

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659160

研究課題名(和文)胆管癌、膵癌にみられるIgG4組織反応は癌の免疫抑制を反映している

研究課題名(英文) IgG4 reaction in cholangiocarcinoma and pancreatic carcinoma reflects an evasion from host immunosurveillance by carcinoma

研究代表者

中沼 安二 (NAKANUMA, YASUNI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：10115256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：胆管癌の外科切除材料を収集し、胆管癌およびその前癌病変であるbiliary intraepithelial neoplasm (BillIN)を中心に、癌化に伴うIgG4組織反応およびその発生機序を検討した。胆道癌においてはIgG4陽性形質細胞浸潤を伴う症例が存在し、IgG4組織反応はTreg細胞等を介した腫瘍免疫回避機構を反映すること、また、癌細胞自身がTreg細胞類似の免疫抑制機序を有し、IgG4組織反応に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The relation between cholangiocarcinoma and its precursor lesion (BillIN) and IgG4-related tissue reaction with respect to carcinogenesis was examined. About 30% of cholangiocarcinoma and BillIN showed infiltration of considerable number of IgG4+ plasma cells. There is correlation between expression of Fox3 and IgG4 tissue reaction. Clinicopathological study showed that the cholangiocarcinoma patients with IgG4 tissue reaction showed poor biological behaviors and poor post-operative survival. Cell culture studies showed that cultured cholangiocarcinoma cells express Fox3 mRNA and IL10 mRNA, and cancer cells present immunoregulatory roles by expressing these molecules. It seems plausible that cancer cells themselves are involved in IgG4 tissue reaction. In conclusion, some cholangiocarcinoma showed rich IgG4+ plasma cells and IgG4 tissue reaction reflect an evasion from immunosurveillance of host and cancer cells themselves are involved in IgG4 tissue reaction by playing roles of Tregs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：付属腺 胆道腫瘍 膵腫瘍 膵外分泌腺

## 1. 研究開始当初の背景

IgG4 は、IgG の 3 % 程度と最も少ないサブクラスであるが、自己免疫性膵炎を代表とする IgG4 関連疾患を特徴付ける重要なサブクラスである。IgG4 関連疾患の患者では血中の IgG4 値が高値となり、また、病変部で IgG4 陽性形質細胞の著明な浸潤がみられる。IgG4 関連疾患の病態形成における IgG4 へのクラススイッチまたは IgG4 陽性細胞の増殖分化促進に、Th2 型のサイトカイン環境や Treg 細胞から産生される IL-10 の関与が想定されている。

IgG4 陽性形質細胞の浸潤は、IgG4 関連疾患のみならず膵癌などの悪性腫瘍でも認められ、癌関連免疫と IgG4 組織反応の関連性が想定されている。IgG4 組織反応の発生機序や病的意義については未だ不明である。癌に対する宿主の反応として免疫監視機構があり、癌の発生、進展を抑制しており、細胞障害性 T リンパ球 CTL による監視が重要とされている。また、癌は種々の機構でこの免疫監視機構を回避し、進展すると考えられており、その中で制御性 T 細胞(Treg)を中心とした免疫抑制機序が注目されており、また Treg は IgG4 陽性細胞の分化誘導および維持にも関係し、Th2 型サイトカインである IL-4、IL-10 が重要であり、また IL-10、TGF- $\beta$  産生を特徴とする Foxp3 陽性 Treg 細胞の関与も示唆されている。一方、癌細胞自身が Foxp3 を発現し、IL-10 産生を介した Treg 細胞類似の免疫抑制機序により腫瘍免疫回避に関与することも知られている。

IgG4 組織反応または血清 IgG4 高値を伴う膵癌症例や IgG4 関連疾患を背景に発症した膵癌でも報告されている。胆道系では、IgG4 関連硬化性胆管炎が知られているが、胆管癌では、これら IgG4 関連の免疫現象と癌化、癌の進展との関連性の検討は十分ではない。そこで今回、胆管癌と IgG4 組織反応、IgG4 関連免疫反応との関連性を検討した。

## 2. 研究の目的

我々は Th2 型のサイトカイン環境や Treg 細胞から産生される IL-10 の関与が IgG4 関連疾患の病態に深く関連することを見出した。IgG4 関連疾患で見出したこの現象が、胆管癌、膵癌の IgG4 組織反応でも発生している可能性、つまりこの反応は癌部での免疫抑制に関連しているかを検討する。

