



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝外胆管癌における好中球細胞外トラップ発現の意義と術前胆管炎および臨床病理学的因子との関連性に関する研究
Author(s)	山本, 寛之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第17036号
Issue Date	2026-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k17036
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100089
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAMOTO_Hiroyuki.pdf, 全文



学 位 論 文

肝外胆管癌における好中球細胞外トラップ発現の意義と
術前胆管炎および臨床病理学的因子との関連性に関する研究
(Studies on Neutrophil Extracellular Traps and Its Association
with Preoperative Cholangitis and Clinicopathological Factors in
Patients Who Underwent Surgical Resection for Extrahepatic
Cholangiocarcinoma)

2026 年 6 月

北 海 道 大 学

山 本 寛 之

学 位 論 文

肝外胆管癌における好中球細胞外トラップ発現の意義と
術前胆管炎および臨床病理学的因子との関連性に関する研究
(Studies on Neutrophil Extracellular Traps and Its Association
with Preoperative Cholangitis and Clinicopathological Factors in
Patients Who Underwent Surgical Resection for Extrahepatic
Cholangiocarcinoma)

2026 年 6 月

北 海 道 大 学

山 本 寛 之

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語集	5 頁
緒言	6 頁
方法	10 頁
結果	15 頁
考察	32 頁
結論	35 頁
謝辞	37 頁
利益相反	38 頁
引用文献	39 頁

発表論文目録および学位発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Hiroyuki Yamamoto, Yoshitsugu Nakanishi, Tomoko Mitsuhashi, Yutaka Hatanaka, Kanako Hatanaka, Ayae Nange, Yusuke Yoshida, Norito Ino, Masaru Go, Keisuke Okamura, Takahiro Tsuchikawa, Toru Nakamura, Takehiro Noji, Toshimichi Asano, Aya Matsui, Kimitaka Tanaka, Soichi Murakami, Yuma Ebihara, Yo Kurashima, Toshiaki Shichinohe, and Satoshi Hirano
Impact of Neutrophil Extracellular Traps Identified by Citrullinated Histone H3
Immunohistochemistry for Postoperative Prognosis in Patients with Extrahepatic
Cholangiocarcinomas
Annals of Surgical Oncology, 31・2090-2100, (2024)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 山本 寛之、中西 喜嗣、田中 公貴、松井 あや、浅野 賢道、海老原 裕磨、倉島 庸、野路 武寛、村上 壮一、中村 透、土川 貴裕、岡村 圭祐、七戸 俊明、平野 聡
肝外胆管癌における術前胆管炎と臨床病理学的因子および予後に関する検討学会
名：第122回日本外科学会定期学術集会、2022年4月14-16日・熊本

要旨

【背景と目的】

肝外胆管癌 (extrahepatic cholangiocarcinoma: EHCC) は肝外胆管に発生する腫瘍であり、その主座により肝門部胆管癌 (perihilar cholangiocarcinoma: PHCC) と遠位胆管癌 (distal cholangiocarcinoma: DCC) に亜分類される。いずれも高侵襲を伴う外科的切除が唯一の根治的治療法であるが、生物学的悪性度が高く、現在においても根治切除症例の 5 年生存率は約 40% と術後予後不良である。このように EHCC は依然として治療成績の改善が十分ではなく、新たな予後予測因子および治療標的の探索が求められている。近年、他癌腫の腫瘍微小環境において好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) の腫瘍進展への関与が注目されているが、EHCC における NETs の臨床的意義については不明である。本研究は、EHCC の腫瘍微小環境における NETs の存在と術後予後との関係を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

2000 年から 2018 年に北海道大学病院で根治切除を受けた EHCC 318 例 (PHCC 192 例、DCC 126 例) を対象とした。術前化学療法・放射線療法施行例、周術期死亡例、腫瘍遺残例は除外した。

まず、NETs 形成のバイオマーカーとされるシトルリン化ヒストン H3 (citrullinated histone H3: Cit-H3) 発現が NETs の存在の証明となるかの妥当性を検討するため、無作為に抽出した EHCC 切除検体 10 例を用いて、免疫蛍光染色 (immunofluorescence: IF) および免疫組織化学染色 (immunohistochemistry: IHC) により、ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase: MPO) と Cit-H3 との共局在を評価した。

次に、EHCC 318 例の病理組織検体の代表切片を用いて IHC による Cit-H3 発現を検討した。各症例は Cit-H3 発現の程度に基づき diffuse、intermediate、focal、negative の 4 群に分類し、PHCC および DCC それぞれにおいて、Cit-H3 発現陽性の 3 群間で臨床病理学的因子を検討し、陰性群との全生存期間 (overall survival: OS) の差異について解析した。さらに、Cit-H3 発現の有無で臨床病理学的因子、OS および無病生存期間 (disease-free survival: DFS) の差を検討した。胆管炎の診断は、Tokyo Guidelines 2018 (TG18) に基づき、炎症・胆汁鬱滞・画像診断を組み合わせで診断した。

【結果】

無作為抽出 10 例における Cit-H3 の NETs 存在確認の妥当性についての検討では、IF、IHC において Cit-H3 は好中球周囲の細胞外に顆粒状あるいは線状に発現しており、IHC による Cit-H3 発現評価は NETs の存在を反映する評価法として妥当であると考えられた。Cit-H3 発現陽性 3 群間の比較では、PHCC におけるリンパ節転移の有無にのみ統計的有意差を示したが、その他の臨床病理学的因子については、術前胆管炎の有無も含め、PHCC および DCC のいずれにおいても有意差を認めなかった。生存解析では、PHCC および DCC のいずれにおいても、Cit-H3 発現陽性 3 群は陰性群に比較して有意に予後不良であったが、陽性の 3 群間では有意差を認めなかった。

そこで、Cit-H3 発現陽性 3 群を Cit-H3 陽性群として解析したところ、PHCC ($p=0.0023$) および DCC ($p=0.0007$) において OS は陰性群より有意に不良であった。同様に DFS においても、PHCC ($p=0.0034$)、DCC ($p=0.0009$) で有意差を認めた。

多変量解析では、Cit-H3 陽性群は PHCC (HR 1.69, 95%CI 1.11–2.59, $p=0.0115$)、DCC (HR 2.03, 95%CI 1.21–3.42, $p=0.0057$) の双方において独立した予後不良因子として抽出された。なお、Cit-H3 発現の有無によって再発形式に有意差は認めなかった。

【考察】

本研究は、Cit-H3 発現によって NETs 存在を同定することにより、EHCC における NETs の存在と術後予後との関係を初めて明らかにした。IHC 染色は病理診断で日常的に用いることのできる手技であり、臨床応用が期待される。本研究では術前胆管炎と Cit-H3 発現との間に統計的関連性は認めなかった。さらに、術前胆管炎と Cit-H3 はともに独立した予後不良因子であったことから、炎症由来好中球と腫瘍関連好中球では性質が異なる可能性が示唆された。また、Cit-H3 発現と腫瘍進展に関連する臨床病理学的因子との間に、PHCC および DCC に共通した因子は認められなかった。しかしながら、Cit-H3 陽性は独立した予後不良因子であったことから、EHCC における NETs の存在が原発巣の腫瘍進展よりも、転移誘導に関与している可能性が考えられる。以上より、NETs に関するさらなる研究により、DNase I や好中球エラスターゼ阻害薬などを用いた NETs 標的治療の開発につながることが期待される。また、本研究の知見は EHCC における腫瘍微小環境の理解を深めるものであり、予後層別化および個別化治療戦略の構築に寄与する可能性がある。

【結論】

EHCC 切除検体において、Cit-H3 の IHC により NETs の存在を臨床病理学的に評価可能であることを示した。EHCC の腫瘍微小環境における Cit-H3 発現は、PHCC および DCC の双

方において独立した予後不良因子であった。Cit-H3 と術前胆管炎との関連が認められなかったことから、EHCC の腫瘍微小環境における NETs は、炎症性好中球とは異なる腫瘍関連好中球に由来する可能性が示唆された。本研究は EHCC の再発・転移メカニズム解明に寄与するとともに、NETs 標的治療開発の基盤となると考えられる。

略語集

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

CCA	cholangiocarcinoma
Cit-H3	citrullinated histone H3
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCC	distal cholangiocarcinoma
DFS	disease-free survival
DNA	deoxyribonucleic acid
EHCC	extrahepatic cholangiocarcinoma
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
HE	hematoxylin and eosin
HPD	hepatopancreatoduodenectomy
ICC	intrahepatic cholangiocarcinoma
IF	immunofluorescence
IHC	immunohistochemistry
MPO	myeloperoxidase
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NE	neutrophil elastase
NETs	neutrophil extracellular traps
OS	overall survival
PAD4	peptidylarginine deiminase 4
PHCC	perihilar cholangiocarcinoma
PKC	protein kinase C
por	poorly differentiated adenocarcinoma
ROS	reactive oxygen species
SSPPD	subtotal stomach-preserving pancreaticoduodenectomy
TME	tumor micro-environment
tub1	well differentiated tubular adenocarcinoma
tub2	moderately differentiated tubular adenocarcinoma

緒言

胆管癌(cholangiocarcinoma:CCA)は解剖学的に肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma:ICC)と肝外胆管癌(extrahepatic cholangiocarcinoma:EHCC)に大別される。さらにEHCCは発生部位により、左右肝管から胆嚢管合流部までのものを肝門部胆管癌(perihilar cholangiocarcinoma:PHCC)、胆嚢管合流部より十二指腸側のものを遠位胆管癌(distal cholangiocarcinoma:DCC)に亜分類される(Anderson et al, 2004; Amin MB et al, 2017; Banales et al, 2020)。EHCCは特にアジア地域で多いとされているが、近年、ヨーロッパや北米でも罹患数が増加傾向であり、消化器系の癌全体の3%を占めている(Banales et al, 2020)。

EHCCの臨床的課題としては、第一に、診断の困難さが挙げられる。EHCCは早期段階では自覚症状に乏しく、閉塞性黄疸や胆管炎などの臨床症状が出現した時点では、すでに進行癌として診断されることが多い。画像診断技術は発展してきたものの、腫瘍の局在や進展範囲の正確な評価は依然として限界がある。また、生検や細胞診による確定診断率も低く(Navaneethan et al, 2015)、術前に腫瘍の確定診断が得られないまま手術に臨むことも少なくない。第二に、外科的切除の困難性と高い再発率が挙げられる。EHCCに対する唯一の根治療法は外科的切除であるが、PHCCでは大量肝切除を伴う肝外胆管切除術、DCCでは肝門部胆管までの胆管切除を伴う膵頭十二指腸切除術等と高侵襲手術が標準術式である。また、大量肝切除が必要な症例では、予測残肝機能が基準値を満たさない場合、術後肝不全の危険性が高く手術不能と判断される症例も少なくない。さらに、切除可能と判断されても、術後に早期再発をきたす症例もあり、根治切除例における5年生存率は約40%にとどまる(van der Gaag et al, 2012; Nakanishi et al, 2020)。第三に、胆管閉塞により高頻度に併発する術前胆管炎が挙げられる。術前胆管炎は手術合併症や術後感染リスクを増加させるのみならず、複数の報告で予後不良因子としても示されている(Akita et al, 2017; Wang et al, 2018; Cho et al, 2012)。その病態背景には炎症による腫瘍微小環境の変化が想定されるが、具体的な機序はいまだ明らかではない。第四に、有効な補助療法・全身療法の不足が挙げられる。切除不能例や再発例に対しては化学療法が標準治療で、ゲムシタビンやシスプラチンを中心としたレジメンが用いられるが、奏効率や生存率の改善は限定的である。近年ではEHCCに対する分子標的治療や免疫チェックポイント阻害薬の有効性が報告されているが、分子異常を有する症例に限られている(Le et al, 2017; Oh et al, 2022)。したがって、EHCCの治療成績の向上には新規治療標的や予後マーカーの探索が喫緊の課題である。

