



Title	肝外胆管癌におけるケモカインレセプター（CCR7）の悪性度への関与と治療応用に関する検討〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	大場, 光信
Description	配架番号 : 2820
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15886号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91982
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	OBA_Mitsunobu_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 大場 光信

学 位 論 文 題 名

肝外胆管癌におけるケモカインレセプター（CCR7）の悪性度への関与と治療応用に関する検討
(Studies on the effects of chemokine receptor (CCR7) on malignant potential and therapeutic application in extrahepatic cholangiocarcinoma)

【背景と目的】

肝門部領域胆管癌は悪性度の高い腫瘍で、現在のところ根治的治療は手術のみである。その手術は肝外胆管切除を伴う大量肝切除や膵頭十二指腸切除などで多大な侵襲を伴う。術後の局所再発、遠隔転移再発がしばしば経験され、手術を施行しても全病期における 5 年生存率は約 40% と報告されている。特にリンパ節転移陽性例の予後は不良で 5 年生存率は 20% 程度である。近年、TS-1 による術後補助療法が標準治療となったが、3 年生存率は約 75% と満足できる成績ではない。予後改善のためには有効な薬物治療の開発が急務であり、リンパ節転移を生じる癌細胞、および転移を誘導する微小環境の分子生物学的特徴を捉え、治療標的を探索することが必要である。そこで本研究は、上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition：以下、EMT と略記）とケモカインに着目した。EMT は一定の細胞極性を保って規則正しく配列した上皮系細胞がその細胞極性を失い、遊走能や運動能を獲得し、間葉系形質を持つ細胞に変化する現象で、癌においては EMT の異常な活性化が浸潤、転移に関与すると考えられている。ケモカインは細胞遊走活性を主機能とするサイトカインの一群であり、生体における様々な細胞の移動や局在を制御している。本研究の対象とした CC 型ケモカインレセプター 7（C-C motif chemokine receptor 7：以下 CCR7 と略記）は、生理的には主に T 細胞や樹状細胞などで発現している。リガンドの CC 型ケモカインリガンド 19（C-C motif chemokine ligand 19：以下 CCL19 と略記）はリンパ節などの 2 次リンパ組織の高内皮細胞が提示するため、T 細胞や樹状細胞は再循環の過程で 2 次リンパ組織に効率よくホーミングする。近年、様々な癌腫において、腫瘍がケモカイン受容体を発現した場合、EMT を介して細胞遊走活性を獲得し、浸潤、転移へ至ると報告されている。本研究の目的は、第 1 に肝外胆管癌において CCR7 の発現が臨床病理学的因子と関連するか、また予後予測因子となり得るかを検証し、第 2 に CCR7 発現と EMT の関連を検討し、転移に関与する分子生物学的因子を調査して、新たな治療標的を探索することである。

【対象と方法】

症例は、1995 年 3 月から 2016 年 12 月の期間に、北海道大学病院消化器外科Ⅱで切除術が施行された肝門部領域胆管癌 181 例を対象とした。臨床病理学的検討項目として、年齢、性別、腫瘍の分化度、深達度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、神経周囲浸潤、所属リンパ節転移、遠隔転移、切除断端、CCR7 発現の程度を検討した。全症例の手術検体のホルマリン固定パラフィン包埋標本より、腫瘍先進部（腫瘍と正常間質の境界部）、腫瘍内部（腫瘍先進部から 100 細胞以上離れた腫瘍部）、正常対照群となる同一検体の正常胆管上皮から組織を採取し、組織マイクロアレイ（tissue micro array：以下、TMA と略記）を作製した。CCR7 の発現と EMT、臨床病理学的因子の関係を検討するために、免疫組織化学的手法を用いて、181 例の TMA における、CCR7、E-cadherin（上皮系マーカー）、vimentin（間葉系マーカー）の発現強度を測定した。CCR7 は、リンパ球と同程度に染色される部位の染色強度を+3、中等度を+2、弱陽性を+1、陰性を 0 と定義し、E-cadherin は、腺管構造部と同程度の染色強度を+2、弱陽性を+1、陰性を 0 と定義し、Vimentin は間質細胞と同程度の染色強度を+2、弱陽性を+1、腺管構造部と同程度の染色強度を陰性 0 と定義した。それらの数値を用いて各症例における CCR7、E-cadherin、vimentin の H score = {(各々の染色強度の細胞の割合×染色強度) の総和} を算出した。また、CCR7 の発現と EMT の関係を検討するために、tumor buds 数を測定した。Tumor budding は腫瘍先進部において個細胞性または小巣状の腫瘍が間質内に散らばるように浸潤する現象であり、様々な癌腫において転移の危険因子や予後不良因子であると報告されている。EMT の過程や形態変化と tumor budding の特徴は類似しており、tumor budding は EMT の形