1)胆道癌における IgG4 組織反応の発生機序としてと癌組織における Foxp3 発現との関連性を明らかにする。IgG4 関

連硬化性疾患では制御性 T 細胞 Treg の異常増生、免疫抑制性因子 IL-10 や TGF- $\beta$  の発現亢進が知られている。この免疫現象が胆管癌での IgG4 組織反応でもみられるかどうか、またこの反応を宿主の癌に対する免疫監視、癌の免疫抑制(回避)の関連性で検討する。

2)これら患者の血中 IgG4 が患者の癌に対する免疫反応や予後、病期の推定に応用出来るかどうかを検討する。

3) IgG4 組織反応を誘導している物質を、胆管癌、膵癌から抽出を試み、その性状を解析する。さらに、癌組織での IgG4 関連の抗原/抗体系がいわゆる IgG4 関連硬化性疾患の病因・病態に関連する可能性も検討する。特に、癌細胞を攻撃する細胞群 (CTL, NK 細胞等) と攻撃性細胞の抑制に関連する細胞群 (Treg 等)の観点から検討し、本反応が免疫抑制にシフトした現象であることを検証する。4)胆管癌培養株、非腫瘍性の胆管上皮培養株を用い、人体例で認められた所見をさらに培養レベルでも検討する。培養胆管癌での Foxp3 の発現を見出しているか、その機序を遺伝子学的に検討する。

## 3. 研究の方法

1)対象は、金沢大学附属病院およびその関連病院から収集した胆道癌 56 症例の外科的摘出組織、および胆管癌の前癌病変である BillIN 症例。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、通常の HE 染色による組織学的観察に加え、IgG4、CD8 および Foxp3 の免疫染色を施行し、免疫染色陽性細胞の有無および組織学的分布について観察。IgG4、CD8 の免疫染色の半定量的評価法として、IgG4 陽性細胞数の平均を算定した。癌部の IgG4 組織反応と IgG4 関連硬化性胆管炎、自己免疫性膵炎を病理組織学的に比較する。Foxp3 発現は、Treg 細胞と思われる浸潤単核球の他に癌組織部における発現を観察した。

2)胆管癌、膵癌での IgG4 組織反応の臨床病理学的意義を retrospective、prospective に検討し、癌患者の予後判定や治療の選択に応用可能かどうか、検証する。IgG4 組織反応(程度、分布)と胆管癌、膵癌の分化度、浸潤、血管侵襲、リンパ管侵襲、病期、リンパ節転移、臓器転移、手術後の生存日数等との関連性を検討し、IgG4 組織反応を示す胆管癌、膵癌の特徴を明らかにする。

3)腫瘍細胞障害群(CTL,NK 細胞)と免疫抑制群(Treg)の量的分布を検討し、IgG4 陽性形質細胞の分布と数が Treg 頻

度と相関すること、IgG4 組織反応部で免疫抑制群の細胞が優勢で、免疫抑制状態が発生していることを明らかにする

4) 癌組織より RNA を抽出し、RT-PCR 法でサイトカイン mRNA を定量し、Th1 あるいは Th2 サイトカイン、免疫抑制サイトカイン IL10、TGF の免疫環境を検証し、IgG4 陽性反応との関連性を検討する。

5) ヒト胆管癌培養細胞 2 株(HuCCCT1[ヒューマンサイエンス研究資源バンク,大阪], CCKS1)を用いて、Foxp3 と IL-10 の mRNA を RT-PCR 法にて検出し、Foxp3 と IL-10 との関連性を検討する。腫瘍細胞自身が Foxp3 発現を発現、さらには IL-10 を産生し、Treg 細胞と同様な調節性機能を有することにより IgG4 反応を来す可能性を検討した。

#### 4. 研究成果

1) 胆道癌の約 30%の症例で IgG4 陽性形質細胞浸潤がみられ、IgG4 組織反応と考えられた。IgG4 陽性細胞浸潤は胆道癌腫瘍の中心部に比し腫瘍辺縁部の間質浸潤部で目立つ傾向があったが、癌表面の粘膜固有層内に IgG4 陽性細胞浸潤を伴う症例や非癌部胆道粘膜にも IgG4 陽性細胞浸潤を伴う症例もあった。