癌と宿主免疫系との相互作用は、発癌から進展、さらには転移に至るまでの全過程において極めて重要な役割を果たすことが知られている。なかでも「癌関連炎症(cancer-related

inflammation)」は、腫瘍の第七の特徴的性質 (hallmark of cancer) として提唱されており、患者予後を左右する宿主関連因子の一つと考えられている (Diakos et al, 2014; Colotta et al, 2009)。炎症環境は腫瘍の微小環境 (tumor micro-environment: TME) に大きな影響を与え、腫瘍の浸潤能、血管新生、免疫回避、転移能の獲得など、多方面にわたり腫瘍の生物学的特性を変化させる。その炎症細胞群のなかで、好中球は最も豊富に存在する細胞種であり、腫瘍浸潤免疫細胞の主要な構成要素を形成する (Smith and Kang, 2013)。従来、好中球は自然免疫における第一線の防御担当細胞として位置づけられてきたが、近年では腫瘍との相互作用を通じて腫瘍の進展を促進し得ることが報告されている (Coffelt, 2016)。特に注目されているのが、好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) である (Papayannopoulos, 2018)。

NETs は deoxyribonucleic acid (DNA) を基盤とする細胞外クロマチン構造であり、細胞質成分、顆粒成分および核成分を含む網状の構造物として放出される。NETs は当初、細菌や真菌に対する殺菌機構として報告され (Brinkmann et al, 2004; Saffarzadeh et al, 2012)、その後、自己免疫疾患や血栓形成、さらには悪性腫瘍の病態形成に深く関与することが明らかとなった (Boeltz et al, 2019; Martinod and Wagner, 2014)。腫瘍領域においては、NETs が腫瘍細胞の浸潤・遊走を促進し、血管内皮への接着や遠隔転移の成立に寄与することが報告されている (Shao et al, 2021; Cools-Lartigue et al, 2014; Papayannopoulos, 2018; Jorch and Kubes, 2017)。循環腫瘍細胞を捕捉し播種を助けるとともに、休眠状態にある腫瘍細胞を覚醒させ転移巣形成を促すことが示されている (Albregues et al, 2018)。また、NETs は局所免疫抑制的環境を形成することで免疫療法の効果を減弱させる可能性も指摘されており、近年では NETs 抑制と免疫療法の併用が新規戦略として注目されている (Wang et al, 2024; Mousset et al, 2024)。

NETs の形成 (NETosis) では、好中球の toll-like receptor (TLR) をはじめとする受容体にリガンド、免疫グロブリン、補体、サイトカインなどが結合して受容体が活性化されると、小胞体に貯蔵されていたカルシウムイオンが細胞質内に放出される (図 1)。細胞質内のカルシウム濃度の上昇により protein kinase C (PKC) の活性化が誘導され、PKC の作用により nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase が活性化して活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が産生される (Kaplan and Radic, 2012)。NADPH oxidase の先天的欠損症である慢性肉芽腫症患者は ROS を産生できないため NETs を形成できず、遺伝子治療で酸化酵素機能を補うと NETs 形成が回復することが示されている (Fuchs et al, 2007; Bianchi et al, 2009)。また、好中球のアズール顆粒に含まれる neutrophil elastase (NE) や myeloperoxidase (MPO) は核に移行し、NE はヒストンを切断してクロマチン脱凝縮を促進し、MPO も NE と相乗的に脱凝縮を進める (Papayannopoulos et al, 2010)。MPO を完全に欠損した患者由来の好中球は

NETsを形成できないことが報告されている(Metzler et al, 2011)。ヒストンのアルギニン残基をシトルリン化する peptidylarginine deiminase 4 (PAD4)は、核局在性で Ca^{2+} 依存に活性化され、ヒストン尾部のアルギニンをシトルリン化することで DNA との結合性を弱め、クロマチンの脱凝縮を惹起する(Wang et al, 2009)。PAD4 欠損マウスの好中球では NETs 形成が著しく障害され、抗菌応答が低下する(Li et al, 2010)。したがって、NE、MPO および PAD4 は NETs 形成に重要な分子であると考えられる。

近年、胆道癌を含む消化器癌においても NETs の関与が報告されているが、特に EHCC における NETs の臨床的意義は十分に解明されていない。EHCC では術前胆管炎を高頻度に合併することから、炎症性環境下で好中球が活性化し NETs が形成され、腫瘍微小環境を修飾する可能性がある。こうした炎症性変化が腫瘍の進展や再発、さらには術後予後に影響することが示唆される。本研究は、胆管炎により腫瘍周囲で好中球が活性化され、そこから放出される NETs が EHCC 患者の術後予後に影響を及ぼす可能性があると考え、EHCC の腫瘍微小環境における NETs の存在および好中球との関連を検討するとともに、NETs の存在が術後予後に与える影響を明らかにすることを目的とした。

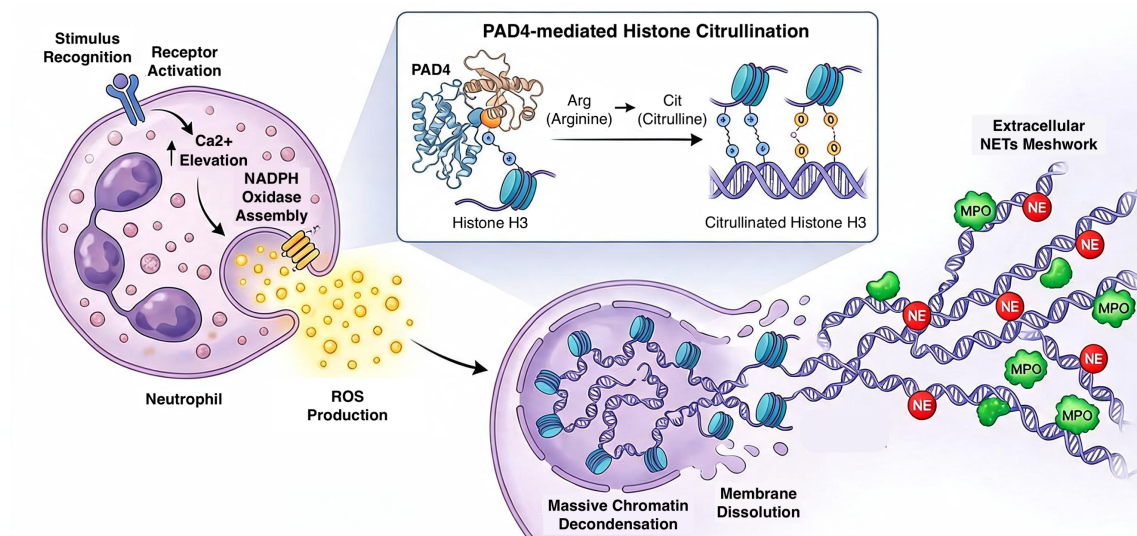


図 1. NETs 形成の模式図

好中球の TLR などの受容体に免疫グロブリンや補体、サイトカインなどの刺激が加わると、受容体が活性化され、細胞内カルシウム濃度 (Ca^{2+}) が上昇する。これにより PKC が活性化され、NADPH oxidase が活性化し ROS が産生される。産生された ROS は、好中球アズール顆粒に含まれる NE および MPO の核内移行を促し、NE はヒストンの切断を介して、MPO は NE と協調してクロマチンの脱凝縮を進行させる。さらに、 Ca^{2+} 依存性酵素である PAD4 は核内で

ヒストン H3 のアルギニン残基をシトルリン化し、DNA とヒストンとの結合を弱めることでクロマチン脱凝縮を促進する。これらの過程を経て核膜および細胞膜が破綻し、DNA を骨格とし、NE や MPO などの顆粒蛋白を含む網状構造物である NETs が細胞外へ放出される。

Papayannopoulos らの論文を基に作成。

方法

1. 症例

北海道大学病院消化器外科Ⅱにて、2000年1月から2018年12月までに根治的切除が施行された肝外胆管癌318例(肝門部領域胆管癌192例、遠位胆管癌126例)を対象とした。術前化学療法・放射線療法施行例および周術期死亡例、腫瘍遺残症例は除外した。術式の内訳を表1に示す。本研究では、手術前に「将来的に医学研究に用いる目的で保管し使用すること」を文章により同意を取得した(包括同意)した患者の検体のみを使用した。本研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得たものである(No. 020-0237)。

表1. 対象例手術術式

	Type of EHCC	
	PHCC (N=192)	DCC (N=126)
	n (%)	n (%)
Right hepatectomy + EBDR	67 (34.9)	0
Right trisectionectomy + EBDR	6 (3.1)	0
Left hepatectomy + EBDR	52 (27.1)	0
Left trisectionectomy + EBDR	6 (3.1)	0
Other type hepatectomy + EBDR	2 (1.0)	1 (0.8)
Hepatopancreatoduodenectomy	28 (14.6)	9 (7.1)
Pancreatoduodenectomy	8 (4.2)	113 (89.7)
EBDR	23 (12.0)	3 (2.4)

EHCC, extrahepatic cholangiocarcinoma; PHCC, perihilar cholangiocarcinoma; DCC, distal cholangiocarcinoma; EBDR, extrahepatic bile duct resection

2. 組織標本作成と病理組織学的診断

切除検体は10%緩衝ホルマリンで固定し、肉眼観察の後、厚さ3-6mmで連続標本を作製した。次にホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを4μm厚の切片に薄切し、顕微鏡検査の

ためにヘマトキシリン&エオシン(H&E)で染色した。病理組織診断は The International Union Against Cancer (UICC) TNM classification of malignant tumors, 8th edition に従って Stage を分類した (Amin MB et al, 2017)。全ての症例に関して、診断の確認と腫瘍の代表的な組織切片を選定し、選定した切片において免疫組織化学染色および免疫蛍光染色を行って検討した。

3. 免疫組織化学染色 (immunohistochemistry: IHC)

組織切片を脱パラフィン剤としてキシレン 2 槽を用いて、3 分間ずつ浸し脱パラフィンを行った。次に 100%エタノール、100%エタノール、95%エタノールの順にそれぞれ 5 分間ずつ浸漬したのち、80%エタノールに 10 回軽く振盪して再水和させた。熱誘導抗原の賦活化は 65°C に加温した PT LINK (Dako) を用いて、高 pH の抗原賦活化バッファー (Envision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION High pH, DM828, DAKO) で行った。過酸化水素処理は、Peroxidase Blocking Reagent #SM801 を組織上に載せて 5 分間静置した。使用した一次抗体は、NETs のマーカーとして抗 Cit-H3 抗体 (Cit-H3; ウサギポリクローナル; ab5103; 希釈度 1:2,000; Abcam, Cambridge, MA, USA)、好中球のマーカーとして抗 CD15 抗体 (C3D-1; sc-19648; 希釈度 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、好中球の酵素である抗 MPO 抗体 (ウサギポリクローナル; A0398; 希釈度 1:10,000; DAKO, Tokyo, Japan)、およびシトルリン化に必要な酵素である抗 PAD4 抗体 (ウサギポリクローナル; A16188; 希釈度 1:100; ABclonal, Woburn, MA, USA) で、室温にて 30 分間振盪下で反応させ、ジアミノベンジン (EnVision FLEX DAB+ Chromogen, DM827, DAKO) を発色剤として用いてポリマー法で可視化した。免疫染色した切片をヘマトキシリンで対比染色し、エタノールで脱水後、キシレンで洗浄した。一次抗体の希釈度は各抗体の data sheet を参考に設定し、既知の陽性組織を用いた陽性コントロールにより最適条件を調整した。また、染色の再現性を担保するため、連続切片を用いて評価を行った。なお、陰性コントロールとして一次抗体を省略した切片を用いた。

4. 免疫蛍光染色 (immunofluorescence: IF)

免疫蛍光染色は IHC の手順と同様に、組織切片を脱パラフィン剤としてキシレン 2 槽を用いて、3 分間ずつ浸し脱パラフィンを行った。次に 100%エタノール (2 回)、95%エタノールの順にそれぞれ 5 分間ずつ浸漬したのち、80%エタノールに 10 回軽く振盪して再水和させた。熱誘導抗原の賦活化は 65°C に加温した PT LINK (Dako) を用いて、高 pH の抗原賦活化バッファー (Envision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION High pH, DM828, DAKO) で行っ

た。過酸化水素処理は、Peroxidase Blocking Reagent #SM801 を組織切片上に添加し 5 分間静置した。一次抗体は、NETs のマーカーとして抗 Cit-H3 抗体 (Cit-H3;ウサギポリクローナル; ab5103;希釈度 1:5,000;Abcam, Cambridge, MA)、好中球の酵素である抗 MPO 抗体 (MPO;ウサギポリクローナル;A0398;希釈度 1:50,000;DAKO, Tokyo, Japan)を使用した。一次抗体と室温で 1 時間インキュベートした後、切片をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。その後、切片を二次抗体 (OPAL 520 試薬パック、FP1487001KT、緑、MPO;および OPAL 570 試薬パック、FP1488001KT、赤、Cit-H3) (Akoya Biosciences, MA, USA)と室温で 10 分間インキュベートした。核染色は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Spectral DAPI, FP1490, blue, DNA) (Akoya Biosciences, MA, USA)を用いて行った。IHC 同様、一次抗体の希釈度は各抗体の data sheet を参考に設定し、既知の陽性組織を用いた陽性コントロールにより最適条件を調整した。また、染色の再現性を担保するため、連続切片を用いて評価を行った。なお、陰性コントロールとして一次抗体を省略した切片を用いた。

5. 評価方法

既報を検討した限りでは、胆道腫瘍においては IHC にて NETs の検出を報告した研究は存在しなかった。よって、まず EHCC における IHC による NETs 同定法の妥当性を検討した。過去の他臓器腫瘍に関する報告では、Cit-H3 の存在は、in vitro および in vivo における NETs 形成の証拠とする報告が多いことから (Nakazawa et al, 2012; Nakazawa et al, 2014; Masuda et al, 2016)、本研究においても EHCC における IHC による NETs 検出のために抗 Cit-H3 抗体を用いることとした。まず、EHCC 症例の中より無作為に抽出した 10 例の主病巣の未染色プレパラートを作成し、IHC および IF により Cit-H3 と好中球由来タンパク質の一つであるミエロペルオキシダーゼ (MPO) の共局在を確認した (Mousset et al, 2023)。さらに、IHC により抗 CD15 抗体を用いて好中球を評価し、好中球周囲の細胞外領域における Cit-H3 の発現を評価した。また、Cit-H3 生成の主要経路は PAD4 を介したものであるが、PAD4 に依存しない NETs の報告もされているため (Azzouz and Palaniyar, 2024)、Cit-H3 と PAD4、MPO、CD15 の関連について IHC で評価した。

次に、EHCC における NETs の浸潤を調査するため、EHCC 全 318 症例の腫瘍領域に発現する CD15 および Cit-H3 を IHC で評価した。まず、腫瘍の代表的な組織切片の HE 染色標本を用いて腫瘍の評価領域を決定し、浸潤腫瘍細胞およびその周囲の線維化領域を腫瘍床と定義した (図 2a, 2b)。上皮内癌、腫瘍内の膿瘍、および外部病原体によると思われる局所的な炎症を伴う間質は、評価から除外した。腫瘍床における CD15 と Cit-H3 の発現分布

に基づいて、Diffuse、Intermediate、Focal、Negative に分類した。Diffuse、Intermediate、Focal の Cit-H3 染色の代表例を図 2c～2e に示す。

コホートから得られたすべての検体は、患者の臨床情報を盲検化した 2 人の研究者 (H.Y. と Y.N.) によって評価した。分類が困難な標本については、経験豊富な胆道病理医 (T.M.) にコンサルトの上、評価を決定した。

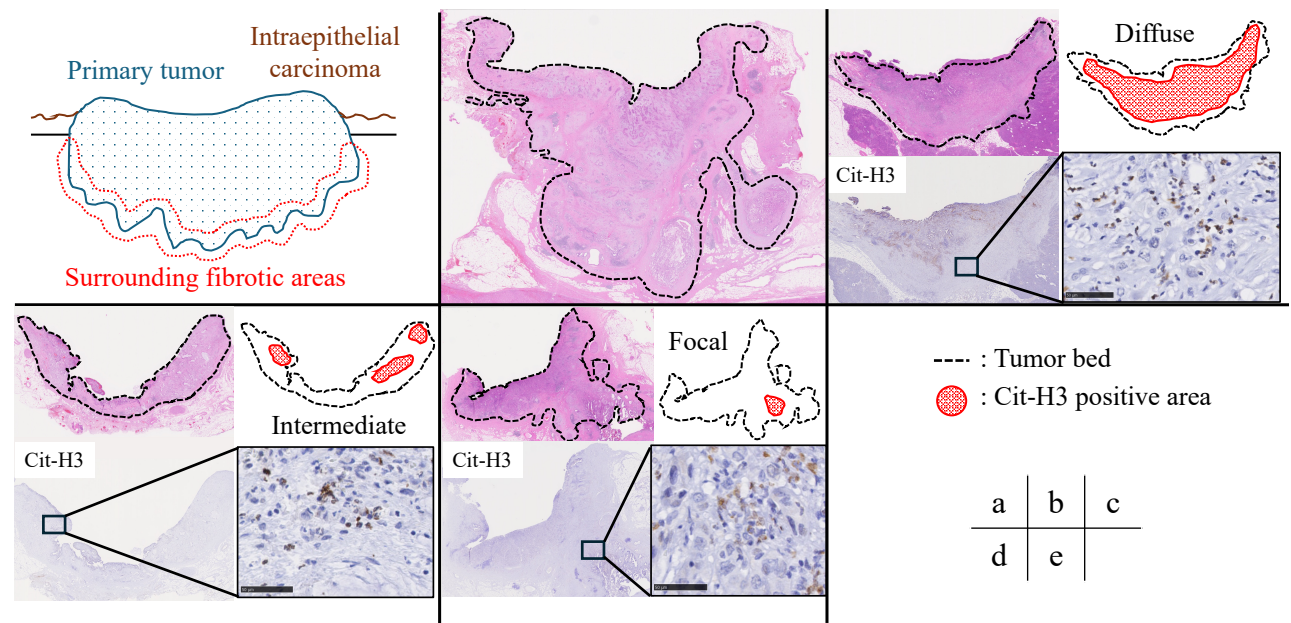


図 2. 腫瘍床の定義と Cit-H3 発現分布に基づく分類

(a) 腫瘍床の模式図。腫瘍床の範囲は浸潤腫瘍細胞およびその周囲の線維化領域として定義した。上皮内癌や腫瘍内の膿瘍、外部病原体によるものと疑われる局所的炎症を伴う間質変化は評価から除外した。(b) HE スライド上の腫瘍床の代表的病理像 (黒い点線で囲んだ部分)。(c) Diffuse:腫瘍床全体に Cit-H3 発現を認める。(d) Intermediate:Diffuse と Focal の中間。(e) Focal:腫瘍床の一部に Cit-H3 発現を認める。

赤点線で囲んだ領域が Cit-H3 発現陽性領域、黒点線が腫瘍床。Scale bar = 50 μ m

6. 統計解析

Cit-H3、CD15 染色の分布と各臨床病理学的特徴との関連について、カテゴリ変数の単変

量解析にはカイ2乗検定または Fisher の正確検定を、連続変数の二変量解析には Mann-Whitney U 検定を用いた。全生存期間 (overall survival: OS) は、手術日から最終経過観察日または患者の死亡日まで算出した。無病生存期間 (disease-free survival: DFS) は、手術から最初の再発の臨床診断日または何らかの原因による死亡日までの間隔と定義した。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて推定し、log-rank 検定を用いて比較した。生存の多変量解析では、単変量解析で有意であった予後因子を Cox 比例ハザードモデルに含めた。有意水準は $p < 0.05$ とし、信頼区間は 95% とした。統計解析は Macintosh 用の JMP version 16.0 software (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) を用いて行った。

結果

1. EHCC における Cit-H3 発現による NETs 確認法の妥当性

図3に示すように、IFにおいてCit-H3とMPOの局在が一致し、IHCとの比較においても同様の染色形態が認められた。さらに、IHCにおいてCit-H3はCD15で示す好中球周囲に発現しており、その染色形態は個々の細胞質内の染色ではなく、主として細胞外に顆粒状または線状に認められた(図4)。また、Cit-H3は好中球が観察されない部位には発現を認めなかったが、すべての好中球周囲に一様に存在するわけではなく、主に好中球が集積する領域において発現していた(図5)。

