶性 TGF-・ type II レセプター(4 mg)を投与すると、TGF-・1 による腹膜播種の増悪は改善した。

胆管癌の外科的切除材料を用いた免疫染色による検討では、癌細胞が Snail の発現を示す症例は CK19 の発現が低下、vimentin の発現が亢進していた。さらに，免疫染色で Snail が陽性を示す胆管癌症例は陰性症例よりリンパ節転移が高率で，かつ生存期間が有意に短かった。

以上の結果から。胆管癌の浸潤・転移には TGF-・1 と Snail を介した癌細胞の EMT が深く関与していることが示され，予後不良の難治性癌である胆管癌の増悪因子であることが示された。胆管癌治療の観点からは，胆管癌において TGF-・1 のシグナリングをブロックすることが，癌の進展を抑制する可能性があることが示唆された.

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 2 件）

① Sato Y, Harada K, Itatsu K, Ikeda H, Kakuda Y, Shimomura S, Ren XS, Yoneda N, Sasaki M, Nakanuma Y. Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-・1/Snail activationaggravates invasive growth of cholangiocarcinoma. Am J Pathol 177 (2010), 141-152, 査読有

② 佐藤保則、原田憲一、中沼安二. 胆管硬化と EMT. 肝胆膵、62 (2011), 743-750, 査読無

〔学会発表〕（計 3 件）

① Sato Y, Yoneda N, Ren XS, Sasaki M, Harada K, Nakanuma Y. Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-・1 aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma. 60th AASLD, 2009.11.2, John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center (USA)

② 佐藤保則、下村修治、角田優子、池田博子、佐々木素子、原田憲一、中沼安二. 胆管癌の浸潤・転移機構における上皮－間葉変換（EMT）の関与. 第 45 回日本肝臓学会総会、2009 年 6 月 5 日、神戸ポートピアホテル（兵庫県）

③ 佐藤保則、下村修治、角田優子、池田博子、佐々木素子、原田憲一、中沼安二. 胆管癌の浸潤・転移における上皮・間葉変換機構（EMT）の関与. 第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月 2 日、国立京都国際会館（京都府）

６．研究組織

(1)研究代表者

佐藤　保則（SATO YASUNORI）
金沢大学・医学系・講師
研究者番号：30324073

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし