

表 題 肝外胆管癌の臨床病理学的予後因子の探索

論文の区分 博士課程

著 者 名 小松原 利英

担当指導教員氏名 病理診断部 教授 福嶋敬宜

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
人間生物学系
生体構造医学
人体・分子病理学

2020 年 1 月 10 日申請の学位論文

目次

I. はじめに	3
II. 肝外胆管癌における腫瘍の組織学的分化度と予後の関連について —分化度に応じたグレーディングシステムの提案—	
緒言	6
材料と方法	7
結果	12
考察	18
III. 肝外胆管癌の癌間質における Matriptase 高発現が予後に与える影響	
緒言	21
材料と方法	22
結果	25
考察	31
IV. 胆管癌細胞と線維芽細胞の共培養実験を用いた肝外胆管癌微小環境における Matriptase の意義の解明	
緒言	34
材料と方法	34
結果	37
考察	41

V. おわりに	43
VI. 謝辞	44
VII. 参考文献	45

はじめに

胆道癌は、胆道に発生する腫瘍である肝外胆管癌、胆嚢癌、十二指腸乳頭部癌を包括した疾患群である (1)。本邦では全消化器癌のおよそ 1 割を占める疾患であり、消化器診療では一定の頻度で遭遇する。その一方で、5 年生存率は予後不良として知られる膵癌に次いで不良である (2)。胆道癌診療を行う上で最大の問題は、診断・治療に必要なエビデンスの乏しさである。その一例が、世界的な標準ガイドラインを作成している NCCN (National comprehensive cancer network) においても胆道癌の診療ガイドラインが未整備であることである。本邦では診療ガイドラインは存在するものの、やはり科学的根拠をもって推奨される治療法は少ない (3)。胆道癌は、その分類自体も未成熟であり、現在運用されている UICC (Union for international cancer control) 第 8 版の TNM ステージ分類 (4) や本邦の癌取り扱い規約 (1) には運用上の限界がいくつか存在する。特に、肝外胆管癌は肝門部胆管癌あるいは遠位胆管癌に分類されるが、実際にはそのどちらにも分類できない腫瘍が珍しくない。このように、胆道癌は克服すべき課題が多数残されているが、その背景には肝外胆管癌が欧米で極めてまれ、という疾患分布の局在も起因している (5)。一方で、肝外胆管癌は本邦を含めた東アジアでは比較的高頻度であり (5)、本邦から有用なエビデンスを発信していく必要がある。

一方、病理組織学的な評価方法としては、腫瘍の発生部位に関係なく「組織分化度」が用いられることが多いが、評価者間におけるばらつきや腫瘍内における不均一性のためか、肝外胆管癌における予後因子としての有用性のエビデンスは乏しい。

そこでまず、肝外胆管癌の新たな病理組織学的評価方法の確立を目指し、複数の組織分化度をスコア化して腫瘍を評価する方法 (Histological Glandular

Differentiation: HGD) を構築し、予後予測の有効な指標となり得るかの検証を行った。なおこのシステムは前立腺癌で用いられる Gleason grading (6) を参考にしている。

また、肝外胆管癌の組織学的特徴として豊富な癌間質が挙げられる。近年では癌間質を含む癌微小環境が癌悪性化や治療抵抗性に寄与することが明らかになり、その異常を評価することが重要な課題となってきた。肝外胆管癌においては、癌間質の主たる構成要素である CAFs (Cancer associated fibroblasts) を誘導する因子として PDGF (Platelet Derived Growth Factor) -D が報告されている (7, 8)。また、PDGF-D がリガンドとして機能するためにはセリンプロテアーゼである Matrilysin などが必要である (9)。これまでの報告から、これらの因子は患者のアウトカムに影響を及ぼすと予想されるが、臨床的意義は明らかではない。肝外胆管癌における PDGF-D・matrilysin の発現を免疫組織化学的に調査し、予後因子としての可能性を検証した。

本研究の解析結果からは、HGD score と癌間質における Matrilysin の高発現が予後と関連することが示唆され、両者は相関関係にあることが分かった。癌間質での Matrilysin 発現の生物学的意義について言及している研究は無く、その説明は肝外胆管癌の診療において寄与するところは大きいと考えられる。そこで、肝外胆管癌の培養細胞と肝臓を構成する線維芽細胞として知られる肝星細胞の培養細胞株を用いて、共培養によってどのような変化がみられるか観察を行った。これまでの解析で挙げられた予後因子と、実験結果について考察を加えて報告する。

研究対象の症例は全例「病理標本の教育・研究利用についての同意書」にて研究利用の同意を得ている。また、研究に関する情報公開文書を自治医科大学附属病院病理診断部のホームページ上に公開している。本研究は、自治医科大

学の倫理委員会の承認を得て行っている（承認番号臨 A16-071、決裁日 2017 年 1 月 4 日）。

肝外胆管癌における腫瘍の組織学的分化度と予後の関連について

—分化度に応じたグレーディングシステムの提案—

緒言

現行の UICC の TNM 分類 8 版では、肝外胆管癌はその発生部位によって「肝門部胆管癌」あるいは「遠位胆管癌」の 2 つに分けられる (4)。これは、本邦の胆道癌取扱い規約でも同様である。かつて肝外胆管癌は上部胆管癌、中部胆管癌、下部胆管癌と分類されており、その頻度はそれぞれ 50-75%、10-25%、10-20%と報告されている (10-13)。つまり、肝門部胆管癌と遠位胆管癌の分水嶺である 3 管合流部に発生する腫瘍も稀でないことに加え、肝外胆管癌はときに多発性あるいはびまん性に発生することもあり、実臨床において分類が困難な症例もしばしば見受けられる (12, 14)。さらに、UICC の TNM ステージ分類においては、肝門部胆管癌と遠位胆管癌の評価方法が全く異なるため、どちらに分類するかによって全く異なる評価となってしまう可能性もある。

一方で、病理組織学的な評価方法も世界的に標準化はされていない。UICC の TNM 分類では G1-4 の高分化、中分化、低分化、未分化に分類されるが (4)、本邦の規約では細やかな組織形分類を行い、管状腺癌の分化度について記述することになっている (1)。また、分化度の評価方法についても世界的なコンセンサスはなく、国内では腫瘍の主要な (量的に最も多い) 構成成分で評価を行う病理医が多く、海外では最も分化度の低い部位での評価をその腫瘍の分化度として判定する病理医が多い、などの状況がある。

肝外胆管癌において、リンパ節転移の有無および術後の癌遺残の有無は非常に強力な予後因子であることが知られる (15, 16)。組織学的分化度も予後を予測する指標の一つであるものの (17)、肝外胆管癌は腫瘍内の不均一性が非常

に強く（18）、上記の通り評価方法が標準化されていないことも有用性が確立していない一つの原因として考えられる。肝外胆管癌同様に不均一性の強い腫瘍として知られる膵癌では、Adsay らが前立腺癌における Gleason 分類を模倣した組織グレード分類のスキームについて報告している（19）。上述の通り、肝外胆管癌と膵癌は類似した組織学的特徴を有しており、肝外胆管癌にも同じような方法を適用し評価を行うのは有用ではないかと考えた。

本研究では、自治医科大学附属病院にて外科切除された肝外胆管癌の症例をレビューし、実際に肝門部胆管癌、遠位胆管癌に分類しがたい腫瘍の頻度を確認した。次いで、Adsay ら同様に Gleason 分類を模倣した独自の手法を用いて組織学的分化度のスコアリングを行い、患者の予後との相関について解析を行った。

材料と方法

1) 症例

1995 年から 2015 年の 21 年間に、自治医科大学付属病院消化器・一般外科で切除された肝外胆管癌 257 症例を対象とした（Table 1）。症例の内訳は、男性 174 例、女性 83 例であり、年齢の平均は 68.8 歳（範囲：39-88 歳）であった。全症例のうち、生死不明の症例が 46 例、再発の有無が不明の症例が 23 例存在した。いずれの症例も術前治療は施行されていないものの、術後治療については化学療法が 41 例、放射線治療が 33 例、放射線化学療法が 21 例、その他の治療が 2 例で施行されていた。病理組織学的評価は主として UICC の TNM 分類（第 8 版）に準じて行ったが、T 分類は遠位胆管癌と肝門部胆管癌で分類方法が大きく異なるため T 分類の採用はせずに、非浸潤癌（carcinoma in situ）と浸潤癌の 2 つのグループに大別した。リンパ節転移を認めた症例は 101 例で、

リンパ節転移を認めなかった症例は 151 例、リンパ節転移の有無が不明な症例は 5 例だった。術後の癌遺残に関しては、癌遺残を認めない症例が 163 例、肉眼的癌遺残を認める症例が 63 例、顕微鏡的癌遺残を認める症例が 22 例、癌遺残の有無が不明な症例が 9 例だった。

2) 発生部位の分類

肝外胆管癌を「肝門部胆管癌」、「遠位胆管癌」、「3 管合流部癌」、「分類不能癌」の 4 つに分類した。UICC-TNM 分類（第 8 版）に準じて、肝門部胆管癌は「3 管合流部よりも肝臓側の肝外胆管に発生した癌」、遠位胆管癌は「3 管合流部よりも十二指腸側の肝外胆管に発生した癌」と定義した（4）。その他、3 管合流部近傍に発生し、「肝門部胆管癌」とも「遠位胆管癌」とも分類しがたい腫瘍を本研究では「3 管合流部癌」と分類した。肝外胆管にびまん性に進展し発生部が特定できない腫瘍や、多発性でやはり発生部位が特定できない腫瘍に関しては「分類不能癌」と分類した。

3) 組織学的分化度スコア

最初に、非浸潤癌は浸潤癌と比較し、単変量解析および多変量解析において明らかに予後良好であることが示されたため、非浸潤癌の 12 例は評価の対象から除いた。次に、それぞれの症例を 2 つの古典的手法において（腫瘍における最も優勢な成分を対象に評価する方法と、最も分化度が不良と思われる部位を対象に評価する方法）組織学的分化度分類を行った。

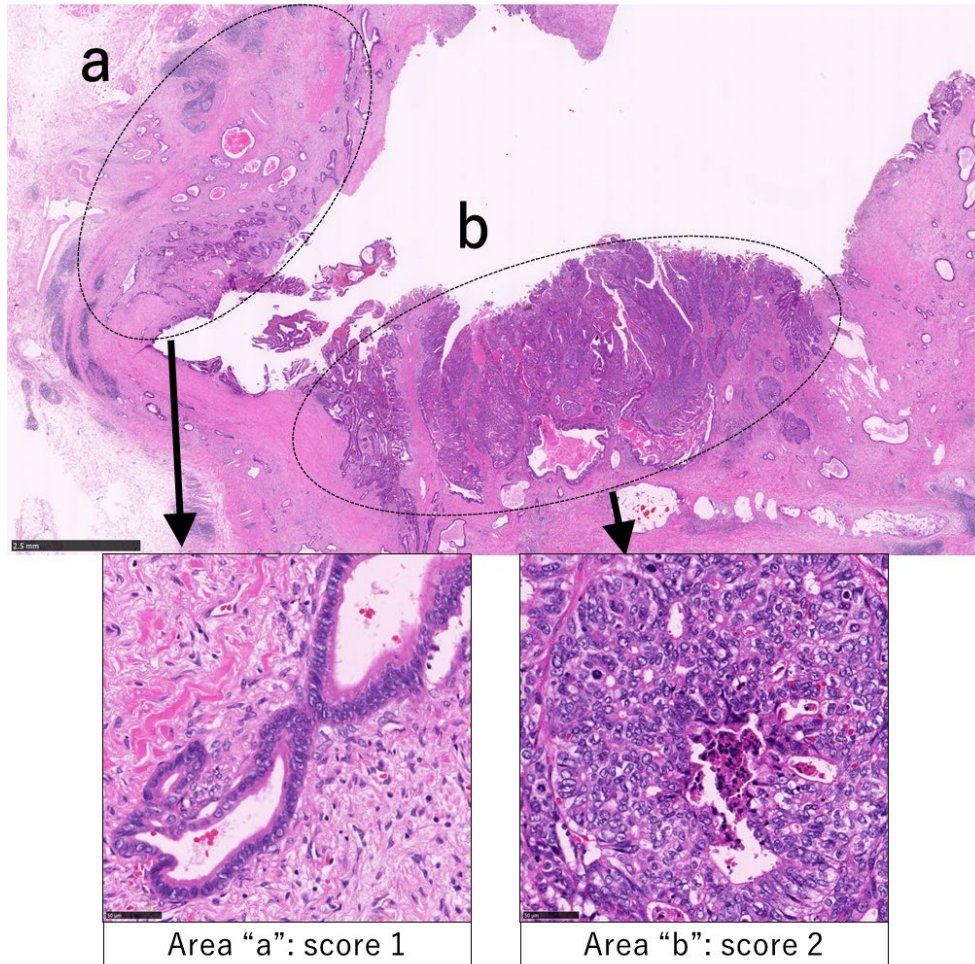
次に、我々の考案した組織学的分化度をスコアリングする方法でも評価を行った。本法は、主として 3 つのステップにより構成されている（Figure 1）。まず、腫瘍を構成する主たる 2 成分を選出し、次にそれぞれの成分に対して組織