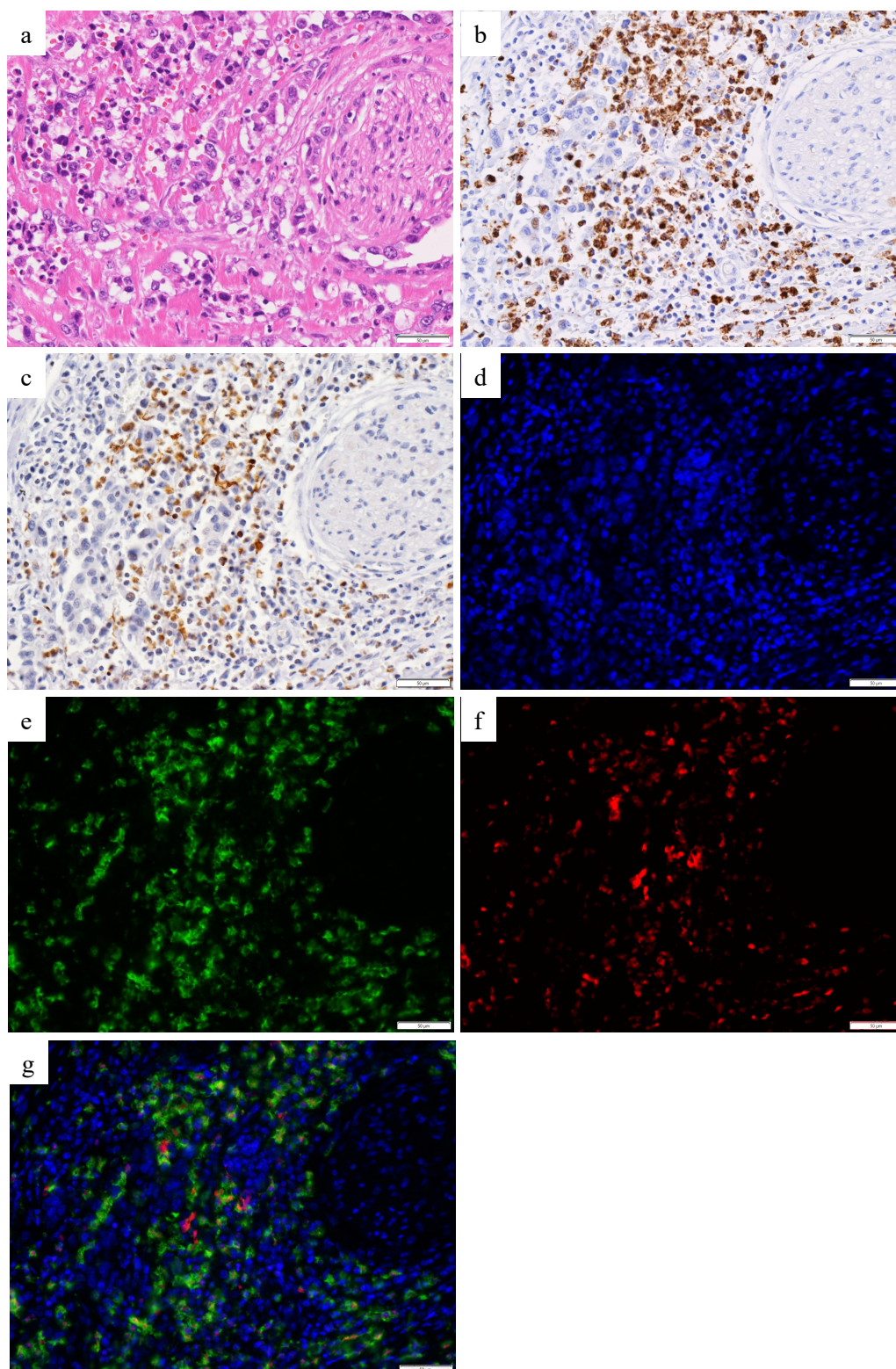


図3. 肝外胆管癌における好中球細胞外トラップ(NETs)と好中球の免疫蛍光染色および免疫組織化学染色

(a) ヘマトキシリン・エオジン(H&E) (b) ミエロペルオキシダーゼ(MPO) (c) シトルリン化ヒストン H3 (Cit-H3) (d) 4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI) (e) MPO (f) Cit-H3 (g) 腫瘍微小環境における MPO と Cit-H3 の共局在。緑:MPO、赤:Cit-H3、青:DAPI/DNA。 Scale bar = 20 μ m

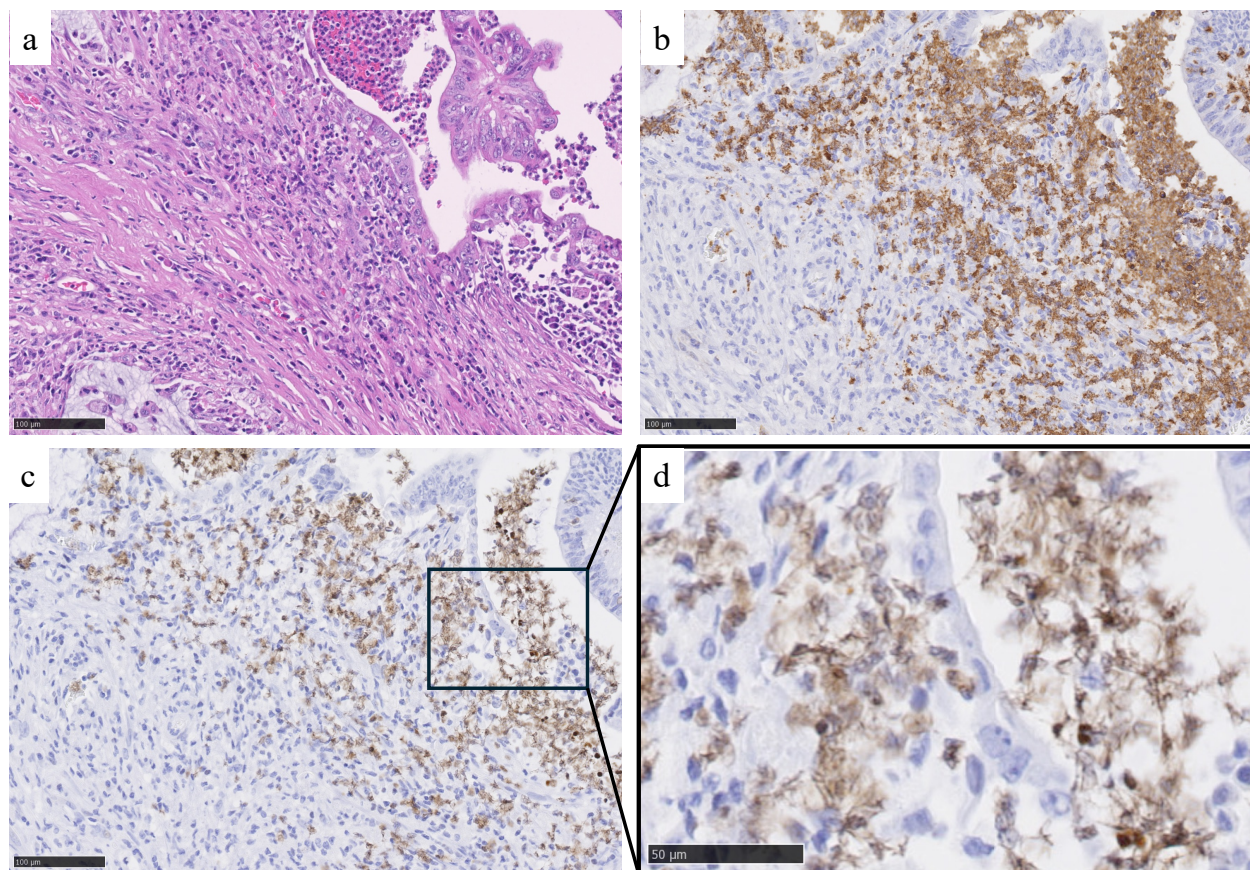


図4. 肝外胆管癌における Cit-H3 の染色形態

(a) H&E 染色 (b) CD15 (c) Cit-H3。Cit-H3 発現は CD15 高発現領域で認められた。 Scale bar = 100 μ m (d) Cit-H3 の拡大画像。個々の細胞質の染色ではなく、細胞外に放出された顆粒状または線状の染色像を示す。 Scale bar = 50 μ m

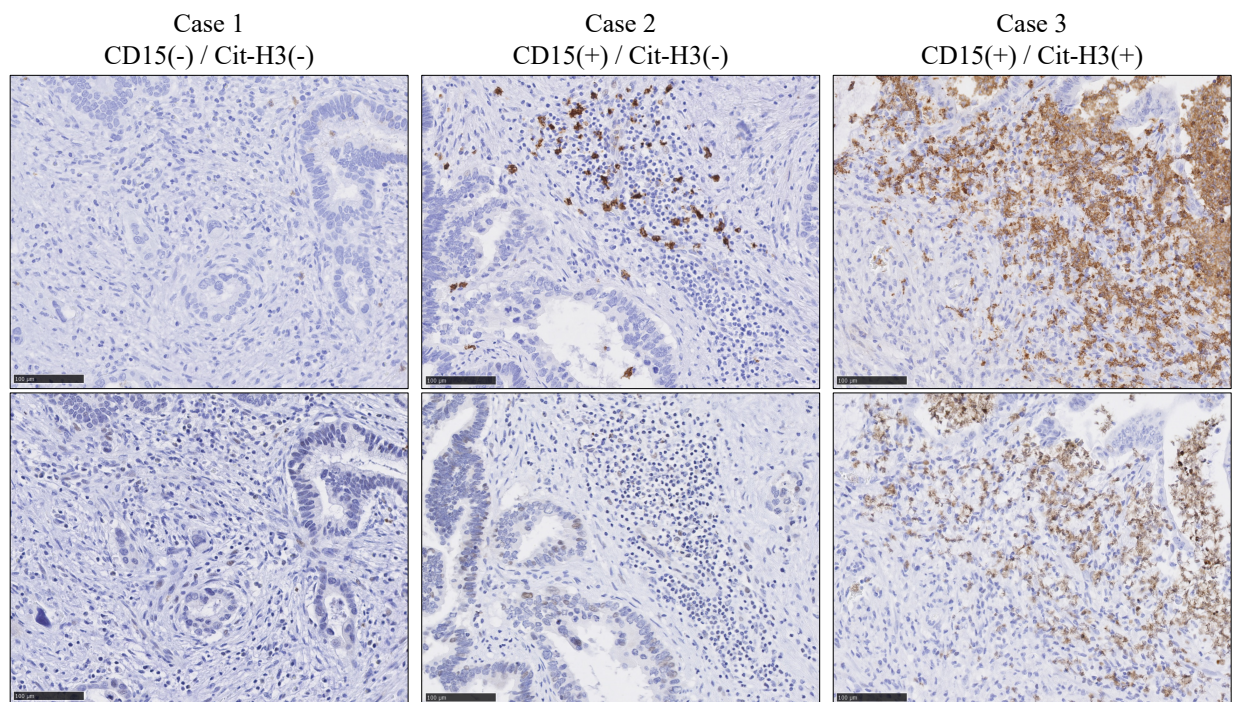


図5. 肝外胆管癌における Cit-H3 と CD15 の代表的顕微鏡像

上段は CD15 (好中球)、下段は Cit-H3 (NETs)。Case 1 (左) : CD15、Cit-H3 ともに陰性の組織。Case 2 (中央) : CD15 が陽性、Cit-H3 が陰性の組織。Case 3 (右) : CD15 と Cit-H3 ともに陽性の組織。Scale bar = 100 μ m

2. Cit-H3 と PAD4 の関係性

NETs のバイオマーカーである Cit-H3 生成の主要経路は PAD4 を介したものである。図 6 に示すように、EHCC の腫瘍微小環境において、Cit-H3 発現部位と同一領域に PAD4 の発現を認めた。