2) IgG4 組織反応を伴う胆道癌症例では、Foxp3 陽性 Treg 細胞の浸潤が目立った。このことから、胆管癌における Treg 細胞を介した腫瘍免疫回避機構と IgG4 組織反応との関連性を示唆された。

3) CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞は腫瘍周囲および腫瘍細胞間に浸潤を認めたが、IgG4 陽性細胞の浸潤とは相反する傾向があった。さらに、腫瘍部における Foxp3 発現と IgG4 陽性細胞浸潤との関連性を検討した結果、Foxp3 陽性症例における IgG4 陽性細胞浸潤の程度は Foxp3 陰性例に較べて高度であった。

3) IgG4 組織反応陽性胆道癌例では、同陰性例に比べ、リンパ節転移の頻度が高く、また血管侵襲像も高率で、術後の予後も不良であった。このことより、IgG4 組織反応陽性胆道癌例の生物学的悪性度が高いことが示唆された。

4) ヒト培養胆管癌細胞 2 株を用いた検討にて、癌細胞は 2 株とも Foxp3 mRNA を恒常的に発現していたが、一部の Exon 部を欠く splicing variant の存在と Frame-shift による C 末端での新規アミノ酸配列の存在が示唆された。また、癌細胞株 2 株中 1 株に IL-10 mRNA の発現を認めた。

#### 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 5 件)

中沼 安二、佐々木 素子、佐藤 保則、原田 憲一. 特集: PSC・IgG4-SC. PSC の病理診断. 査読有, 肝胆膵 2014;68(1):9-17.

Nakanuma Y, Harada K, Sasaki M, Sato Y. Proposal of a new disease concept "biliary diseases with pancreatic counterparts". Anatomical and pathological bases. 査読有, Histol Histopathol 2014 Jan;29(1):1-10.

Nakanuma Y, Sato Y. Hilar cholangiocarcinoma is pathologically similar to pancreatic duct adenocarcinoma: suggestions of similar background and development. 査読有, J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014 Jan 21. doi: 10.1002/jhbp.70.

Zen Y, Liberal R, Nakanuma Y, Heaton N, Portmann B. Possible involvement of CCL1-CCR8 interaction in lymphocytic recruitment in IgG4-related sclerosing cholangitis. 査読有, J Hepatol 2013 Nov;59(5):1059-64.

原田 憲一、中沼 安二. 特集: IgG4 と肝胆膵. 胆道癌と IgG4 関連病態. 査読有, 肝胆膵 2013;67(3):415-24.

(学会発表)(計 5 件)

中沼 安二. 基調講演: IgG4 関連膵胆道疾患の診断と治療. IgG4 関連膵胆道疾患の病理. 第 17 回日本肝臓学会大会(2013 年 10 月 9 日~10 日、グランドプリンスホテル新高輪, 東京).

原田 憲一、佐藤 保則、中沼 安二. 一般演題. IgG4 関連硬化性胆管炎に見られる BiIN 病変の解析. 第 49 回日本胆道学会学術集会 (2013 年 9 月 19 日~20 日、ヒルトン東京ベイ, 千葉).

Nakanuma Y. Hilar  
cholangiocarcinoma resembles  
pancreatic duct adenocarcinoma  
pathologically - Suggestions of similar  
background and development -. Asian  
IAP (2013. Sep 5-8, Busan Convention  
Center, Busan, Korea).

原田 憲一、佐藤 保則、中沼 安二  
二. 一般演題. IgG4 関連硬化性胆管炎に  
出現する Biliary intraepithelial  
neoplasia (BiIN) 病変. 第 49 回日本肝  
癌研究会 (2013 年 7 月 11 日~12 日、  
京王プラザホテル, 東京).

原田 憲一、中沼 安二. ワークショ  
ップ: IgG4 関連疾患の肝病変. IgG4 関連  
疾患に見られる末梢肝組織病変. 第 49 回  
日本肝臓学会総会 (2013 年 6 月 6 日~  
7 日、京王プラザホテル, 東京).

〔図書〕(計 2 件)

中沼 安二. 南江堂 肝臓を診る医師の  
ための肝臓病理テキスト 2013 年、3 1  
5 ページ

Harada K, Nakanuma Y. Springer Japan,  
IgG4-Related Disease. Sclerosing  
Cholangitis. 2013.147-152 ページ

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者 中沼 安二  
( NAKANUMA YASUNI )  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号 : 10115256