学的分化度によるスコアリングを行い、最後にその 2 つのスコアを合計しその腫瘍の組織学的分化度スコア（HDG score: histological glandular differentiation score）と定義した。スコアはそれぞれ、高分化腺癌が 1 点、中分化腺癌が 2 点、低分化腺癌あるいは未分化腺癌は 3 点と配点した(Figure 2)。腫瘍によっては、浸潤癌の一部に乳頭状に管内発育を呈する成分を認めるものもあり（いわゆる乳頭腺癌）、これらは高分化癌と判断し 1 点と定義した。また、篩状構造を示す成分は中分化腺癌に分類した。印環細胞癌、腺扁平上皮癌、明細胞癌はそれぞれ 3 点とした。腫瘍の 90%以上で組織学的に均一と考えられた場合においては、同じ点数を 2 倍にして最終スコアとした（例：ほぼ中分化腺癌のみで構成されている腫瘍については 2 点×2 で 4 点）。

Table 1. Characteristics of the studied patients (n=257)

Characteristics	Value
Age, years; median (range)	68.8 (39-88)
Gender, n (%)	
Male	174 (68)
Female	83 (32)
Histological type, n (%)	
Adenocarcinoma	249 (97)
Others	8 (3)
Local extent of primary tumor, n (%)	
Carcinoma in situ (Tis)	12 (5)
Invasive cancer	245 (95)
Lymph node metastasis, n (%)	
Positive	101 (39)
Negative	151 (59)
No data	5 (2)
Residual tumor, n (%)	
No residual tumor	163 (63)
Microscopic residual tumor	63 (25)
Macroscopic residual tumor	22 (9)
No data	9 (3)
Other therapy, n (%)	
Chemotherapy	41 (16)
Radiation therapy	33 (13)
Chemoradiotherapy	21 (8)
Others	2 (1)

1. Select two dominant constituent components.



2. Score each area based on tumor cell differentiation.

Score 1: Well differentiated

Score 2: Moderately differentiated

Score 3: Poorly differentiated or undifferentiated

3. Add the two scores.

Final histological glandular differentiation score: $1+2=3$

Figure 1: Histological glandular differentiation score 採点のための 3 ステップ

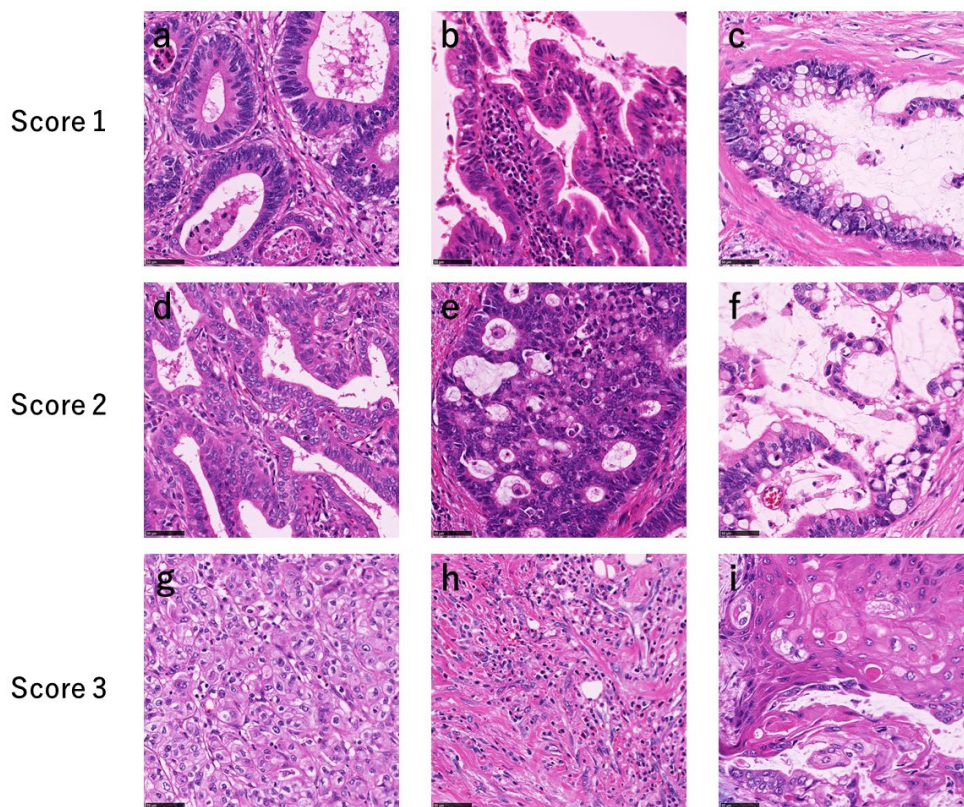


Figure 2: (a) 高分化管状腺癌 (b) 乳頭腺癌 (c) 粘液癌（腺管構造が比較的保たれているタイプ）(d) 中分化管状腺癌 (e) 篩状構造を呈する腺癌 (f) 粘液癌（腺管形成が崩壊がみられるタイプ）(g) 充実型発育を呈する低分化腺癌 (h) 腺管形成をほとんど伴わない低分化腺癌 (i) 腺扁平上皮癌

4) 統計学的解析

すべての統計解析には EZR を使用した (20)。EZR は R および R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアであり、自治医科大学附属さいたま医療センターのホームページで無償配布されている。HGD スコアと無再発生存期 (RFS: recurrence-free survival) および全生存期間 (OS: overall survival) の相関を調べるために Kaplan-Meier 曲線をプロットした。生存曲線の比較には log-rank 検定を用いた。生存曲線の解析においては、根治手術が得られた症例のみを対象とした。また、HGD スコアと臨床病理学的因子（年齢、性別、リンパ節転移、癌遺

残)を対象に Cox 比例ハザード回帰による生存曲線についての多変量解析を行った。多変量解析においては、HDG スコアの評価にあたり高得点群 (4 点以上) と低得点群 (4 点未満) の 2 群に分けた。「肉眼的癌遺残あり」の群においては、再発までの期間を「0 か月」とした。

結果

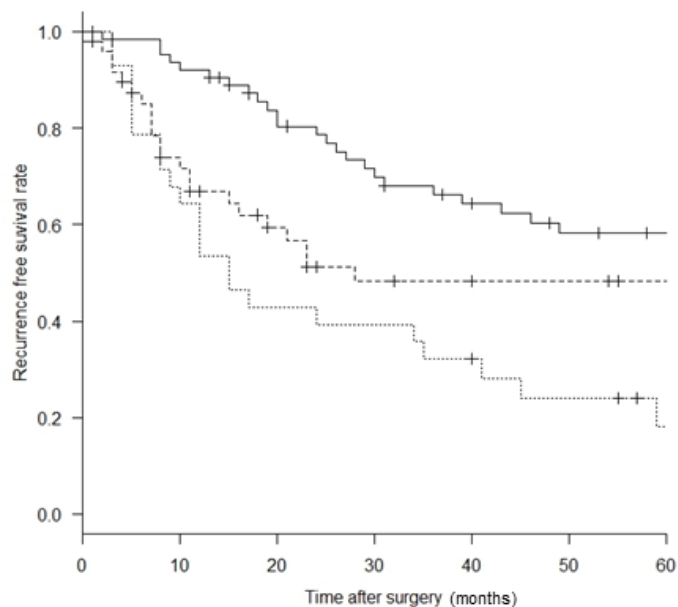
1) 腫瘍発生部位

腫瘍発生部位の分布は下記の通り。肝門部胆管癌が 83 症例 (32%)。遠位胆管癌 101 症例 (39%)。3 管合流部癌が 59 症例 (23%)。分類不能癌は 14 症例 (5.5%) だった。3 管合流部癌および分類不能癌を合計し、73 症例 (28%) が肝門部胆管癌あるいは遠位胆管癌と分類できなかった。

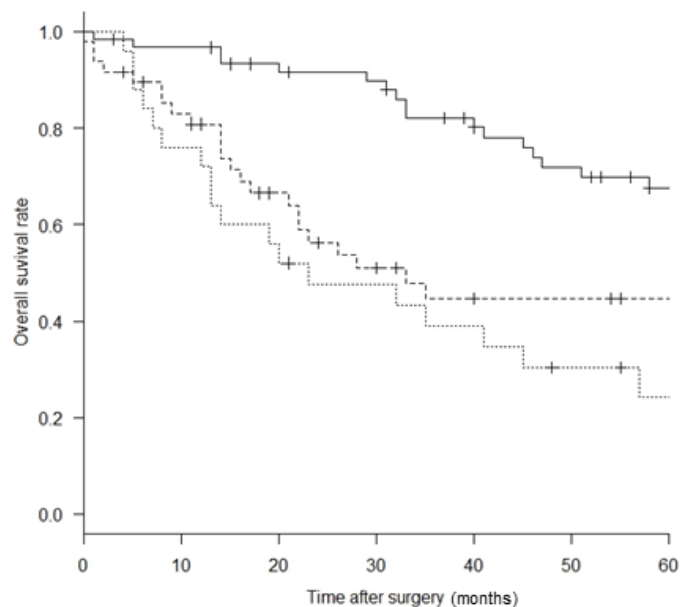
2) 腫瘍の組織学的分化度

腫瘍における最も優勢な成分を対象に評価する方法で評価を行うと、113 症例 (44%) が高分化癌、82 症例 (32%) が中分化癌、50 症例 (19%) が低分化癌となった。一方、最も分化度が不良と思われる部位を対象に評価する方法で評価を行うと、24 症例 (9.3%) が高分化癌、112 症例 (44%) が中分化癌、109 症例 (42%) が低分化癌だった。2 つの評価方法の間で、結果に大きな開きが存在した。Kaplan-Meier 曲線においても両者には大きな隔たりが存在した。特に中分化癌の生存曲線の違いはより顕著であった (Figure 3)。

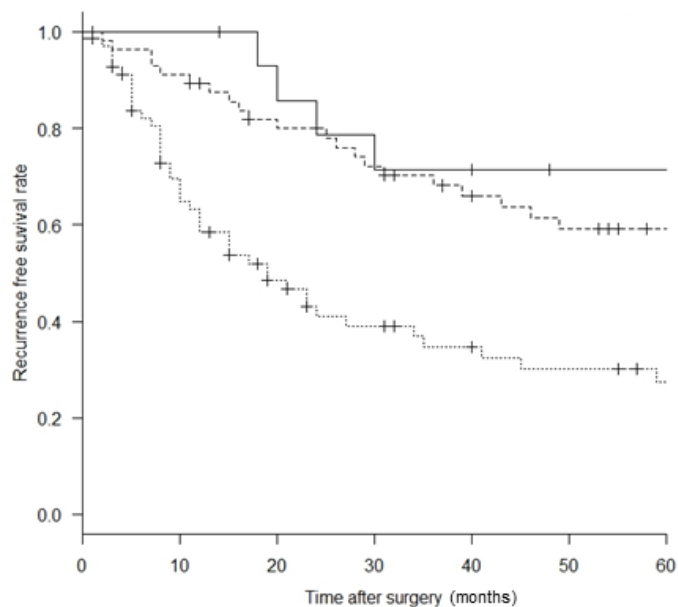
a



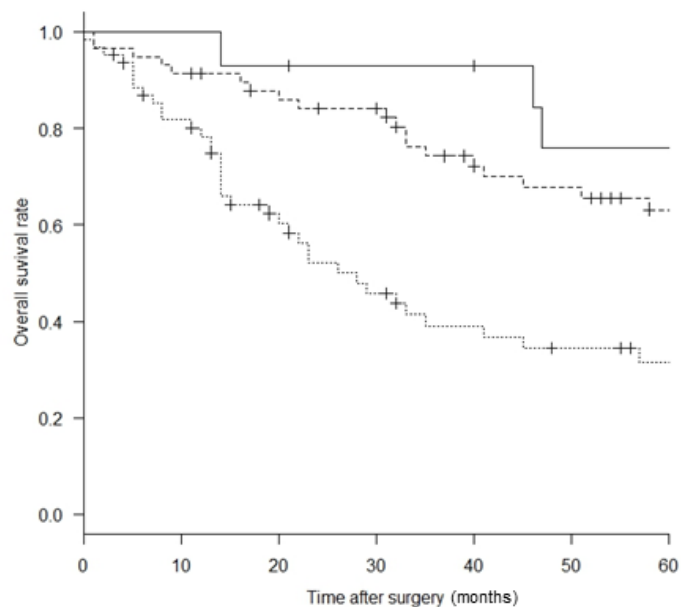
b



c



d



— Well differentiated
 --- Moderately differentiated
 Poorly differentiated

Figure 3: (a) 腫瘍の最も優勢な成分に対して評価した際の Kaplan-Meier 曲線

(Recurrence free survival) (b) 腫瘍の最も優勢な成分に対して評価した際の

Kaplan-Meier 曲線 (Overall survival analysis) (c) 最も分化度が不良と思われる部

位で評価した際の Kaplan-Meier 曲線 (Recurrence free survival) (d) 最も分化度

が不良と思われる部位で評価した際の Kaplan-Meier 曲線 (Overall survival)

3) HGD スコア

上述の方法で算出した HGD スコアの分布は、2 点が 24 症例（9.3%）、3 点が 103 症例（40%）、4 点が 36 症例（14%）、5 点が 68 症例（26%）、6 点が 14 症例（5.5%）だった。Kaplan-Meier 曲線をプロットすると、スコアが上がるとともに RFS および OS ともに不良であった（Figure 4）。

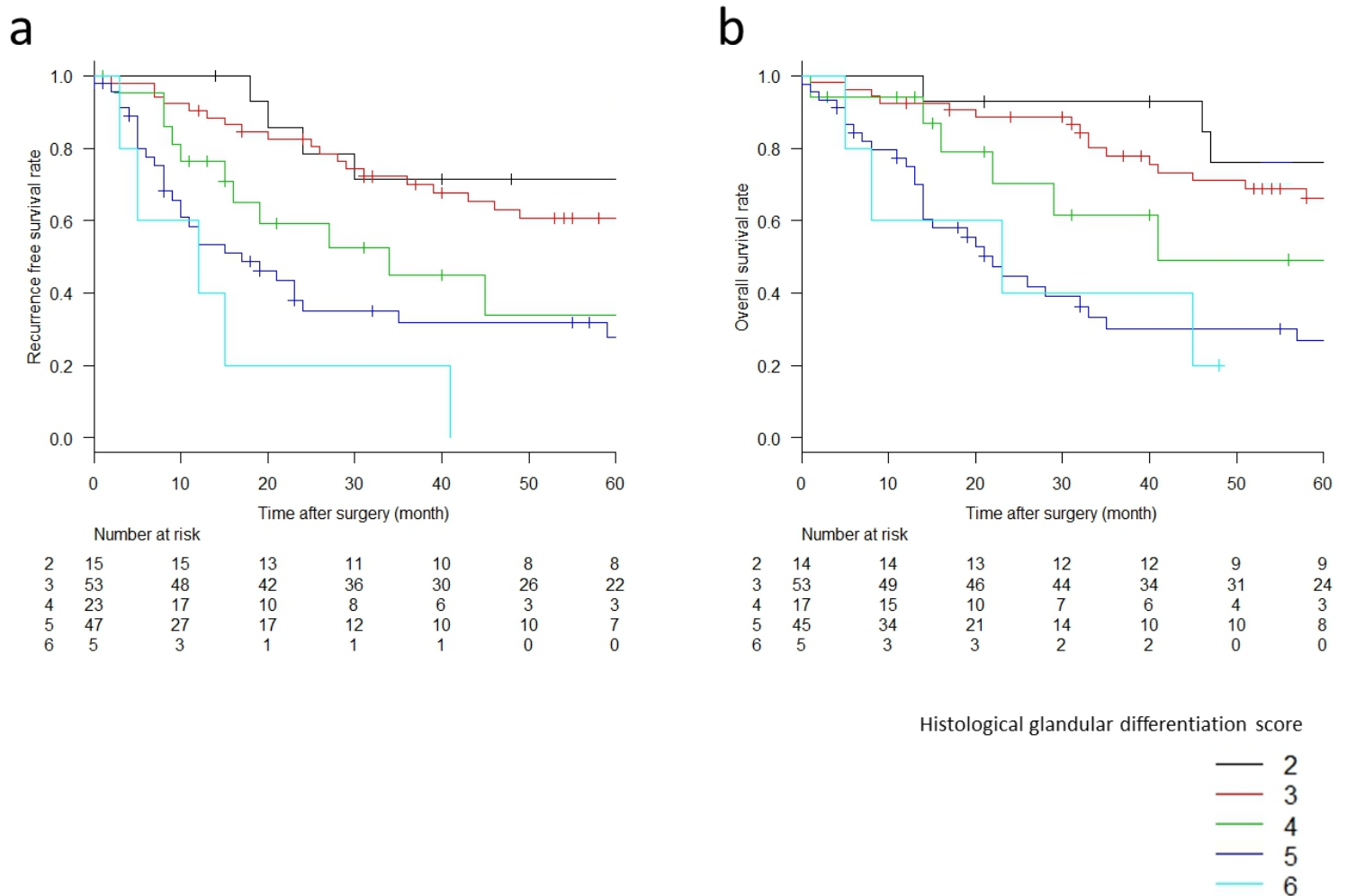


Figure 4: Histological glandular differentiation score 別の Kaplan-Meier 曲線

(a) Recurrence free survival) (b) Overall survival

4) 多変量解析

Cox 比例ハザード回帰による多変量解析では、肝外胆管癌患者の RFS に影響を及ぼす因子として、リンパ節転移、癌遺残、HGD スコアが挙げられた（ハザード比がそれぞれ 1.55、2.58、1.92、95%信頼区間がそれぞれ 1.07-2.25、1.93-3.46、1.34-2.77、p 値がそれぞれ 0.019、<0.0001、0.00041）。また、OS に影響を及ぼす因子としては、年齢、癌遺残、HGD スコアが挙げられた（ハザード比がそれぞれ 1.02、2.36、2.29、95%信頼区間がそれぞれ 1.00-1.05、1.76-3.17、1.56-3.34、p 値がそれぞれ 0.029、<0.0001、<0.0001）。(Table 2)

5) HGD スコアとリンパ節転移による層別化

多変量解析の結果より HGD スコアとリンパ節転移は独立した予後因子であることが示されたため、我々は症例をリンパ節転移を有する群とリンパ節転移を認めなかった群の 2 つのサブグループに分け、HGD スコアに応じた（4 点以上が高得点群、4 点未満が低得点群）Kaplan-Meier 曲線をプロットした。RFS においては、両グループともに高得点群が予後不良となる結果だった (Figure 5)。

OS においても同様の傾向がみられたが、リンパ節転移陰性群では p 値が 0.061 であり、統計学的に有意な差ではなかった。これらの結果より、我々は症例を

(i) 非浸潤癌グループ（リンパ節転移無し）、(ii) HDS 低スコアかつリンパ節転移を認めないグループ、(iii) HDS 高スコアだがリンパ節転移は認めないグループ、(iv) HDS 低スコアだがリンパ節転移を認めるグループ、(v) HDS 高スコアかつリンパ節転移を認めるグループの 5 つに大別した。このグループで Kaplan-Meier 曲線をプロットすると、i、ii、iii + iv、v のグループの順番に RFS がきれいに層別化可能だった。一方、OS ではきれいな層別化はできなかったが、おおむね同様の順に予後不良な傾向があった (Figure 5)。

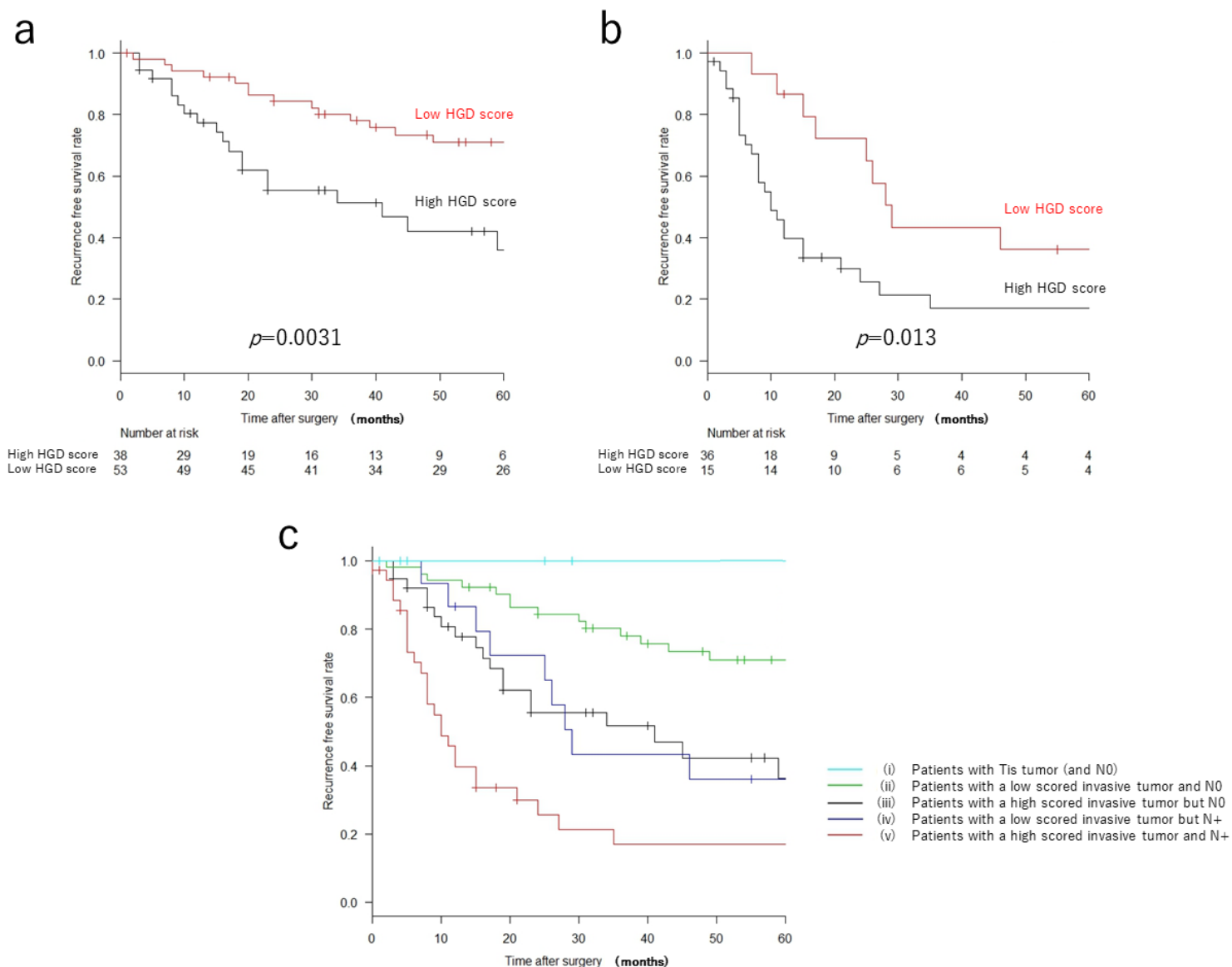


Figure 5: (a) リンパ節転移を認めない群における histological glandular score 別の Kaplan-Meier 曲線 (Recurrence free survival) (b) リンパ節転移を有する群における histological glandular score 別の Kaplan-Meier 曲線 (Recurrence free survival) (c) リンパ節転移の有無と histological glandular score によって層別化した Kaplan-Meier 曲線 (Recurrence free survival)

N-: N-negative, N+: N-positive

Table 2. Multivariate analyses of factors associated with recurrence-free survival (RFS) and overall survival (OS)			
	Variables	Hazard ratio (95% confidence interval)	Multivariate analysis P-value
RFS	Lymph node metastasis	1.55 (1.07-2.25)	0.019
	Residual tumor (microscopic or macroscopic)	2.58 (1.93-3.46)	<0.0001
	Histological glandular differentiation score (≥ 4)	1.92 (1.34-2.77)	0.00041
OS	Age	1.02 (1.00-1.05)	0.029
	Residual tumor (microscopic or macroscopic)	2.36 (1.76-3.17)	<0.0001
	Histological glandular differentiation score (≥ 4)	2.29 (1.56-3.34)	<0.0001

考察

本研究の結果より、全肝外胆管癌を対象とした発生部位に依存しない我々の提唱する新たな組織学的分化度分類は有用と考えられた。本法では、癌を構成する腺管の分化度に応じてスコアリングを行うが、主たる 2 領域を評価しその和を算出することで HGD スコアを得る。スコアが上がるにつれ、RFS および OS とともに短縮する傾向があることが示された。さらに、多変量解析においても HGD スコアが肝外胆管癌における発生部位に依存しない独立した予後因子であることも明らかとなった。

これまで多くの研究で組織学的分化度と癌の予後には密接な関係が存在していることが明らかとなっている。しかしながら、その分化度の評価は主観的な評価で再現性にやや乏しく、腫瘍内の不均一性が強い場合、評価のばらつきがさらに大きくなることが問題点として挙げられる。実際にわれわれの検証においても、腫瘍の優勢な箇所での評価と、分化度が不良と思われる箇所での評価で結果が大きく異なっていた。前立腺癌で用いられる Gleason 分類を模した我々の提唱する HGD スコアは、臨床で運用されている古典的な評価方法を補完しうると考える。肝外胆管癌に本法を適用するメリットはいくつか存在するが、第一に肝外胆管癌はそのほとんどが腺癌であるため、例外が少なくスコアリン

グ自体が比較的容易であることが挙げられる。さらに、2 か所で評価を行っているため評価者間のばらつきも小さくなることが期待できる。上述の通り、膵癌においても我々と同様の手法による評価の有用性が過去に報告されているが（19）、臨床現場において広く普及はしていない。その原因としては、膵癌が極めて予後不良な疾患であるため、分類自体の意義が乏しいとみなされた可能性が挙げられる。加えて、近年膵癌の治療は術前治療を行ってから手術が行われることが一般的になってきており（21）、切除後の組織学的評価が困難という側面も存在する。

本研究において、様々な群を対象に Kaplan-Meier 曲線をプロットし RFS および OS を評価したが、OS よりも RFS が肝外胆管癌の生物学的悪性度を反映していると考えた。肝外胆管癌患者は、一度再発すると有効な治療法の選択肢が乏しく長期の生存が困難であることが多い。そのため、再発というエンドポイントが死亡とほぼ同様の意味を持つと解釈することもできる。一方、肝外胆管癌患者の多くは高齢者で（22）、その手術の侵襲の大きさから周術期死亡も一定の頻度で発生する。実際に本研究における多変量解析においても OS に影響を及ぼす因子として「年齢」が挙げられていた。HGD スコアとリンパ節転移の有無で 5 つのグループに分類しプロットした RFS の Kaplan-Meier 曲線では、比較的明瞭に 4 段階に層別化が可能だった。この HDS スコアとリンパ節転移の有無による分類は、患者の予後を予測するのに非常に有用と考えられた。

本研究はいくつかの限界も存在する。第一に、本文類は切除可能な肝外胆管癌にしか適用できない点である。切除不能の患者では、当然組織学的な評価ができないため予後予測は困難である。次に、分化度の評価はどうしても主観的な判断になってしまう点である。しかしながら、我々の提唱する方法では、2 つの領域で評価を行うためこれまでの古典的な方法と比較するとばらつきは最小

限となることが予想される。

本研究で、肝外胆管癌患者における組織学的分化度は予後と密接に関与していることが示された。また、HGD スコアは切除可能な肝外胆管癌患者の予後を予測する指標として、発生部位に依存しない重要な指標と考えられた。

肝外胆管癌の癌間質における **Matriptase** 高発現が予後に与える影響

緒言

肝外胆管癌における組織学的特徴の 1 つとして、間質における豊富な線維芽細胞の増生が知られる (23)。前研究にて我々が対象とした肝外胆管癌症例においても、やはり同様の所見が多数の症例でみられた。癌間質は、線維芽細胞や血管の内皮細胞、免疫細胞などが癌細胞と相互に影響を及ぼしあう微小環境であり、癌の発育・浸潤に大きな影響を及ぼすことが報告されている (24)。また、癌間質に存在する癌関連線維芽細胞 (CAFs: Cancer-associated fibroblasts) は癌促進性にはたらく様々な増殖因子を産生することで知られる (24, 25)。一方で、癌細胞も自身が発育に有利な状況をつくるべく微小環境に干渉する機構を有することも知られている (25)。胆管癌においても、CAFs が分泌するパラクリン因子によって癌細胞が細胞死機構から守られていることを報告する研究などが存在する (26)。

PDGF (platelet-derived growth factor) ファミリーは線維芽細胞を遊走、増殖させる因子の一つであり、癌細胞と間質の相互作用において重要な因子として知られている (27)。PDGF は A、B、C、D、の 4 つのリガンドが存在し、それぞれに対応したレセプターに結合することでその機能を発揮する。PDGF-A および PDGF-B は、*furin* と呼ばれるプロテアーゼにより細胞内で切断処理をされ、活性型の二量体として分泌される (28)。対照的に PDGF-C と PDGF-D は、N 末端の CUB ドメインを有し非活性状態で分泌される (29, 30)。それぞれ、活性型となるには *urokinase plasminogen activator* (uPA) や *Matriptase* といったセリンプロテアーゼによる CUB ドメイン除去を受ける必要がある (29-31)。特に、*Matriptase* は前立腺癌における PDGF-D の主要な

調節因子である (9)。

Matriptase は、II 型膜貫通セリンプロテアーゼの 1 つであり、上皮を由来とする様々な腫瘍で発現が亢進していることが知られている (32)。Matriptase の基質スペクトルには肝細胞増殖因子 (HGF: hepatocyte growth factor) の前駆体や、PDGF-C および D、uPA、細胞外マトリックス (ECM: extracellular matrix) などが含まれる (9, 32, 33)。これらのことより、Matriptase は細胞外マトリックスのリモデリングなどのプロテアーゼのネットワークを制御しており、癌の浸潤性発育を促進する因子として考えられている (34)。

胆管癌細胞は、PDGF-D を分泌することで CAFs を誘導していると報告されている (7,8)。PDGF-D が活性型となるために Matriptase が必要であることを鑑みると、CAFs、PDGF-D、Matriptase は胆管癌患者の予後に大きな影響を及ぼすと考えられる。しかしながら、これらが再発や死亡といった臨床的なアウトカムにどれだけの影響を及ぼしているのか不明である。本研究では、肝外胆管癌患者を対象に PDGF-D および Matriptase の発現を免疫組織化学的に評価し、予後を含めた臨床病理学的意義との関連を検証した。

材料と方法

1) 症例

対象は上述の肝外胆管癌 257 症例とした (Table 1)。

2) 組織マイクロアレイ (TMA: Tissue microarray) の作製 (Figure 6)

PDGF-D および Matriptase の発現を免疫組織化学的に検討するにあたり、組織マイクロアレイ (TMA) の作製を行った。1 つの腫瘍に対して 2 か所からそれぞれ 3 mmのコアを採取した。コアの選択にあたっては、可能な限り腫瘍の不

均一性を再現するべく、病理専門医と協議を行いながら組織学的に同一でないと思われる部位を選出した。257 症例中 4 例では技術的な問題から TMA 作製が困難であったため、通常切片を用いた。

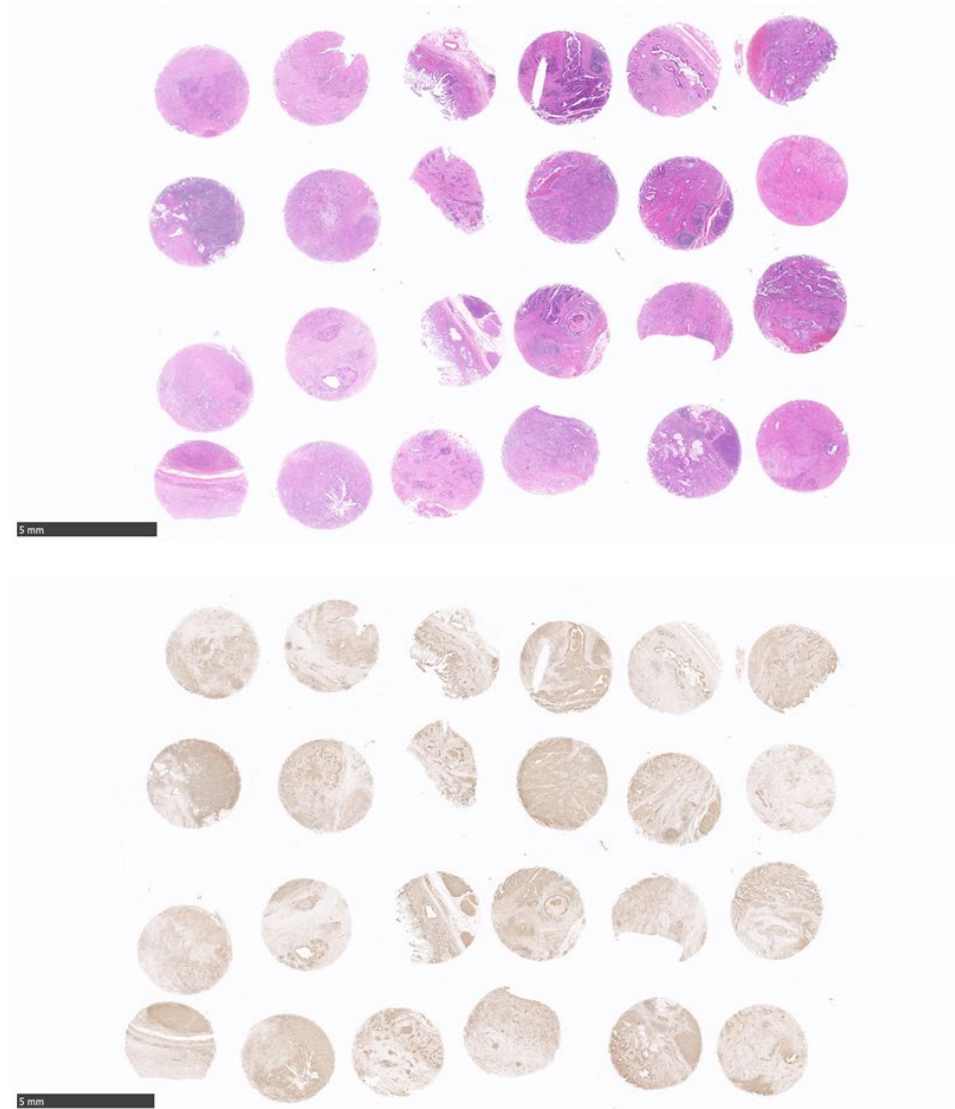


Figure 6: Tissue microarray

上 : Hematoxylin-Eosin 染色 下 : 免疫染色 (Matriptase)

Scale bar = 5mm

3) 免疫組織化学染色

Envision+ Dual Link System-HRP (Dako, Agilent Solutions, Santa Clara, CA, USA) によるポリマー法にて行った。抗 PDGF-D 抗体 (Rabbit polyclonal IgG, catalog#: 40-2100) は Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, USA) より、抗 Matriptase 抗体 (Rabbit polyclonal IgG, catalog#: LS-B904) は LSBio (LifeSpan BioSciences, USA) よりそれぞれ購入した。まず、パラフィンブロックを 4 μ m に薄切し、脱パラフィンおよび水洗後に抗原賦活化を行った。抗原賦活化は、pH6.0 のクエン酸バッファーを用いてのマイクロウェーブ熱処理 (95°C、10 分間) を選択した。次に、0.3%過酸化水素メタノールによる内在性ペルオキシダーゼ除去を行い一次抗体反応へ移行した (4°C、オーバーナイト)。希釈率は PDGF-D が 50 倍、Matriptase は 200 倍とした。最後にホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ポリマーと連結された二次抗体 (Envision+ Dual Link System-HRP) による抗体反応を行い (室温、2 時間)、ペルオキシダーゼ活性をジアミノベンジンにて発色検出した。対比染色はマイヤーヘマトキシリンを使用した。

PDGF-D および Matriptase とともに発現の評価は癌細胞および間質の両方で行い、発現強度および発現分布の 2 つで評価した。発現強度は 0 (陰性)、1 (弱陽性)、2 (中等度陽性)、3 (強陽性) の 4 段階評価とした。発現分布 (1 つのコアに対する発現細胞あるいは間質領域の全体に対する割合) についても、0 (25%未満)、1 (25-50%)、2 (50-75%)、3 (75%以上) の 4 段階で評価した。癌細胞および間質ともに、発現強度と発現分布の 2 つのスコアを足して最終的な評価とした。非浸潤癌 (carcinoma in situ) の症例においては、癌間質の定義が困難であったため評価の対象外とした。本研究では 1 つの腫瘍に対して 2 つのコアで評価を行っており、2 つのコアで評価が異なった場合はスコアの