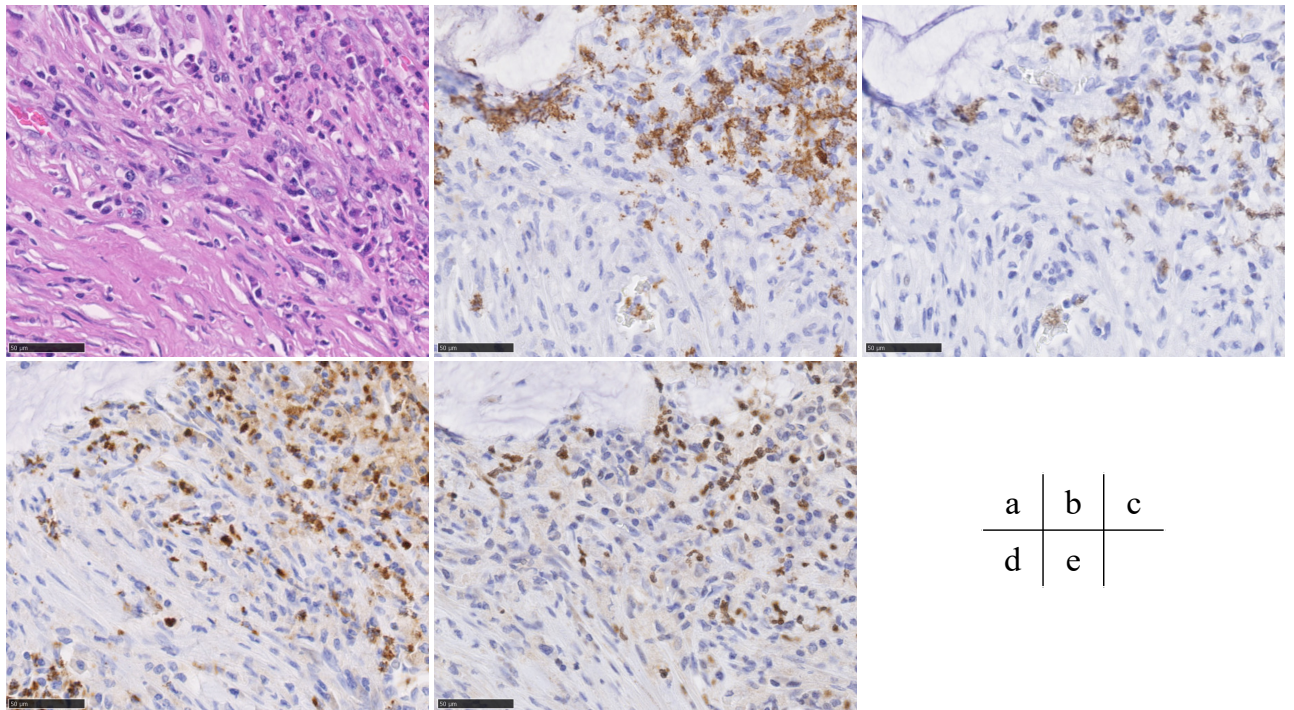


図 6. CD15、Cit-H3、MPO、PAD4 の免疫染色における代表的な顕微鏡画像

(a) H&E 染色 (b) CD15 (c) Cit-H3 (d) MPO (e) PAD4 Scale bar = 50 μ m

3. EHCC 318 例における IHC による CD15 と Cit-H3 発現の分布による術後生存率

PHCC および DCC における CD15 と Cit-H3 の発現パターンに基づく患者の内訳は表 2 に示す。PHCC ($p=0.0144$) と DCC ($p=0.0068$) の両群において、Cit-H3 positive のサブグループは negative 群より有意に術後 OS が有意に短かった。一方で、3 つの Cit-H3 positive のサブグループ間で術後 OS に差は認められなかった(図 7a, 7b)。さらに、PHCC と DCC の 3 つの Cit-H3 positive のサブグループ間で、PHCC のリンパ節転移因子を除き、臨床病理学的特徴に差は認められなかった(表 3, 4)。

そこで、3 つの Cit-H3 positive のサブグループを Cit-H3 positive 群として 1 つのグループに統合し、さらなる検討を行った。Cit-H3 positive 群は、PHCC ($p=0.0023$)、DCC ($p=0.0007$) ともに negative 群より OS が有意に短かった(図 7c, 7d)。同様に、PHCC ($p=0.0034$)、DCC ($p=0.0009$) ともに DFS においても、Cit-H3 positive 群と negative 群の間で有意差を認めた(図 7e, 7f)。さらに、Cit-H3 positive 群と negative 群の再発形式には有意差を認めなかった(表 5)。

表 2. PHCC と DCC における Cit-H3 と CD15 の発現割合

	Cit-H3		CD15	
	PHCC (N=192) n (%)	DCC (N=126) n (%)	PHCC (N=192) n (%)	DCC (N=126) n (%)
Diffuse	48 (25.0)	25 (19.8)	74 (38.5)	41 (32.5)
Intermediate	47 (24.4)	27 (21.4)	82 (42.7)	55 (43.7)
Focal	51 (26.6)	19 (15.1)	21 (10.9)	14 (11.1)
Negative	46 (24.0)	55 (43.7)	15 (7.8)	16 (12.7)

PHCC, perihilar cholangiocarcinoma; DCC, distal cholangiocarcinoma;

Diffuse, 腫瘍床全体に Cit-H3 発現; Intermediate, Diffuse と Focal の中間; Focal, 腫瘍床の一部に Cit-H3 発現

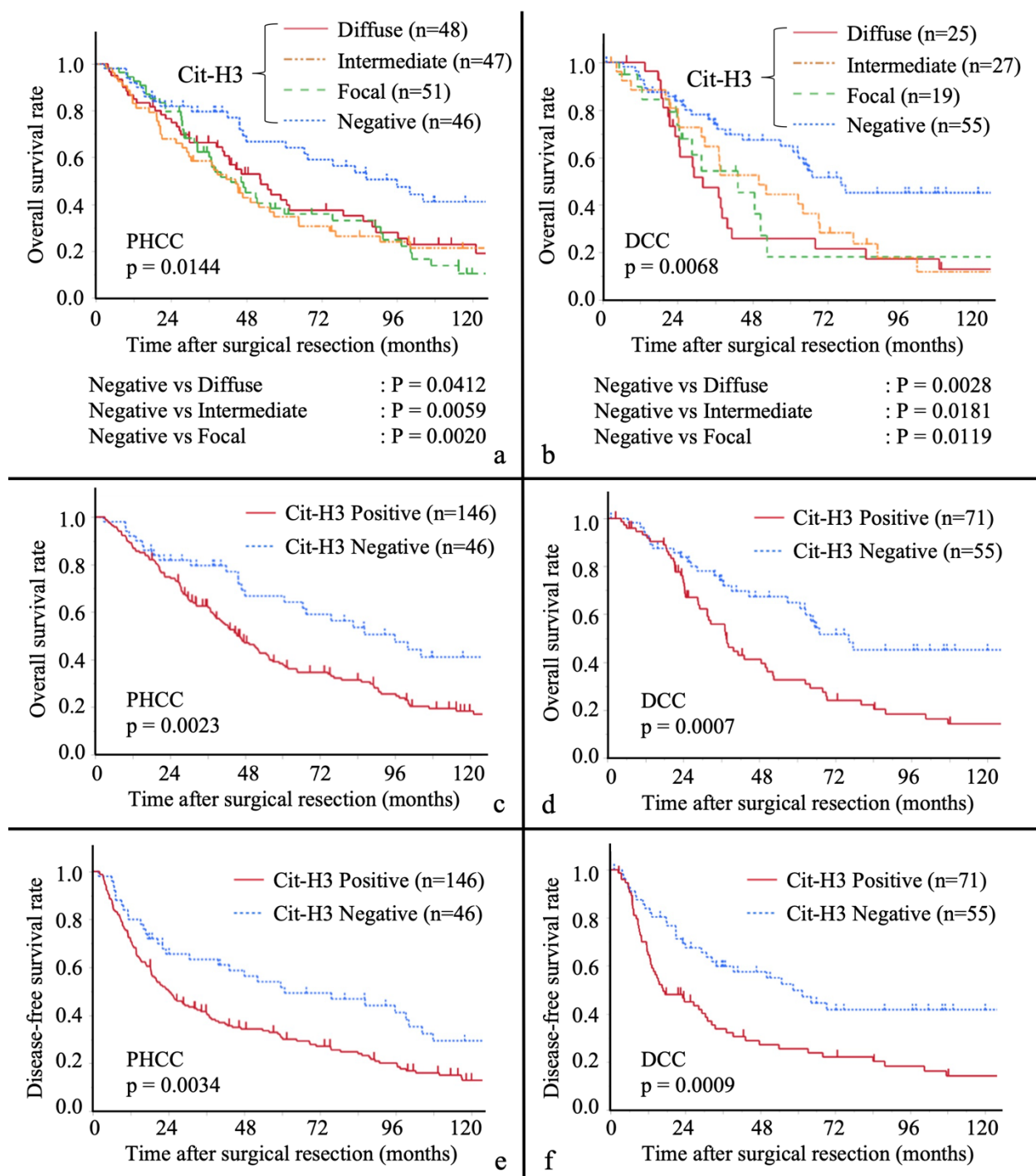


図7. EHCCにおけるCit-H3発現の分布に応じた全生存期間および無病生存期間

PHCCとDCCのいずれにおいても、Cit-H3 positive群は発現分布にかかわらず予後不良であった。さらに全生存期間および無病生存期間はCit-H3 positive群で有意に不良であった。(a, c, e) PHCC、(b, d, f) DCC。

表 3. Cit-H3 positive サブグループと臨床病理学的因子との関連 (PHCC 192 例)

Variable	Cit-H3			p-value
	Diffuse (N=48)	Intermediate (N=47)	Focal (N=51)	
Age, years (range) *	67 (45-81)	70 (55-82)	70 (48-79)	0.2199
Sex				0.2230
Male / Female	40 / 8	32 / 15	38 / 13	
Preoperative cholangitis				0.7694
Absent / Present	21 / 27	22 / 25	26 / 25	
Predominant histological differentiated grade†				0.5078
G1 / G2 / G3	11 / 25 / 12	7 / 24 / 16	7 / 29 / 15	
pT factor†				0.5993
pT1 / pT2 / pT3 / pT4	3 / 31 / 8 / 6	1 / 34 / 6 / 6	5 / 37 / 6 / 3	
Lymphatic invasion				0.3673
Absent / Present	24 / 24	20 / 27	29 / 22	
Venous invasion				0.9635
Absent / Present	20 / 28	19 / 28	22 / 29	
Perineural invasion				0.5823
Absent / Present	8 / 40	5 / 42	9 / 42	
Number of lymph node metastasis†				0.0225
None / 1-3 / ≥ 4	26 / 21 / 1	28 / 19 / 0	35 / 11 / 5	
Distant metastasis				0.0641
Absent / Present	44 / 4	50 / 1	47 / 0	

*Median † According to the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer.