態学的表現型と考えられている。Tumor budsは単一または5個未満の癌細胞からなる胞巣と定義し、各症例において tumor budding の程度が最も高い HE 標本を選出し、その標本上で tumor buds が最も多く観察される領域で tumor buds 数を測定した。これらの結果より CCR7 の発現と EMT、臨床病理学的因子との関連を解析した。続いて、肝外胆管癌の細胞株を4種類 (TFK-1, EGI-1, KKU-100, TYBDC-1) 入手し、CCR7 の発現と EMT の関連を検討した。RT-PCR により各細胞株の CCR7 の発現を評価し、Western blotting により EMT 関連蛋白の発現と CCL19 刺激による EMT 関連蛋白の変化を解析した。また、Wound healing assay、Cell proliferation assay、Migration assay、Invasion assay において CCL19 刺激による遊走、増殖、浸潤能力の変化を解析した。さらに、Migration assay において抗 CCR7 抗体により CCL19 刺激による浸潤能力の亢進が阻害されるか否かを検討した。

【結果】

肝門部領域胆管癌における CCR7 の H score の中央値は 90 で、Log-rank 検定により術後の全生存日数に最も影響を与えるカットオフ値は 170 であった。CCR7 の高発現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予後不良因子として選択された。CCR7 の発現は、臨床病理学的因子との比較では組織学的分化度、脈管侵襲と関連を認め、EMT 関連項目との比較では tumor buds 数と関連を認めた。E-cadherin、vimentin は各々単独では CCR7 との関連に乏しかったが、E-cadherin と vimentin のスコアを組み合わせた EMT status を検討すると、E-cadherin 低発現かつ vimentin 高発現の “mesenchymal status” で有意に CCR7 の H score が高値であった。肝外胆管癌の細胞株 TFK-1、EGI-1、KKU-100、TYBDC-1 のうち、TFK-1、KKU-100、TYBDC-1 の3種類が CCR7 を発現していた。TFK-1、EGI-1 は E-cadherin が発現し、vimentin は極低発現であり、上皮系細胞の形質を示した。一方、KKU-100 は E-cadherin の発現を欠き、TYBDC-1 は vimentin を高発現していた。CCL19 刺激により CCR7 陽性で上皮系の形質を示していた TFK-1 では有意な E-cadherin の downregulation と vimentin の upregulation を認めたが、CCR7 陰性の EGI-1 と間質系細胞の形質を示していた KKU-100、TYBDC-1 では有意な変化を認めなかった。Wound healing assay、Migration assay、Invasion assay においても同様に CCL19 刺激により TFK-1 の遊走、浸潤能力が有意に亢進したが、EGI-1、KKU-100、TYBDC-1 では有意な変化を認めなかった。Cell proliferation assay においてはいずれの細胞株も増殖能力の変化を示さなかった。また、Migration assay において TFK-1 を抗 CCR7 抗体で前処置することにより、CCL19 刺激による浸潤能力の亢進が阻害された。

【考察】

肝門部領域胆管癌の臨床病理学的検討において CCR7 の高発現は独立した予後不良因子の一つであり、組織学的分化度、脈管侵襲と関連することを明らかにした。また、CCR7 の高発現は EMT の形態学的表現型である tumor buds 数と関連し、EMT 関連蛋白との比較で間質系細胞の形質 (E-cadherin 低発現かつ vimentin 高発現) との関連を認めた。これらの結果から、CCR7 の高発現は EMT を介して全生存期間の低下へ影響している可能性が示唆された。胆管癌細胞株を用いた実験においては、CCR7 陽性で上皮系細胞の形質を示していた TFK-1 では CCL19 の刺激により E-cadherin の downregulation、vimentin の upregulation、遊走、浸潤能力の亢進を認め、抗 CCR7 抗体によりそれらが阻害されることを明らかにした。これらの結果から、CCR7/CCL19 の相互作用が胆管癌細胞株で EMT を誘導することが示唆された。

【結論】

肝門部領域胆管癌において、CCR7 の高発現が EMT を介して腫瘍細胞の遊走、浸潤能力を亢進させることで予後に影響していることが示唆された。さらに、抗 CCR7 抗体が CCR7 / CCL19 相互作用による浸潤能力の亢進を抑制することから、CCR7 の阻害または EMT プロセスの制御が効果的な治療標的となる可能性が示唆された。将来、肝門部領域胆管癌において CCR7 の発現を評価し、CCR7 高発現の症例に対して CCR7 阻害剤を併用した薬物治療を行うことが有用な選択肢となる可能性がある。今後は動物を用いた in vivo 試験、CCR7 阻害剤の開発へ向けた研究が必要である。