大きかった方を最終的なスコアとすることとした。

4) 統計学的解析

本研究においても、すべての統計解析には EZR を使用した (20)。癌細胞および間質における PDGF-D、Matriptase の発現と各々の臨床病理学的因子（年齢、性別、リンパ節転移、静脈侵襲、リンパ管侵襲、神経侵襲）の関連については Fisher の正確検定にて行った。さらに、PDGF-D、Matriptase の発現と対象の無再発生存期 (RFS: recurrence-free survival) および全生存期間 (OS: overall survival) の相関を調べるために Kaplan-Meier 曲線をプロットした。生存曲線の比較には log-rank 検定を用いた。生存曲線の単変量解析においては、根治手術が得られた症例のみを対象とした。癌細胞および間質における PDGF-D、Matriptase の発現と臨床病理学的因子（年齢、性別、リンパ節転移、静脈侵襲、リンパ管侵襲、神経侵襲、癌遺残）を対象に Cox 比例ハザード回帰による生存曲線についての多変量解析を行った。多変量解析においては、癌遺残の有無は胆道癌の重要な予後因子であることから非治癒切除の症例も解析に含めた。「肉眼的癌遺残あり」の群においては、再発までの期間を「0 か月」とした。

結果

1) 癌細胞における PDGF-D と Matriptase の発現

ほとんどの症例の癌細胞で、PDGF-D および Matriptase とともに中等度から強度に染色された。発現が確認されたのは細胞質であったが、核や細胞膜が染色された症例も散見された (Figure 7)。隣接する非腫瘍性の上皮細胞ではほとんど PDGF-D の発現は確認できなかったのに対し、Matriptase の染色では正常上皮細胞でも染色されるケースが存在した。癌細胞の評価にあたっては PDGF-D、

Matriptase ともに染色される症例が多かったため発現強度と発現分布の合計スコアは全体に高めとなった。統計学的な解析を行うにあたり、5 点をカットオフ値として設定し、最終スコアが 5 点以上を高発現、5 点未満を低発現と定義した。

PDGF-D においては、83 例 (32%) が高発現で、173 例 (67%) が低発現だった。一方 Matriptase においては、126 例 (48%) が高発現で、130 例 (51%) が低発現だった (Table 3)。非浸潤癌と比較して、浸潤癌では、PDGF-D ($p=0.011$) および Matriptase ($p=0.035$) とともに有意に癌細胞で高発現している症例が多かった。また、PDGF-D、Matriptase とともに高発現例では静脈侵襲が高頻度に見られた (それぞれ $p=0.038$ 、 0.00094)。Matriptase 高発現例では傍神経侵襲との相関関係もみられた ($p=0.044$)。Kaplan-Meier 曲線をプロットすると、癌細胞における Matriptase 高発現群で OS の短縮が見られたが ($p=0.048$)、RFS では確認できなかった ($p=0.087$)。PDGF-D に関しては、癌細胞に高発現が見られる群でも OS および RFS とともに有意な短縮は確認できなかった (それぞれ $p=0.12$ 、 0.092)

2) 癌間質における PDGF-D と Matriptase の発現

PDGF-D および Matriptase とともに癌間質で染色性がみられる症例も存在した (Figure 7)。染色されている成分の大部分は線維芽細胞だったが、炎症細胞や血管内皮細胞、ECM でも染色がみられる症例も存在した。症例の大部分が一樣に染色された癌細胞と対照的に、癌間質ではその染色性は様々で、高発現群と低発現群に大別しやすかった。統計学的な解析を行うため、4 点をカットオフ値として設定し、スコアが 4 点以上を高発現、4 点未満を低発現と定義した。

癌間質の評価においては、60 症例 (26%) が PDGF-D 高発現で、91 症例 (40%) が Matriptase 高発現に分類された (Table 4)。癌間質に PDGF-D が高発現し

ている群ではリンパ管侵襲が高頻度に見られた ($p=0.0034$)。一方で、癌間質に Matriptase が高発現している群では、有意にリンパ節転移、静脈侵襲、リンパ管侵襲が多かった (それぞれ $p=0.028$ 、 0.032 、 0.00039)。Kaplan-Meier 曲線をプロットすると、PDGF-D 高発現群で OS の短縮がみられたが ($p=0.027$)、RFS では有意な差が得られなかった ($p=0.11$)。Matriptase 高発現群では、OS および RFS とともに有意な差をもって短縮がみられた (それぞれ $p=0.0023$ 、 0.0027) (Figure 8)。

癌細胞と間質における PDGF-D、Matriptase の発現とその関連についても解析を行うと、PDGF-D と Matriptase は互いに相関関係にあった (Table 5)。癌細胞と間質の両方で、PDGF-D が発現している腫瘍では Matriptase も発現がみられるケースが多かった。

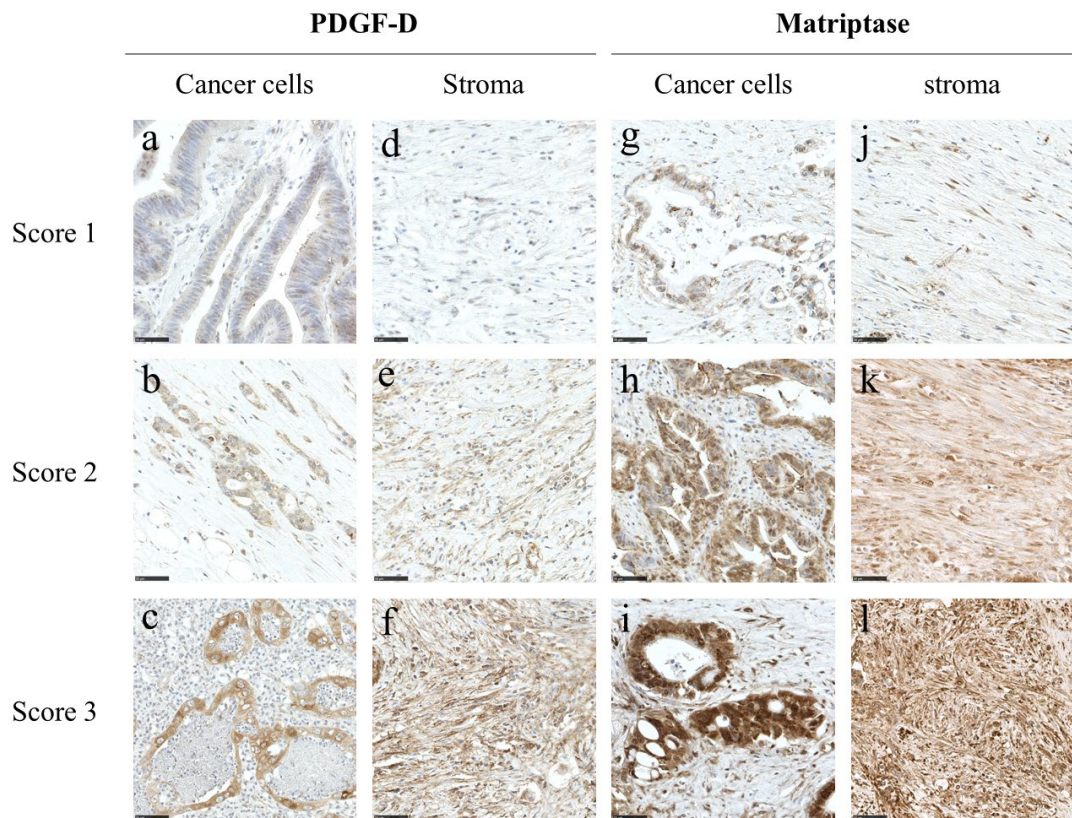


Figure 7: 癌細胞と癌間質における発現強度とスコアの対比

(a-f) Platelet-derived growth factor (PDGF) –D 染色 (g-l) Matriptase 染色

Scale bar = 50μm

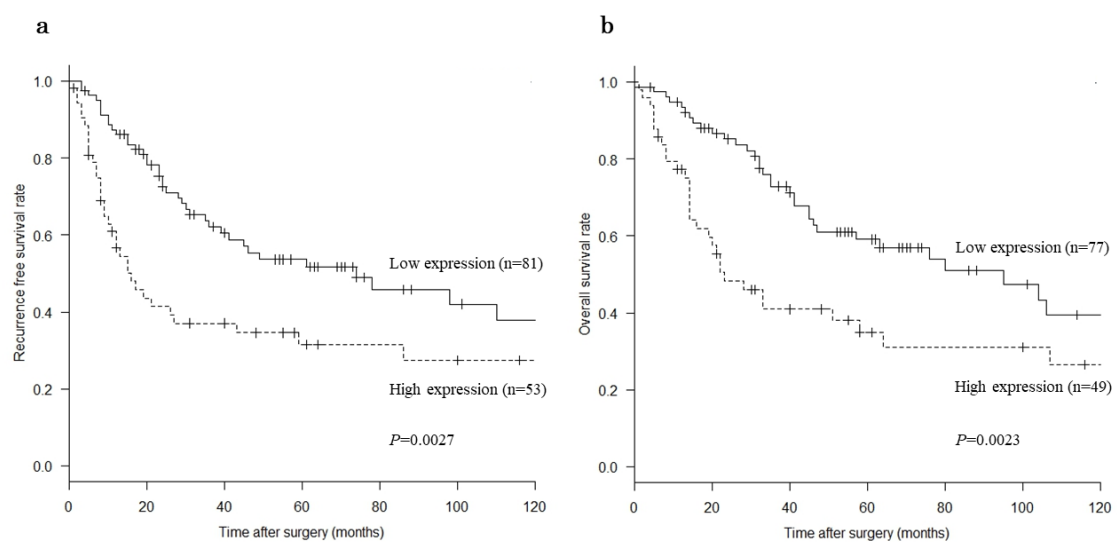


Figure 8: 癌間質 Matriptase 発現レベル別の Kaplan-Meier 曲線

(a) Recurrence free survival (b) Overall survival

Table 3. Clinicopathological factors and expression levels of platelet-derived growth factor (PDGF-D) and matriptase in extrahepatic bile duct cancer cells						
Variables	PDGF-D expression, n		<i>p</i> -value	Matriptase expression, n		<i>p</i> -value
	Low (n=173)	High (n=83)		Low (n=130)	High (n=126)	
Age, years			0.59			0.9
<70	89	39		64	64	
≥70	84	44		66	62	
Gender, n			0.48			0.89
Male	115	59		89	85	
Female	58	24		41	41	
Depth of invasion, n			0.011			0.035
Carcinoma in situ	12	0		10	2	
Invasive cancer	150	79		110	119	
Lymph node metastasis, n			1.0			0.52
Positive	68	33		49	52	
Negative	102	48		79	71	
No data	3	2		2	3	
Venous invasion			0.038			0.00094
Positive	128	71		90	109	
Negative	45	12		40	17	
Lymphatic invasion			0.67			0.11
Positive	116	58		82	92	
Negative	57	25		48	34	
Perineural invasion			0.25			0.044
Positive	134	70		97	107	
Negative	39	13		33	19	
Residual tumor, n			0.67			0.42
No residual tumor	106	56		78	84	
Residual tumor (macroscopic or microscopic)	58	27		46	39	
No data	9	0		6	3	

Table 4. Clinicopathological factors and expression levels of platelet-derived growth factor (PDGF-D) and matriptase in extrahepatic bile duct cancer stroma

Variables	PDGF-D expression, n		<i>p</i> -value	Matriptase expression, n		<i>p</i> -value
	Low (n=173)	High (n=60)		Low (n=139)	High (n=91)	
Age, years			0.65			0.42
<70	86	28		72	42	
≥70	84	32		67	49	
Gender, n			0.87			0.47
Male	116	40		97	59	
Female	54	20		42	32	
Lymh node metastasis, n			0.067			0.028
Positive	67	32		52	47	
Negative	102	27		87	42	
No data	1	1		0	2	
Venous invasion			0.081			0.032
Positive	142	56		114	84	
Negative	28	4		25	7	
Lymphatic invasion			0.0034			0.00039
Positive	118	53		92	79	
Negative	52	7		47	12	
Perineural invasion			1.0			0.67
Positive	151	53		122	82	
Negative	19	7		17	9	
Residual tumor, n			0.63			0.78
No residual tumor	103	40		84	59	
Residual tumor (macroscopic or microscopic)	60	19		48	31	
No data	7	1		7	1	

Table 5. Association between platelet-derived growth factor (PDGF)-D and matriptase expression, cancer cells and stroma

	Matriptase expression						
	Cancer cells			Stroma			
PDGF-D expression	Low (n=130)	High (n=126)	P-value	Low (n=139)	High (n=91)	P-value	
Cancer cells			<0.0001			0.0018	
Low (n=173)	119	54		102	48		
High (n=83)	11	72		37	43		
Stroma			0.00015			<0.0001	
Low (n=170)	94	66		139	31		
High (n=60)	16	44		0	60		