表 4. Cit-H3 positive サブグループと臨床病理学的因子との関連 (DCC 126 例)

Variable	Cit-H3			p-value
	Diffuse (N=25)	Intermediate (N=27)	Focal (N=19)	
Age, years (range) *	68 (48-85)	70 (52-81)	71 (65-83)	0.2727
Sex				0.6973
Male / Female	19 / 6	23 / 4	15 / 4	
Preoperative cholangitis				0.3672
Absent / Present	9 / 16	15 / 12	9 / 10	
Predominant histological differentiated grade†				0.7284
G1 / G2 / G3	4 / 16 / 5	8 / 15 / 4	3 / 13 / 3	
pT factor†				0.1027
pT1 / pT2 / pT3 / pT4	4 / 14 / 7 / 0	4 / 19 / 4 / 0	8 / 7 / 4 / 0	
Lymphatic invasion				0.5420
Absent / Present	9 / 16	10 / 9	12 / 15	
Venous invasion				0.9249
Absent / Present	9 / 16	10 / 17	6 / 13	
Perineural invasion				0.2745
Absent / Present	7 / 18	3 / 24	3 / 16	
Number of lymph node metastasis†				0.4257
None / 1-3 / ≥ 4	11 / 13 / 1	13 / 12 / 2	13 / 6 / 0	
Distant metastasis				0.1870
Absent / Present	25 / 0	25 / 2	19 / 0	

*Median † According to the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer.

表 5. Cit-H3 と初回再発部位との関係

Initial recurrence site	PHCC			DCC		
	Cit-H3		p-value	Cit-H3		p-value
	Positive (N=102) n (%)	Negative (N=22) n (%)		Positive (N=49) n (%)	Negative (N=25) n (%)	
Liver	41 (40.2)	8 (36.4)	0.7388	20 (40.8)	10 (41.7)	0.9447
Local	24 (23.5)	4 (18.1)	0.7802	13 (26.5)	5 (27.8)	0.5357
Lymph node	11 (10.8)	4 (18.2)	0.3044	12 (24.5)	8 (32.0)	0.4914
Peritoneum	20 (19.6)	2 (9.1)	0.3595	8 (16.3)	3 (12.0)	0.7400
Lung	5 (4.9)	2 (9.1)	0.6065	6 (12.2)	0 (0)	0.0905
Bone	1 (1.0)	2 (9.1)	0.0809	0 (0)	1 (4.0)	0.3378
PTBD fistula	6 (5.9)	0 (0)	0.5896	2 (4.1)	2 (8.0)	0.5997

4. EHCC における IHC による Cit-H3 発現と臨床病理学的特徴との関連

Cit-H3 発現と EHCC の臨床病理学的特徴との関連を表 6, 7 に示す。PHCC および DCC において、Cit-H3 の発現は CD15 の発現と関連していた(ともに $p < 0.0001$)。しかし、術前胆管炎との関連は PHCC と DCC ともに有意な差を認めなかった。PHCC では、神経周囲浸潤 ($p = 0.0433$) が Cit-H3 と関連していた。DCC では、組織学的分化度 ($p = 0.0142$)、pT 因子 ($p = 0.0134$)、静脈浸潤 ($p = 0.0178$) が Cit-H3 と関連を認めた。

表 6. Cit-H3 と臨床病理学的因子との関連 (PHCC 192 例)

Variable	Cit-H3		p-value
	Positive (N = 146)	Negative (N = 46)	
Age, years (range) *	69 (45-82)	71 (47-86)	0.5865
Sex			0.2870
Male / Female	110 / 36	31 / 15	
Preoperative biliary stenting			0.3910
No / Performed	18 / 127	8 / 38	
Preoperative cholangitis			0.1762
Absent / Present	69 / 77	27 / 19	
Predominant histological differentiated grade†			0.2000
G1 / G2 / G3	42 / 78 / 26	19 / 18 / 9	
pT factor†			0.2378
pT1 / pT2 / pT3 / pT4	9 / 102 / 20 / 15	6 / 34 / 3 / 3	
Lymphatic invasion			1.0000
Absent / Present	73 / 73	23 / 23	
Venous invasion			0.1350
Absent / Present	61 / 85	25 / 21	
Perineural invasion			0.0433
Absent / Present	22 / 124	13 / 33	
Number of lymph node metastasis†			0.7161
None / 1~3 / ≥ 4	89 / 51 / 6	29 / 14 / 3	
Distant metastasis			0.7304
Absent / Present	162 / 5	48 / 2	
CD15			<0.0001
Negative / Positive	0 / 146	15 / 31	

*Median † According to the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer.

表 7. Cit-H3 と臨床病理学的因子との関連 (DCC 126 例)

Variable	Cit-H3		p-value
	Positive (N = 71)	Negative (N = 55)	
Age, years (range) *	71 (48-85)	70 (50-84)	0.6394
Sex			0.8276
Male / Female	57 / 14	45 / 10	
Preoperative biliary stenting			0.4487
No / Performed	8 / 63	4 / 51	
Preoperative cholangitis			0.4866
Absent / Present	33 / 38	29 / 26	
Predominant histological differentiated grade†			0.0142
G1 / G2 / G3	15 / 44 / 12	25 / 23 / 7	
pT factor†			0.0134
pT1 / pT2 / pT3 / pT4	16 / 40 / 15 / 0	26 / 22 / 7 / 0	
Lymphatic invasion			0.6863
Absent / Present	31 / 40	26 / 29	
Venous invasion			0.0178
Absent / Present	25 / 46	31 / 24	
Perineural invasion			0.1539
Absent / Present	13 / 58	16 / 39	
Number of lymph node metastasis†			0.1533
None / 1-3 / ≥ 4	37 / 31 / 3	36 / 15 / 4	
Distant metastasis			0.7153
Absent / Present	69 / 2	54 / 1	
CD15			<0.0001
Negative / Positive	0 / 71	16 / 39	

*Median † According to the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer.

5. EHCC 患者における全生存期間の解析

PHCC および DCC 患者の術後生存期間に対する臨床病理学的因子の影響に関する単変量解析および多変量解析の結果を表 8, 9 に示す。PHCC (表 8) および DCC (表 9) の両方で、Cit-H3 positive は単変量解析において生存期間の短縮と関連しており、多変量解析において独立した予後不良因子として抽出された [PHCC. ハザード比 (HR) : 1.69、95% 信頼指数 (CI) : 1.11-2.59、 $p=0.0115$ 、DCC. HR: 2.03、95% CI: 1.21-3.42、 $p=0.0057$]。

表 8. 全生存率に関する予後規定因子の検討(PHCC192 例)

Variable	Univariate				Multivariate	
	No. of patients	Median survival (months)	5-year survival rate (%)	p-value	Relative risk (95% CI)	p-value
Age (years)				0.6104		
<70	95	62	51.3			
≥ 70	97	52	47.1			
Sex				0.8028		
Male	141	57	49.4			
Female	51	56	48.6			
Preoperative cholangitis				0.0010		0.0438
Absent	96	85	62.2		1	
Present	96	42	36.3		1.42 (1.01-2.01)	
Hepatectomy performed				0.0591		
Yes	161	62	53.5			
No	31	43	32.3			
pT factor*				<0.0001		0.0379
pT1	15	120	86.7		1	
pT2	136	57	49.7		1.35 (0.58-3.12)	
pT3	23	51	47.0		1.40 (0.51-3.81)	
pT4	18	28	16.7		3.14 (1.14-8.61)	
Lymphatic invasion				0.1338		
Absent	96	58	67.6			
Present	96	40	45.6			
Venous invasion				0.0883		
Absent	86	62	54.2			
Present	106	51	45.1			

表 8. つづき

Perineural invasion					0.0117	
Absent	35	75	68.2			
Present	157	51	45.0			
Number of lymph node metastasis					<0.0001	0.0004
None	118	83	61.6		1	
1~3	65	31	30.3		1.99 (1.40-2.85)	
≥4	9	27	22.2		2.60 (1.18-5.71)	
Predominant histological differentiated grade*					0.0159	0.0455
G1	61	75	61.9		1	
G2	96	52	45.6		0.89 (0.60-1.32)	
G3	35	40	37.1		1.58 (0.96-2.59)	
Distant metastasis					0.0030	
Absent	185	60	50.5			
Present	7	27	14.3			
CD15					0.1182	
Negative	15	104	73.3			
Positive	177	55	47.2			
Cit-H3					0.0023	0.0115
Negative	46	100	71.6		1	
Positive	146	49	42.3		1.69 (1.11-2.59)	

* According to the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer.

表 9. 全生存率に関する予後規定因子の検討(DCC126 例)

Univariate					Multivariate	
Variable	No. of patients	Median survival (months)	5-year survival rate (%)	p-value	Relative risk (95% CI)	p-value
Age (years)				0.2678		
<70	58	63	52.6			
≥70	68	43	40.7			
Sex				0.5472		
Male	102	57	48.7			
Female	24	34	36.7			
Preoperative cholangitis				0.0221		0.0105
Absent	62	69	58.7		1	
Present	64	38	33.4		1.88 (1.15-3.07)	
Hepatectomy performed				0.5938		
Yes	10	34	40.0			
No	116	52	46.9			
pT factor*				0.0086		
pT1	42	69	63.7			
pT2	62	41	40.9			
pT3	22	29	24.4			
pT4	0	0	0.0			
Lymphatic invasion				0.1046		
Absent	57	64	52.4			
Present	69	41	41.8			
Venous invasion				0.0044		
Absent	56	76	58.9			
Present	70	38	35.3			

表9. つづき

Perineural invasion				0.0331		
Absent	29	84	61.2			
Present	97	43	41.9			
Number of lymph node metastasis				<0.0001		0.0268
None	73	69	63.0		1	
1~3	46	29	21.9		2.10 (1.20-3.67)	
≥4	7	34	14.3		2.16 (0.72-6.47)	
Predominant histological differentiated grade*				0.0561		
G1	40	69	61.0			
G2	67	41	34.6			
G3	19	67	54.3			
Distant metastasis				<0.0001		0.0018
Absent	123	52	47.6		1	
Present	3	6	0.0		18.35 (3.91-86.12)	
CD15				0.0557		
Negative	16	64	65.6			
Positive	110	45	43.3			
Cit-H3				0.0007		0.0057
Negative	55	76	65.5		1	
Positive	71	38	32.0		2.03 (1.21-3.42)	

*According to the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer.

考察

本研究では、PHCC および DCC の腫瘍微小環境において、切除標本における IHC による Cit-H3 発現を指標として NETs の存在を同定し、さらに NETs と臨床病理学的因子、ならびに術後予後との関連を解析した。その結果、IHC による Cit-H3 発現領域は CD15 発現領域に局限していた。臨床病理学的因子との関連解析においては、Cit-H3 発現は PHCC・DCC いずれにおいても術前胆管炎との有意な関連を認めなかった。しかし、Cit-H3 発現の分布にかかわらず、Cit-H3 の存在は PHCC および DCC 患者の術後予後と有意に関連し、予後不良であった。さらに、多変量解析による生存解析においても Cit-H3 発現は PHCC・DCC 双方における独立予後不良因子であることが示された。

ヒト検体における NETs 検出法はこれまで複数報告されてきたが、いまだ gold standard (ゴールドスタンダード) は確立されていない (Zhang et al, 2020; Jin et al, 2019; Tohme et al, 2016; Park et al, 2016; Arelaki et al, 2016)。現時点では Cit-H3 をはじめとする NETs 構成分子の IF が特異的かつ信頼性の高い方法とされるが、IF は暗所作業や複雑な手技を要する点で臨床応用には制約がある (Masuda et al, 2016; Li et al, 2020)。一方、IHC は病理診断において日常的に用いられる手法であり、既存のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いて評価可能である点で臨床応用性が高い。本研究では、Cit-H3 と好中球由来蛋白である MPO の共局在を IF および IHC で確認し (図 3)、さらに Cit-H3 が好中球周囲の細胞外領域に顆粒状あるいは線状に分布することを示した (図 4)。加えて、PAD4 の発現も Cit-H3 陽性領域と一致して認められたことから、本研究で観察された Cit-H3 発現は NETs 形成を反映する所見と考えられる (図 6)。これらの結果は、IHC による Cit-H3 評価が EHCC において NETs を病理組織学的に同定する方法として妥当であることを示唆する。

EHCC では胆管閉塞に伴う術前胆管炎を高頻度に合併し、これが術後予後不良因子となることが複数報告されている (Akita et al, 2017; Wang et al, 2018; Yang et al, 2014)。本研究においても、Tokyo Guidelines 2018 (Kiriya et al, 2018) に基づく術前胆管炎は PHCC および DCC の双方で独立した予後不良因子として抽出された。一方で、Cit-H3 発現と術前胆管炎との間には有意な関連を認めなかった。この結果は、炎症により動員される好中球と、腫瘍微小環境において機能分化した腫瘍関連好中球 (tumor-associated neutrophils: TAN) が、異なる生物学的特性を有している可能性を示唆する (Fridlender and Albelda, 2012; Granot and Jablonska, 2015; Wu et al, 2019)。術前胆管炎は急性炎症を主体とする病態であり、その過程で形成される NETs は主として抗菌防御機構として機能すると考えられる。一方、腫瘍微小環境における NETs 形成は、慢性的な炎症刺激や腫瘍由来サイトカインにより誘導され、腫瘍進展や免疫

抑制に寄与することが報告されている (Diakos et al, 2014; Boeltz et al, 2019)。このように、同じ NETs であっても、その誘導される文脈や機能は大きく異なる可能性があり、本研究において両者が統計学的に関連しなかったことは、炎症関連 NETs と腫瘍関連 NETs の機能的差異を反映した結果と考えられる。しかし、術前胆管炎における好中球や NETs の存在は、腫瘍微小環境の動態的变化により切除標本上ではすでに検出されなくなっていた可能性も考えられる。本研究において Cit-H3 発現パターン間で OS に差を認めなかったことは、この可能性を裏付ける所見と考えられる。したがって、術前胆管炎と NETs との関連については、胆管炎発症時の末梢血中 NETs 構成分子を測定するなど、さらなる検討が必要である。

本研究では、Cit-H3 発現と関連する臨床病理学的因子が PHCC と DCC で異なっていた。PHCC では神経周囲浸潤 ($p=0.0433$)、DCC では組織学的分化度 ($p=0.0142$)、pT 因子 ($p=0.0134$)、静脈侵襲 ($p=0.0178$) との関連が認められたが、両亜分類に共通する因子は認められなかった。この所見は、NETs が EHCC に共通する予後不良因子である一方で、その腫瘍進展への関与様式が解剖学的部位に依存して異なる可能性を示唆する。PHCC では神経叢が豊富であり、神経を介した腫瘍進展機構が重要と考えられるのに対し、DCC では血管系を介した腫瘍細胞の血行性播種が比較的早期から関与する可能性がある。すなわち、NETs は EHCC において共通の悪性形質増幅因子として作用しつつ、その下流経路では腫瘍の解剖学的背景に応じて異なる形で腫瘍進展に寄与している可能性が考えられた。一方で、NETs が既知の腫瘍関連因子とは関連しない、別の独立した悪性因子であることも考えられる。

本研究における最も重要な知見は、Cit-H3 発現が原発巣進展因子とは独立して、PHCC および DCC の双方において独立した予後不良因子であった点である。この結果は、EHCC における NETs の役割が、原発巣における腫瘍増殖や局所浸潤を直接的に反映するものではなく、転移が成立しやすい腫瘍の生物学的状態を反映している可能性を示唆する。これまでの報告により、NETs は循環腫瘍細胞の捕捉、血管内皮への接着促進、休眠腫瘍細胞の覚醒、さらには前転移ニッチ形成に関与することが報告されている (Cools-Lartigue et al, 2013; Albregues et al, 2018; Shao et al, 2021)。さらに近年、NETs は転移成立を能動的に促進する分子機構の一部として機能することが明らかになってきている。Yang らは、NETs を構成する DNA ががん細胞表面の Coiled-coil domain containing 25 に結合し、がん細胞の遊走能を亢進させることで、転移臓器への指向性移動を誘導することを報告した (Yang et al, 2020)。これらの機序はいずれも原発巣の腫瘍量や浸潤度とは必ずしも相関せず、転移の成立過程に深く関与する。本研究において Cit-H3 発現が原発巣進展因子との関連が乏しいにもかかわらず、一貫して予後不良と関連していたことは、EHCC において Cit-H3 発現が、再発部位や転移

様式を規定する因子というよりも、再発を来しやすい状態を反映している可能性が考えられる。

近年、NETsを標的とした治療戦略が注目されている。NE 阻害薬は NETs 形成を阻害するとともに、NETs 内での NE の毒性作用も抑制することが報告されている (Lerman and Hammes, 2018; Okeke et al, 2020)。また、デオキシリボヌクレアーゼ I は NETs を分解し、そのネットワーク構造を喪失させ、腫瘍の転移促進能を低下させることが示されている (Tohme et al, 2016; Cools-Lartigue et al, 2013; Leal et al, 2017)。EHCC は免疫チェックポイント阻害薬の効果が限定的であり、その一因として線維化を伴う免疫抑制的腫瘍微小環境の存在が指摘されている (Yang et al, 2023)。NETs は細胞障害性 T 細胞の腫瘍浸潤を阻害し、免疫回避に寄与することが報告されていることから、NETs 制御は免疫療法の効果を高める補助的戦略としても意義を有すると考えられる (Mousset et al, 2024)。したがって、EHCC における NETs 標的治療は単独治療としてのみならず、既存の化学療法や免疫療法の効果を引き出すための前処理的アプローチとしての可能性も有しており、今後の検討が期待される。

本研究にはいくつかの限界が存在する。第一に、本研究は単施設における後方視的解析であり、症例登録期間も長期にわたることから、周術期管理や補助療法の内容、サーベイランス方法に一定の不均一性が存在する可能性は否定できない。第二に、本研究では IHC による Cit-H3 発現を指標として NETs の存在を評価したが、Cit-H3 は NETs の重要な構成分子である一方で、NETs の機能的活性や動態を直接評価したものではなく、他の細胞死機構との完全な鑑別も困難である。第三に、本研究は切除標本における静的評価であり、術前胆管炎発症時における NETs の動態や、循環血中 NETs 構成分子との関連については検討していない。さらに、本研究は NETs と予後との関連を示したものであるが、その因果関係を直接証明したものではない。

しかしながら、本研究は長期間にわたる比較的大規模コホートを用いて、EHCC における NETs の病理学的評価法を確立し、その臨床的意義を体系的に示した初の報告である点に意義がある。今後は、末梢血中 NETs 構成分子の動態解析や前向き多施設研究による検証、さらには NETs 標的治療を組み合わせた治療戦略の基礎的・臨床的検討が求められる。

結論

① 本研究から得られた新知見

1. 免疫組織化学染色により好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) を臨床的に評価可能であることを確認し、病理診断的にも有用であることを示した。
2. 肝外胆管癌 (extrahepatic cholangiocarcinoma: EHCC) の腫瘍微小環境における NETs のマーカーである Cit-H3 の発現が、予後不良と有意に関連することを明らかにした。
3. Cit-H3 の発現は肝門部胆管癌および遠位胆管癌のいずれにおいても独立した予後不良因子であることが示された。
4. Cit-H3 の発現は術前胆管炎とは有意な関連を示さず、炎症由来の好中球と腫瘍関連 NETs の性質が異なる可能性を示唆した。

② 新知見の意義

EHCC において、予後予測バイオマーカーとしての Cit-H3 (NETs) の有用性を初めて提示した。NETs が腫瘍の進展や転移誘導に関与する可能性を支持し、EHCC の再発メカニズムの解明に寄与すると考えられる。将来的に NETs を標的とした新規治療開発 (NE 阻害薬や DNase I による NETs 分解など) につながる基盤となることが期待される。

また、EHCC において術前胆管炎が予後不良因子であることは臨床的に知られていたが、NETs との直接的な関連が認められなかったことから、炎症関連と腫瘍関連の好中球機構の相違を示唆する知見が得られた。

③ 今後どのような研究が展開されうか

EHCC において、NETs がどのように腫瘍転移や浸潤を促進するかについて、分子レベルでのメカニズム解明が求められる。また、NE 阻害薬や分解酵素 (DNase I) を用いた NETs 標的治療の臨床応用研究に繋がる可能性がある。

また、術前胆管炎と NETs 形成の関連性について、末梢血中の NETs 構成分子 (myeloperoxidase、neutrophil elastase など) の動態解析を行う前向き研究が期待される。

④ 今後の課題

本研究は後方視的・単施設研究であるため、症例数や治療内容の不均一性によるバイアスが存在する。術前胆管炎と腫瘍関連 NETs の関係は切除標本では十分に評価できておらず、血中マーカー測定などの動態的評価が必要である。

NETs 検出法としての Cit-H3 の免疫組織化学染色は有用であるが、NETs の検出法としての gold standard(ゴールドスタンダード)は未確立であり、他のマーカーや手法との比較検証が求められる。

謝辞

本研究の機会を与えていただき、ご指導いただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝いたします。

また、多大なご指導をいただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 中西 喜嗣 助教に深謝いたします。

さらに病理組織学的診断や免疫組織化学染色の検討についてご指導いただいた北海道大学病院病理診断科 三橋 智子 准教授（現 北海道大学病院病理診断科 医員）、技術面の指導や支援をいただいた北海道大学病院ゲノムコンパニオン診断研究部門 畑中 豊 特任准教授、畑中 佳奈子 特任講師、北海道大学病院病理部 我孫子 光春 主任技師に厚く御礼申し上げます。

最後に本研究にお力添えいただいた北海道大学病院病理部の皆様、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱの皆様にご心より感謝申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はありません。

引用文献

Akita, M, Ajiki, T, Matsumoto, T, Shinozaki, K, Goto, T, Asari, S, Toyama, H, Kido, M, Fukumoto, T and Ku, Y (2017) Preoperative Cholangitis Affects Survival Outcome in Patients with Extrahepatic Bile Duct Cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 21, 983-989.

Albregues, J, Shields, MA, Ng, D, Park, CG, Ambrico, A, Poindexter, ME, Upadhyay, P, Uyeminami, DL, Pommier, A, Kuttner, V, et al (2018) Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* 361, 6409.

Amin MB, Edge SB and Greene FL (2017) *AJCC cancer staging manual* 8th ed, New York, Springer.

Anderson, CD, Wright Pinson, C, Berlin, J and Chari, RS (2004) Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma. *The Oncologist* 9, 43-57.