3) 癌間質における Matriptase 発現の予後因子としての意義

上述の通り、癌間質で Matriptase を高発現している群では、低発現群と比較して有意に RFS（症例数：53 対 81、5 年無再発生存率：31.4%対 53.6%、95%信頼区間：18.5-45.2%対 41.1-64.6%、 $p=0.0027$ ）および OS（症例数：49 対 77、5 年生存率：34.8%対 59.1%、95%信頼区間：20.8-49.2%対 45.9-70.0%、 $p=0.0023$ ）の短縮がみられた（Figure 8）。多変量解析においても（Table 6）、癌間質における Matriptase 発現は独立した予後因子だった（RFS におけるハザード比：1.7、95%信頼区間：1.2-2.4、 $p=0.0050$ 、OS におけるハザード比：1.7、95%信頼区間：1.2-2.5、 $p=0.0093$ ）。他に RFS および OS 両方に関連のある因子としては、癌遺残が挙げられた（RFS におけるハザード比：2.6、95%信頼区間：1.9-3.5、 $p<0.0001$ 、OS におけるハザード比：2.3、95%信頼区間：1.7-3.2、 $p<0.0001$ ）。

Table 6. Multivariate analyses of factors associated with recurrence free survival (RFS) and overall survival (OS)			
	Variables	Hazard ratio (95% confidence interval)	Multivariate analysis P-value
RFS	Age (≥ 70 years)	1.5 (1.0-2.1)	0.034
	Lymph node metastasis	1.8 (1.2-2.6)	0.0021
	Residual tumor (microscopic or macroscopic)	2.6 (1.9-3.5)	<0.0001
	Matriptase expression in cancer stroma	1.7 (1.2-2.4)	0.0050
OS	Lymphatic invasion	1.7 (1.1-2.8)	0.031
	Residual tumor (microscopic or macroscopic)	2.3 (1.7-3.2)	<0.0001
	Matriptase expression in cancer stroma	1.7 (1.2-2.5)	0.0093

考察

これまで他の癌種でも報告がある通り（32, 35）、本研究の結果より肝外胆管癌細胞もその多くが PDGF-D および Matriptase を発現していることがわかつ

た。さらに、癌間質で **Matriptase** が高発現している群では、低発現群と比較して有意に **RFS** と **OS** が短縮することが示された。多変量解析でも癌間質の **Matriptase** 高発現は独立した予後因子だった。

Matriptase は発癌の過程に関与することが想定されており、多くの癌種において、リアルタイム **PCR** やウェスタンブロット、免疫組織科学などの様々な手法にて発現が亢進していることがこれまで報告されている (36-43)。他の癌種におけるこれまでの報告と同様に、本研究では肝外胆管癌細胞はその多くで **PDGF-D** および **Matriptase** を発現していることが示された。しかしながら、これらの発現が亢進していても **OS** や **RFS** が有意に短縮するという根拠は得られなかった (癌細胞における **Matriptase** 高発現群のみ **OS** の短縮と関連あり)。その原因として考えられるのは、癌細胞においてはそのほとんどが **PDGF-D** および **Matriptase** とともに中等度～高度の発現を示していたため、発現の程度を区別することが困難であった可能性がある。

我々が検索し得た範囲では、癌間質の **PDGF-D** および **Matriptase** の発現に着目した研究は無かった。一方、本研究では肝外胆管癌の一部において、間質の **PDGF-D** と **Matriptase** が高発現していることが示された。さらに、癌間質で **Matriptase** が高発現している群は、低発現群と比較して有意に **RFS** および **OS** が短縮することが判明した。活性型の **Matriptase** は速やかに **HAI-1** (hepatocyte growth factor activator inhibitor-1) と結合し複合体を形成して、細胞膜から取り除かれることが知られている (44)。このため、**ECM** も染色されているようにみえる症例があったのは細胞膜から除去された **Matriptase** を検出していた可能性がある。**Matriptase** は、細胞増殖や遊走、炎症性サイトカインの産生、炎症細胞浸潤、繊維化といった反応だけでなく (45)、**PDGF-D** 活性化の調整にも関与している (9)。本研究の結果では、他の癌種と同様に肝外

胆管癌細胞の多くは PDGF-D を発現していた。そのため、癌間質で **Matriptase** が強発現している腫瘍では、その構成成分である CAFs が PDGF-D を活性化することでリガンドとして利用し、さらなる CAFs の遊走を促している可能性がある。その結果として、患者の予後が悪化することが考えられる。

本研究における多変量解析の結果より、RFS と OS の両方に影響を及ぼす因子として検出されたのは、癌遺残と癌間質の **Matriptase** 高発現のみだった。リンパ節転移については RFS にのみ相関がみられたが、リンパ管侵襲が OS との相関を有していた。肝外胆管癌の予後因子としてはリンパ節転移と癌遺残が非常に有名だが (15, 16)、癌間質の **Matriptase** 高発現の予後因子としての報告は本研究が初めてである。癌間質の **Matriptase** 高発現の正確な生物学的意義は現時点では不明であるものの、腫瘍の悪性度を反映していると考えられる。免疫組織科学的には線維芽細胞が染色されているように見えるが、他の成分も染色されているように見えるため、実際間質のどの成分にどれだけ発現しているかは不明である。また、仮に線維芽細胞に **Matriptase** が発現していると仮定しても、実際に PDGF-D をリガンドとして利用しているかもわからない。そのため、癌間質において **Matriptase** の発現がどのような意味をもつのか、今後の研究で明らかにしていく必要があると思われる。

本研究は、肝外胆管癌の間質における **Matriptase** 高発現が患者の予後不良因子であることを証明した最初の報告である。その結果から、**Matriptase** は同腫瘍における発育過程に重要な因子の 1 つであると結論づけた。

なお、追加の解析 (Fisher の正確検定) で上述の HGD スコア高値と癌間質の **Matriptase** 高発現には相関関係が存在することもわかった ($p<0.0001$)。

胆管癌細胞と線維芽細胞の共培養実験を用いた肝外胆管癌微小環境における Matriptase の意義の解明

緒言

上述の通り、HGD スコア高値と、癌間質で Matriptase が高発現していることには相関関係が存在していた。この事実を鑑みると、癌間質において Matriptase が高発現している腫瘍では、組織学的な分化度が低くなる何らかの機構が存在する可能性がある。例えば、上皮間葉置換（EMT: epithelial Mesenchymal Transition）が誘導されることで癌細胞がその細胞極性を失い、腺管構造の破綻につながるのかもしれない。あるいはその逆で、低分化な癌細胞が存在すると何らかの機構を経由して癌間質の Matriptase 発現を亢進させていることも考えられる。

肝星細胞は、肝細胞と類洞間のディッセ腔と呼ばれる間隙に存在する細胞で、肝傷害時に活性化され線維芽細胞様の形態を呈する。活性化した肝星細胞は肝臓の線維化に関わることが知られており、培養環境下においてやはり線維芽細胞様に変化する（46, 47）。一方、肝細胞と胆管上皮は相互可塑性が存在し、その起源は同一と報告されている（48-50）。これら報告を参考に、胆管癌細胞株と肝星細胞を共培養することで仮想の胆管癌微小環境とした。この培養環境でみられる癌細胞の変化を調べ、これまでに得られた結果との関連を考察した。

材料と方法

1) 細胞

胆管癌細胞株として TFK-1（51）と KKKU-100（52）を、肝星細胞株として TWNT-1（53, 54）を用いた。TFK-1 は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源

センターから、KKU-100 と TWNT-1 は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) 細胞バンクから購入した。細胞培地は 10%FBS (fetal bovine serum)、1%Penicillin/Streptomycin (P/S) 添加 DMEM (Dullbecco's modified standard conditions) 培地を使用し、37℃、5%CO₂ インキュベーターで培養した

2) ウェスタンブロット

TFK-1、KKU-100、TWNT-1 の細胞懸濁液を調整し、細胞懸濁液からの蛋白質抽出には RIPA バッファー (Wako, Japan) を使用した。蛋白質濃度は Qubit 蛋白質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて測定した。すべてのサンプルは、およそ蛋白質量がおよそ 20μg となるように調整し、ポリアクリルアミドゲルにアプライした。電気泳動後、PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレン (Invitrogen, USA) に転写した。メンブレンのブロッキングは Blocking One (Nacalai tesque, Japan) を使用した。抗 PDGF-D 抗体 (catalog#: QL231075, Thermo Fisher Scientific, USA) は 250 倍希釈、抗 Matriptase 抗体 (catalog#: PA5-43127, Thermo Fisher Scientific, USA) は 1000 倍希釈とし、4℃オーバーナイトでインキュベートした。二次抗体は Anti rabbit HRP linked antibody (10000 倍希釈) にて室温 1 時間でインキュベートした。TBS-T にて十分洗浄を行った後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, USA) を滴下し、LAS-3000 (Fujifilm, Japan) を用いて検出した。

3) 癌細胞遊走アッセイ (Figure 9)

遊走アッセイには Falcon セルカルチャーインサート (Corning, USA) を使

用し、pose サイズは $8\mu\text{m}$ を選択した。24 ウェルプレートに TWNT-1 を 5×10^5 個/well、インサートには TFK-1 と KKU-100 を 1×10^5 個で準備した。コントロールとして、TWNT-1 を含まないウェルも準備した。培地は 10%FBS、P/S 添加 DMEM 培地とし、インサートには 200ml、ウェルには 800ml の培地を使用した。37°C、5%CO₂ インキュベーターで 24 時間共培養後にインサートの内側を綿棒で拭い、4%パラホルムアルデヒドにて固定し、ディフ・クイック染色を行った (TFK-1 においては 24 時間共培養では遊走細胞が極端に少なかったため 48 時間共培養とした)。最後にインサートのメンブレンを切り取り、検鏡して細胞数をカウントした。100 倍の視野でそれぞれ任意の 4 か所にて細胞数をカウントし、共培養と単培養の遊走細胞数に差があるか t 検定を用いて解析を行った。

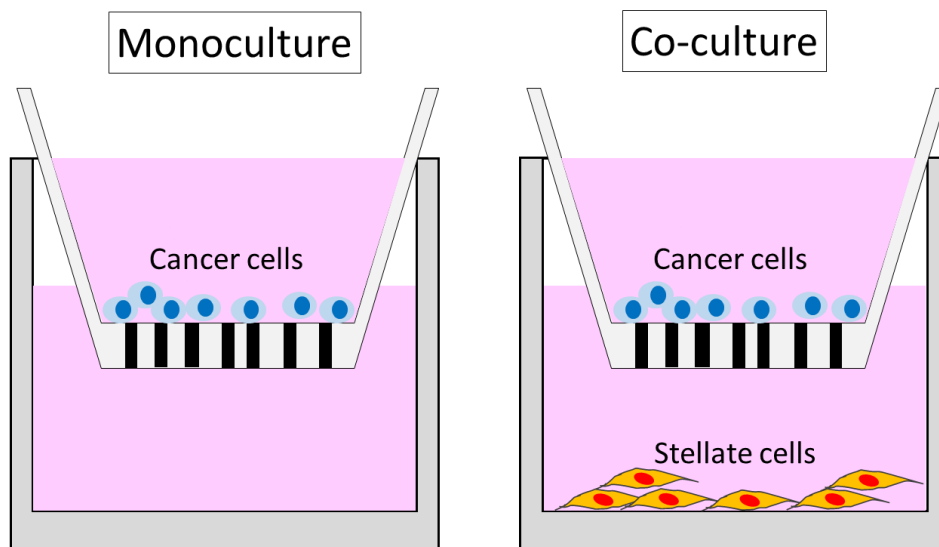


Figure 9: 癌細胞遊走アッセイのシエーマ

4) フローサイトメトリー解析

単培養と共培養下での TFK-1・KKU-100 および TWNT-1 の Matriptase 発

現を比較するため、フローサイトメトリー解析を行った。培養の容器は NICO-1 (ARB-LS, Japan) を使用し、共培養時には 0.6 μ m のフィルターを使用した。細胞数はすべて 1.0×10^5 個で統一した。培地は 10%FBS、P/S 添加 DMEM 培地とし、容器 1 つあたり 1000ml の培地を使用した。37°C、5%CO₂ インキュベーターで 48 時間共培養後に細胞を回収した。細胞懸濁液は、BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences, USA) を用いて細胞膜の透過処理を行った。透過処理後に抗 Matriptase 抗体 (catalog#: MA5-24154, Thermo Fisher Scientific, USA) を加えた後、4°C で 30 分インキュベートした (それぞれアイソタイプコントロールも準備した)。2 回洗浄を行い、二次抗体として Anti-mouse IgG second-AF488 (vatalog#: A-11001, Thermo Fisher, USA) を 10 倍希釈し加え 4°C で 30 分インキュベート、2 回洗浄後に解析を行った。Matriptase 発現の比較は、それぞれの MFI (Mean fluorescence intensity) をアイソタイプコントロールの MFI で除した relative MFI を算出し、replicate で行った実験の平均値を t 検定を用いて統計学的に解析した。