Arelaki, S, Arampatzioglou, A, Kambas, K, Papagoras, C, Miliades, P, Angelidou, I, Mitsios, A, Kotsianidis, I, Skendros, P, Sivridis, E, et al (2016) Gradient Infiltration of Neutrophil Extracellular Traps in Colon Cancer and Evidence for Their Involvement in Tumour Growth. *PLoS One* 11, e0154484.

Azzouz, D and Palaniyar, N (2024) How Do ROS Induce NETosis? Oxidative DNA Damage, DNA Repair, and Chromatin Decondensation. *Biomolecules* 14, 1307.

Banales, JM, Marin, JJG, Lamarca, A, Rodrigues, PM, Khan, SA, Roberts, LR, Cardinale, V, Carpino, G, Andersen, JB, Braconi, C, et al (2020) Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 17, 557-588.

Bianchi, M, Hakkim, A, Brinkmann, V, Siler, U, Seger, RA, Zychlinsky, A and Reichenbach, J (2009) Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 114, 2619-2622.

Boeltz, S, Amini, P, Anders, HJ, Andrade, F, Bilyy, R, Chatfield, S, Cichon, I, Clancy, DM, Desai, J, Dumych, T, et al (2019) To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 26, 395-408.

Brinkmann, V, Reichard, U, Goosmann, C, Fauler, B, Uhlemann, Y, Weiss, DS, Weinrauch, Y and Zychlinsky, A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535.

Cai, Z, Zhang, M, Bofo Kwantwi, L, Bi, X, Zhang, C, Cheng, Z, Ding, X, Su, T, Wang, HandWu, Q (2020) Breast cancer cells promote self-migration by secreting interleukin 8 to induce NET formation. *Gene* 754, 144902.

Cho, JY, Han, H-S, Yoon, Y-S, Hwang, DW, Jung, K, Kim, JH, Kwon, YandKim, H (2012) Preoperative Cholangitis and Metastatic Lymph Node Have a Negative Impact on Survival After Resection of Extrahepatic Bile Duct Cancer. *World Journal of Surgery* 36, 1842-1847.

Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE (2016) Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer* 16, 431-446.

Colotta, F, Allavena, P, Sica, A, Garlanda, CandMantovani, A (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073-1081.

Cools-Lartigue, J, Spicer, J, McDonald, B, Gowing, S, Chow, S, Giannias, B, Bourdeau, F, Kubes, PandFerri, L (2013) Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *Journal of Clinical Investigation* 123, 3446-3458.

Cools-Lartigue, J, Spicer, J, Najmeh, SandFerri, L (2014) Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell Mol Life Sci* 71, 4179-4194.

Diakos, CI, Charles, KA, McMillan, DCandClarke, SJ (2014) Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *The Lancet Oncology* 15, e493-e503.

Fridlender, ZGandAlbelda, SM (2012) Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 33, 949-955.

Fuchs, TA, Abed, U, Goosmann, C, Hurwitz, R, Schulze, I, Wahn, V, Weinrauch, Y, Brinkmann, VandZychlinsky, A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176, 231-241.

Granot, ZandJablonska, J (2015) Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. *Mediators of Inflammation* 2015, 1-11.

- Jin, W, Xu, HX, Zhang, SR, Li, H, Wang, WQ, Gao, HL, Wu, CT, Xu, JZ, Qi, ZH, Li, S, et al (2019) Tumor-Infiltrating NETs Predict Postsurgical Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 26, 635-643.
- Jorch, SK and Kubes, P (2017) An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med* 23, 279-287.
- Kaplan, MJ and Radic, M (2012) Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 189, 2689-2695.
- Kiriyama, S, Kozaka, K, Takada, T, Strasberg, SM, Pitt, HA, Gabata, T, Hata, J, Liao, KH, Miura, F, Horiguchi, A, et al (2018) Tokyo Guidelines 2018: diagnostic criteria and severity grading of acute cholangitis (with videos). *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 25, 17-30.
- Le, DT, Durham, JN, Smith, KN, Wang, H, Bartlett, BR, Aulakh, LK, Lu, S, Kemberling, H, Wilt, C, Luber, BS, et al (2017) Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357, 409-413.
- Leal, AC, Mizurini, DM, Gomes, T, Rochael, NC, Saraiva, EM, Dias, MS, Wemeck, CC, Sielski, MS, Vicente, CP and Monteiro, RQ (2017) Tumor-Derived Exosomes Induce the Formation of Neutrophil Extracellular Traps: Implications For The Establishment of Cancer-Associated Thrombosis. *Scientific Reports* 7, 6438.
- Lerman, I and Hammes, SR (2018) Neutrophil elastase in the tumor microenvironment. *Steroids* 133, 96-101.
- Li, M, Lin, C, Leso, A and Nefedova, Y (2020) Quantification of Citrullinated Histone H3 Bound DNA for Detection of Neutrophil Extracellular Traps. *Cancers* 12, 3424.
- Li, P, Li, M, Lindberg, MR, Kennett, MJ, Xiong, N and Wang, Y (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 207, 1853-1862.
- Martinod, K and Wagner, DD (2014) Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 123, 2768-2776.
- Masuda, S, Nakazawa, D, Shida, H, Miyoshi, A, Kusunoki, Y, Tomaru, U and Ishizu, A (2016) NETosis

markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta* 459, 89-93.

Metzler, KD, Fuchs, TA, Nauseef, WM, Reumaux, D, Roesler, J, Schulze, I, Wahn, V, Papayannopoulos, VandZychlinsky, A (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 117, 953-959.

Mousset, A, Bellone, L, Gaggioli, CandAlbregues, J (2024) NETscape or NEThance: tailoring anti-cancer therapy. *Trends in Cancer* 10, 655-667.

Mousset, A, Lecorgne, E, Bourget, I, Lopez, P, Jenovai, K, Cherfils-Vicini, J, Dominici, C, Rios, G, Girard-Riboulleau, C, Liu, B, et al (2023) Neutrophil extracellular traps formed during chemotherapy confer treatment resistance via TGF- β activation. *Cancer Cell* 41, 757-775.

Nakanishi, Y, Okamura, K, Tsuchikawa, T, Nakamura, T, Noji, T, Asano, T, Matsui, A, Tanaka, K, Murakami, S, Ebihara, Y, et al (2020) Time to Recurrence After Surgical Resection and Survival After Recurrence Among Patients with Perihilar and Distal Cholangiocarcinomas. *Annals of Surgical Oncology* 27, 4171-4180.

Nakazawa, D, Shida, H, Tomaru, U, Yoshida, M, Nishio, S, Atsumi, TandIshizu, A (2014) Enhanced Formation and Disordered Regulation of NETs in Myeloperoxidase-ANCA-Associated Microscopic Polyangiitis. *Journal of the American Society of Nephrology* 25, 990-997.

Nakazawa, D, Tomaru, U, Suzuki, A, Masuda, S, Hasegawa, R, Kobayashi, T, Nishio, S, Kasahara, MandIshizu, A (2012) Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: Implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis & Rheumatism* 64 3779-3787.

Navaneethan, U, Njei, B, Lourdasamy, V, Konjeti, R, Vargo, J and Parsi, MA (2015) Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 81, 168-176.

Oh, DY, Ruth He, A, Qin, S, Chen, LT, Okusaka, T, Vogel, A, Kim, JW, Suksombooncharoen, T, Ah Lee, M, Kitano, M, et al (2022) Durvalumab plus Gemcitabine and Cisplatin in Advanced Biliary Tract Cancer. *NEJM Evid* 1, 8.

Okeke, EB, Louttit, C, Fry, C, Najafabadi, AH, Han, K, Nemzek, JandMoon, JJ (2020) Inhibition of neutrophil elastase prevents neutrophil extracellular trap formation and rescues mice from endotoxic shock. *Biomaterials* 238, 119836.

Papayannopoulos, V (2018) Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology* 18, 134-147.

Papayannopoulos, V, Metzler, KD, Hakkim, AandZychlinsky, A (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191, 677-691.

Park, J, Wysocki, RW, Amoozgar, Z, Maiorino, L, Fein, MR, Jorns, J, Schott, AF, Kinugasa-Katayama, Y, Lee, Y, Won, NH, et al (2016) Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med* 8, 361ra138.

Saffarzadeh, M, Juenemann, C, Queisser, MA, Lochnit, G, Barreto, G, Galuska, SP, Lohmeyer, JandPreissner, KT (2012) Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS One* 7, e32366.

Shao, BZ, Yao, Y, Li, JP, Chai, NLandLinghu, EQ (2021) The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Cancer. *Frontiers in Oncology* 11, 714357.

Smith, HAandKang, Y (2013) The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *Journal of Molecular Medicine* 91, 411-429.

Tohme, S, Yazdani, HO, Al-Khafaji, AB, Chidi, AP, Loughran, P, Mowen, K, Wang, Y, Simmons, RL, Huang, HandTsung, A (2016) Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res* 76, 1367-1380.

van der Gaag, NA, Kloek, JJ, de Bakker, JK, Musters, B, Geskus, RB, Busch, ORC, Bosma, A, Gouma, DJandvan Gulik, TM (2012) Survival analysis and prognostic nomogram for patients undergoing resection of extrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 23, 2642-2649.

Wang, H, Kim, SJ, Lei, Y, Wang, S, Wang, H, Huang, H, Zhang, HandTsung, A (2024) Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. *Signal Transduct Target Ther* 9, 235.

Wang, Y, Fu, W, Tang, Z, Meng, W, Zhou, WandLi, X (2018) Effect of preoperative cholangitis on prognosis of patients with hilar cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 97, e12025.

Wang, Y, Li, M, Stadler, S, Correll, S, Li, P, Wang, D, Hayama, R, Leonelli, L, Han, H, Grigoryev, SA, et al (2009) Histone hypercitullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 184, 205-213.

Wu, Saxena, AwajiandSingh (2019) Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers* 11, 564.

Yang, H, Zhou, J, Wei, X, Wang, F, Zhao, HandLi, E 2014. Survival outcomes and prognostic factors of extrahepatic cholangiocarcinoma patients following surgical resection: Adjuvant therapy is a favorable prognostic factor. *Mol Clin Oncol* 2, 1069-1075.

Yang, L, Liu, Q, Zhang, X, Liu, X, Zhou, B, Chen, J, Huang, D, Li, J, Li, H, Chen, F, et al (2020) DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature* 583, 133-138.

Yang, S, Zou, R, Dai, Y, Hu, Y, Li, F, Hu, H (2023) Tumor immune microenvironment and the current immunotherapy of cholangiocarcinoma (Review). *Int J Oncol* 63, 137.

Yoshikawa-Kimura, A, Taira, K, Maruyama, H, Ishikawa-Kakiya, Y, Yamamura, M, Tanoue, K, Hagihara, A, Uchida-Kobayashi, S, Enomoto, M, Kimura, K, et al (2022) Influence of a biliary stent in patients with advanced pancreatic cancer treated with modified FOLFIRINOX. *Medicine (Baltimore)* 101, e32150.

Zhang, H, Lv, H, Weng, M, Wang, H, Cata, JP, Chen, WandMiao, C (2020) Preoperative leukocytosis is associated with increased tumor-infiltrating neutrophil extracellular traps and worse outcomes in esophageal cancer. *Annals of Translational Medicine* 8, 441.