結果

1) ウエスタンブロット

TFK-1 は PDGF-D および Matriptase とともに発現がみられた。KKU-100 にも PDGF-D 発現が確認できた。Matriptase についてはバックグラウンドシグナルの影響で判断が困難であったものの、わずかに発現ありと判断した。TWNT-1 は PDGF-D および Matriptase の発現は確認できなかった (Figure 10)。

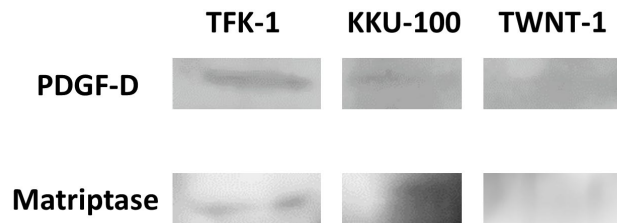


Figure 10: ウエスタンブロット法による核細胞株における PDGF-D および Matriptase の発現

TFK-1 : PDGF-D および Matriptase とともに陽性

KKU-100 : PDGF-D 陽性、Matriptase はわずかに陽性

TWNT-1 : PDGF-D および Matriptase とともに陰性

2) 癌細胞遊走アッセイ

単培養下での 1 視野あたりの遊走細胞数の平均数は、TFK-1 が 2 個で KKU-100 が 53 個だった。一方で共培養下では、TFK-1 が 8 個で KKU-100 が 89 個と両者とも有意に遊走細胞数の増加がみられた(それぞれ $p=0.020$, 0.0092) (Figure 11)。

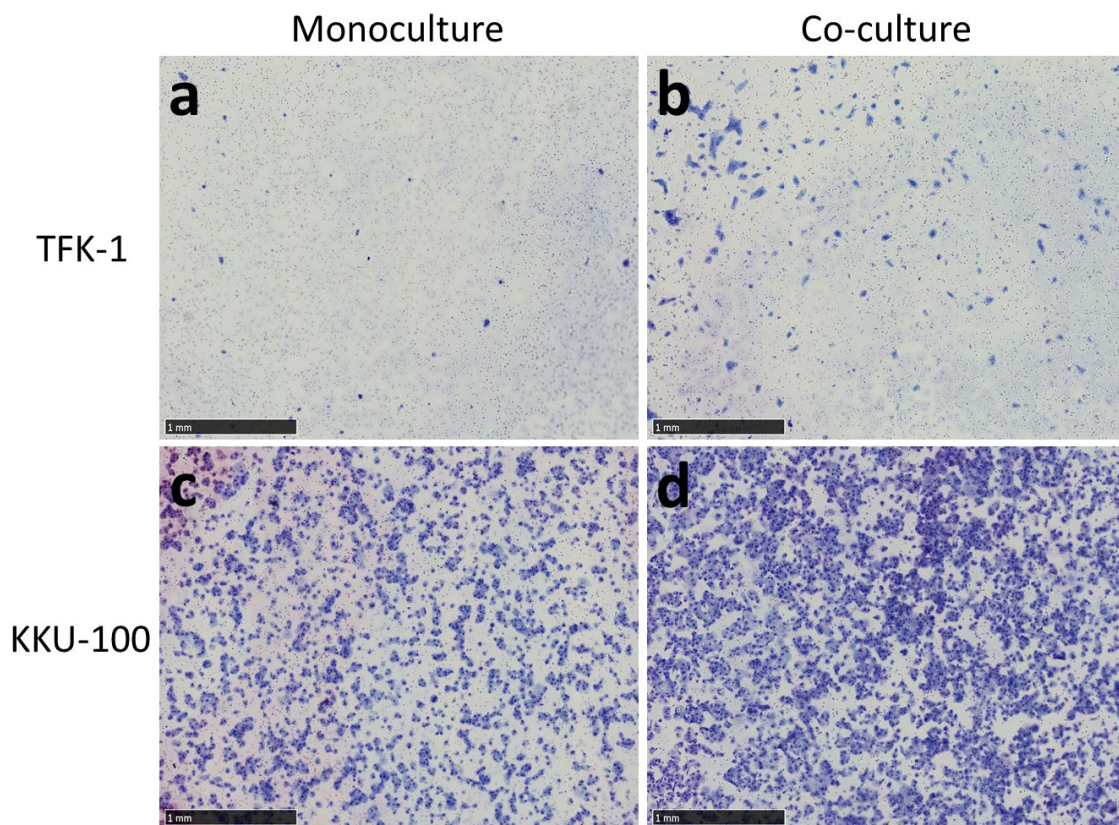


Figure 11: (a) TFK-1 単培養下での遊走細胞 (b) TWNT-1 と共培養時の TFK-1 遊走細胞 (c) KKU-100 単培養下での遊走細胞 (d) TWNT-1 と共培養時の KKU-100 遊走細胞 Scale bar = 1mm

3) フローサイトメトリー解析

TFK-1 においては、**relative MFI** の平均値で比較すると単培養下よりも共培養下で上昇傾向を認めたが、統計学的有意差には至らなかった ($p=0.11$)。KKU-100 においては、単培養下と比較して共培養下で有意な **relative MFI** の上昇を認めた ($p=0.016$) (Figure 12)。TWNT-1 については、TFK-1 との共培養、KKU-100 との共培養の両環境において、単培養下と共培養下での **relative MFI** に有意な差は認められなかった (Figure 13)。

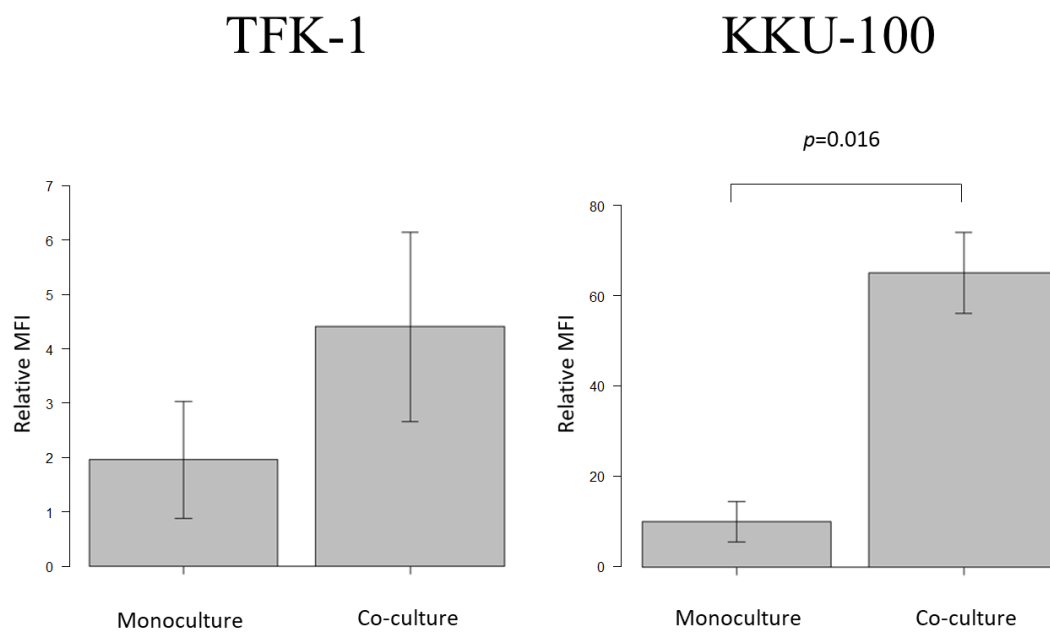


Figure 12: 胆管癌細胞株における relative MFI の比較

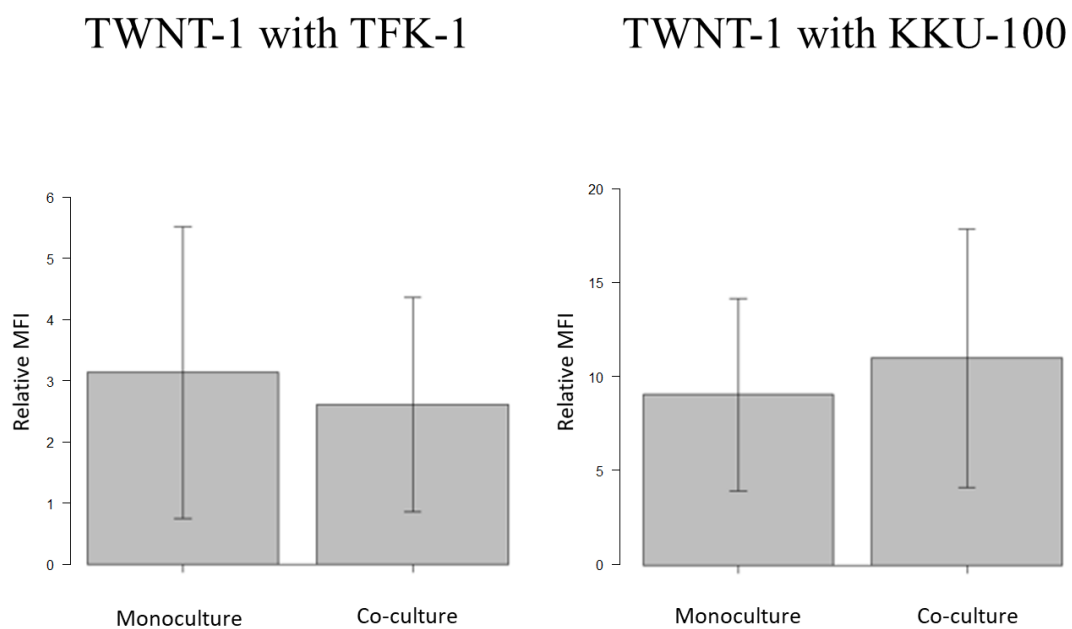


Figure 13: 肝星細胞株における relative MFI の比較

考察

今回対象とした2つの胆管癌細胞株では、ウェスタンブロット法にてPDGF-DおよびMatriptaseがともに発現しており、臨床検体での免疫組織化学的所見を裏付ける結果であった。また、細胞遊走アッセイでは、肝星細胞との共培養下で2つの癌細胞で遊走能の亢進がみられた。さらに、共培養下におけるMatriptaseの発現をフローサイトメトリーにて解析すると、2つの癌細胞ともに共培養下でMatriptase発現が増強する傾向にあった。

これまでの研究で、癌細胞とそれに対応する線維芽細胞を共培養することで癌細胞の遊走能が亢進することが知られている(55)。本研究では、胆管癌細胞と肝星細胞の共培養にて同様の結果が得られており、胆管癌細胞と肝星細胞に何らかの相互作用が存在することが示唆される。

また、フローサイトメトリーを用いた解析では、胆管癌細胞と肝星細胞を共培養することで癌細胞のMatriptase発現が増強する傾向が存在することがわかった。一方で肝星細胞においては、KKU-100との共培養下でMatriptase発現が増強傾向にあったものの、TFK-1との共培養ではむしろMatriptase発現はやや減弱していた。これらの結果を鑑みると、共培養における癌細胞の遊走能亢進は、癌そのもののMatriptase発現が増強することと関連している可能性がある。前研究で得られた「癌間質におけるMatriptase高発現が予後不良に関連する」という結果と直接関連する結果は得られなかったが、上述の通り活性型のMatriptaseは速やかにHAI-1と結合して複合体を形成し、細胞外へ取り除かれるため(44)、癌細胞自身のMatriptase発現が亢進し、細胞外へ蓄積した多量の複合体を免疫組織化学的に検出していたことも考えられる。

癌細胞におけるMatriptase発現とEMTの関連についてもこれまで報告されており(56)、胆管癌細胞もCAFsと共存することでMatriptase発現が増強し、

EMT が促進されているのかもしれない。癌間質の **Matriptase** 高発現と予後不良の関連はその現象の一端を表しているのかもしれないが、今回の実験のみで結論を得るにはまだまだ不十分だった。また、ウェスタンブロット法では TWNT-1 に **Matriptase** 発現が検出できなかったものの、フローサイトメトリーによる解析では単培養下でも **relative MFI** が高値であり、**Matriptase** 発現を示唆する所見だったのも不可解な点である。原因は細胞懸濁液からの蛋白抽出方法の選択や技術的な問題の可能性もあり、異なる手法での再実験の必要があるかもしれない。加えて、共培養を行った培養液中の **Matriptase** 濃度測定ができれば、重要な追加実験になり得ると思われる。単培養時との比較で差が確認できれば細胞外への **Matriptase** 蓄積を支持する重要な所見である。今回の実験で得られた結果は、胆管癌の微小環境を解明するにはまだまだ十分なものではないものの、今後さらなる研究の一助となることを期待する。

おわりに

本研究の主たる目的は、実臨床上では細分類が困難な肝外胆管癌における新しい評価尺度の探索だったが、腫瘍の組織学的分化度をスコア化した HGD スコアと、免疫組織化学的な癌間質における Matriptase 高発現は、予後との関連を認め有用と考えられた。両者ともに腫瘍の発生部位に依存しない独立した予後因子であり、HGD スコアにおいてはリンパ節転移との組み合わせで予後の層別化が可能であり、予後予測のツールとして日常診療にも応用可能である。癌間質における Matriptase 高発現と予後との関連については新たな知見であり、その生物学的意義も解明されれば治療へ応用されていく可能性もある。今回の培養細胞実験ではその意義を解明するのに十分な結果は得られなかったが、胆管癌細胞と肝星細胞が共存することで癌細胞の遊走能が亢進すること、および癌細胞の Matriptase が亢進することが発見できた。これらの結果が、今後のさらなる研究に寄与していくことを期待する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、病理診断の基礎からご教授いただいた自治医科大学附属病院病理診断部の諸先生方、およびスタッフの皆様に深く感謝いたします。また、研究全般にわたってアドバイスをいただいた同教室の大城久准教授、統合病理部門の仁木利郎教授、そして終始適切なご指導をしていただき研究の根幹を支えていただいた福嶋敬宜教授に心より感謝申し上げます。加えて、本研究最後の細胞実験にて、懇切丁寧なご指導をしていただいた自治医科大学臨床研究支援センター北山丈二教授と大澤英之講師へ厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. 日本肝胆膵外科学会 胆道癌取扱い規約第 6 版 金原出版 (2013)
2. The Editorial Board of the Cancer Statistics in Japan. Cancer statistics in Japan 2015. Tokyo: Foundation for Promotion of Cancer Research (2016)
3. 日本胆道癌診療ガイドライン作成委員会 胆道癌診療ガイドライン改訂第 3 版 医学図書出版株式会社 (2019)
4. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 8th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell (2017)
5. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet*. 366, 1303-14 (2005)
6. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*. 111, 58-64 (1974)
7. Cadamuro M, Nardo G, Indraccolo S, Dall'olmo L, Sambado L, Moserle L, Franceschet I, Colledan M, Massani M, Stecca T, Bassi N, Morton S, Spirli C, Fiorotto R, Fabris L, Strazzabosco M. Platelet-derived growth factor-D and Rho GTPases regulate recruitment of cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 58, 1042-53 (2013)
8. Rizvi S, Mertens JC, Bronk SF, Hirsova P, Dai H, Roberts LR, Kaufmann SH, Gores GJ. Platelet-derived growth factor primes cancer-associated fibroblasts for apoptosis. *J Biol Chem*. 289, 22835-49 (2014)
9. Ustach CV, Huang W, Conley-LaComb MK, Lin CY, Che M, Abrams J, Kim HR. A novel signaling axis of matriptase/PDGF-D/ss-PDGFR in human prostate cancer. *Cancer Res*. 70, 9631-40 (2010)

10. Alexander F, Rossi RL, O'Bryan M, Khettry U, Braasch JW, Watkins E Jr. Biliary carcinoma. A review of 109 cases. *Am J Surg.* 147, 503-9 (1984)
11. Okuda K, Kubo Y, Okazaki N, Arishima T, Hashimoto M. Clinical aspects of intrahepatic bile duct carcinoma including hilar carcinoma: a study of 57 autopsy-proven cases. *Cancer.* 39, 232-46 (1977)
12. Tompkins RK, Saunders K, Roslyn JJ, Longmire WP Jr. Changing patterns in diagnosis and management of bile duct cancer. *Ann Surg.* 211, 614-20 (1990)
13. Whelton MJ, Petrelli M, George P, Young WB, Sherlock S. Carcinoma at the junction of the main hepatic ducts. *Q J Med.* 38, 211-30 (1969)
14. Tompkins RK, Johnson J, Storm FK, Longmire WP Jr. Operative endoscopy in the management of biliary tract neoplasms. *Am J Surg.* 132, 174-82 (1976)
15. Kayahara M, Nagakawa T, Ohta T, Kitagawa H, Tajima H, Miwa K. Role of nodal involvement and the periductal soft-tissue margin in middle and distal bile duct cancer. *Ann Surg.* 229, 76-83 (1999)
16. Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Yamasaki S, Makuuchi M. Improved surgical results for hilar cholangiocarcinoma with procedures including major hepatic resection. *Ann Surg.* 230, 663-71 (1999)
17. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, Choti MA, Yeo CJ, Schulick RD. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg.* 245, 755-62 (2007)
18. Weinbren K, Mutum SS. Pathological aspects of cholangiocarcinoma. *J*

Pathol. 139, 217-38 (1983)

19. Adsay NV, Basturk O, Bonnett M, Kilinc N, Andea AA, Feng J, Che M, Aulicino MR, Levi E, Cheng JD. A proposal for a new and more practical grading scheme for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 29, 724-33 (2005)

20. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48, 452-8 (2013)

21. Versteijne E, Vogel JA, Besselink MG, Busch ORC, Wilmink JW, Daams JG, van Eijck CHJ, Groot Koerkamp B, Rasch CRN, van Tienhoven G; Dutch Pancreatic Cancer Group. Meta-analysis comparing upfront surgery with neoadjuvant treatment in patients with resectable or borderline resectable pancreatic cancer. *Br J Surg.* 105, 946-58 (2018)

22. Bosman FT, World Health Organization. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (2010)

23. de Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. Biliary tract cancers. *N Engl J Med.* 341, 1368-78 (1999)

24. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer.* 4, 839-49 (2004)

25. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6, 392-401 (2006)

26. Fingas CD, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Guicciardi ME, Cazanave SC, Mertens JC, Sirica AE, Gores GJ. Myofibroblast-derived PDGF-BB promotes Hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells.

Hepatology. 54, 2076-88 (2011)

27. Yu J, Ustach C, Kim HR. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol*. 36, 49-59 (2003)

28. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 79, 1283-1316 (1999)

29. Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol*. 3, 512-6 (2001)

30. Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Bäckström G, Hellström M, Boström H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol*. 2, 302-9 (2000)

31. Gilbertson DG, Duff ME, West JW, Kelly JD, Sheppard PO, Hofstrand PD, Gao Z, Shoemaker K, Bukowski TR, Moore M, Feldhaus AL, Humes JM, Palmer TE, Hart CE. Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor. *J Biol Chem*. 276, 27406-14 (2001)

32. List K. Matriptase: a culprit in cancer? *Future Oncol*. 5, 97-104 (2009)

33. Hurst NJ Jr., Najy AJ, Ustach CV, Movilla L, Kim HR. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) activation by serine proteases: implications for breast cancer progression. *Biochem J*. 441, 909-18 (2012)

34. Forbs D, Thiel S, Stella MC, Stürzebecher A, Schweinitz A, Steinmetzer T, Stürzebecher J, Uhland K. In vitro inhibition of matriptase prevents invasive growth of cell lines of prostate and colon carcinoma. *Int J Oncol*. 27,

1061-70 (2005)

35. Wang Z, Ahmad A, Li Y, Kong D, Azmi AS, Banerjee S, Sarkar FH. Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression. *Biochim Biophys Acta*. 1806, 122-30 (2010)

36. Jin JS, Chen A, Hsieh DS, Yao CW, Cheng MF, Lin YF. Expression of serine protease matriptase in renal cell carcinoma: correlation of tissue microarray immunohistochemical expression analysis results with clinicopathological parameters. *Int J Surg Pathol*. 14, 65-72 (2006)

37. Jin JS, Cheng TF, Tsai WC, Sheu LF, Chiang H, Yu CP. Expression of the serine protease, matriptase, in breast ductal carcinoma of Chinese women: correlation with clinicopathological parameters. *Histol Histopathol*. 22, 305-9 (2007)

38. Jin JS, Hsieh DS, Loh SH, Chen A, Yao CW, Yen CY. Increasing expression of serine protease matriptase in ovarian tumors: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters. *Mod Pathol*. 19, 447-52 (2006)

39. Lee JW, Yong Song S, Choi JJ, Lee SJ, Kim BG, Park CS, Lee JH, Lin CY, Dickson RB, Bae DS. Increased expression of matriptase is associated with histopathologic grades of cervical neoplasia. *Hum pathol*. 36, 626-33 (2005)

40. Nakamura K, Hongo A, Kodama J, Abarzua F, Nasu Y, Kumon H, Hiramatsu Y. Expression of matriptase and clinical outcome of human endometrial cancer. *Anticancer Res*. 29, 1685-90 (2009)

41. Saleem M. A Novel Biomarker for Staging Human Prostate Adenocarcinoma: Overexpression of Matriptase with Concomitant Loss of its

- Inhibitor, Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor-1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15, 217-27 (2006)
42. Uhlund K, Siphos B, Arkona C, Schuster M, Petri B, Steinmetzer P, Mueller F, Schweinitz A, Steinmetzer T, Van De Loch A. Use of IHC and newly designed matriptase inhibitors to elucidate the role of matriptase in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Oncol.* 35, 347-57 (2009)
43. Tsai WC, Chao YC, Lee WH, Chen A, Sheu LF, Jin JS. Increasing EMMPRIN and matriptase expression in hepatocellular carcinoma: tissue microarray analysis of immunohistochemical scores with clinicopathological parameters. *Histopathology.* 49, 388-95 (2006)
44. List K, Bugge TH, Szabo R. Matriptase: potent proteolysis on the cell surface. *Mol Med.* 12, 1-7 (2006)
45. Uhlund K. Matriptase and its putative role in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 63, 2968-78 (2006)
46. Blomhoff R, Wake K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J.* 5, 271-7 (1991)
47. Friedman, SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 88, 125-72 (2008)
48. Nishikawa Y. Transdifferentiation of mature hepatocytes into bile duct/ductule cells within a collagen gel matrix. *Methods Mol Biol.* 826, 153-60 (2012)
49. Nagahama Y, Sone M, Chen X, Okada Y, Yamamoto M, Xin B, Matsuo Y, Komatsu M, Suzuki A, Enomoto K, Nishikawa Y. Contributions of hepatocytes and bile ductular cells in ductular reactions and remodeling of

the biliary system after chronic liver injury. *Am J Pathol.* 184, 3001-12 (2014).

50. Shiojiri N. Development and differentiation of bile ducts in the mammalian liver. *Microsc Res Tech.* 39, 328-35 (1997)

51. Saijyo S, Kudo T, Suzuki M, Katayose Y, Shinoda M, Muto T, Fukuhara K, Suzuki T, Matsuno S. Establishment of a new extrahepatic bile duct carcinoma cell line, TFK-1. *Tohoku J Exp Med.* 177, 61-71 (1995)

52. Sripa B, Leungwattananit S, Nitta T, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Puapairoj A, Sripa C, Miwa M. Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). *World J Gastroenterol.* 14, 3392-7 (2005)

53. Murakami K, Abe T, Miyazawa M, Yamaguchi M, Masuda T, Matsuura T, Nagamori S, Takeuchi K, Abe K, Kyogoku M. Establishment of a new human cell line, LI90, exhibiting characteristics of hepatic Ito (fat-storing) cells. *Lab Invest.* 72, 731-9 (1995)

54. Watanabe T, Shibata N, Westerman KA, Okitsu T, Allain JE, Sakaguchi M, Totsugawa T, Maruyama M, Matsumura T, Noguchi H, Yamamoto S, Hikida M, Ohmori A, Reth M, Weber A, Tanaka N, Leboulch P, Kobayashi N. Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers. *Transplantation.* 15, 1873-80 (2003)

55. Koukourakis MI, Kalamida D, Mitrakas AG, Liouisia M, Pouliliou S, Sivridis E, Giatromanolaki A. Metabolic cooperation between co-cultured lung cancer cells and lung fibroblasts. *Lab Invest.* 97, 1321-31 (2017)

56. Cheng H, Fukushima T, Takahashi N, Tanaka H, Kataoka H. Hepatocyte

growth factor activator inhibitor type 1 regulates epithelial to mesenchymal transition through membrane-bound serine proteinases. *Cancer Res.* 69, 1828-35 (2009)