

令和元年6月3日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10599

研究課題名(和文)肝転移過程における肝内血管内皮細胞の新たな役割 - 防御から促進へ -

研究課題名(英文) Nobel role of liver endothelial cells in liver metastasis formation

研究代表者

前山 良 (MAEYAMA, Ryo)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10611668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は膵癌の浸潤において癌微小環境中の癌関連線維芽細胞が癌細胞の浸潤を先導する leading cell として機能することを報告した。血管内皮細胞も血管新生の際に高い細胞外基質分解能と遊走能を発揮することから、leading cell として機能する可能性が考えられた。3D培養環境で膵癌細胞株とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を共培養し、HUVECが膵癌の浸潤に与える影響を検討したところ、leading cell としての機能は確認できなかったが、遊走能を亢進させることが示唆され、また、好中球細胞外トラップが肝転移巣での癌関連線維芽細胞の誘導を促進することで肝転移形成を促進する可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は、非常に予後不良な癌腫であり、その原因の一つとして高い転移能が挙げられる。転移先の臓器は主に肝・肺・腹膜・骨であり、中でも肝転移は膵癌患者の予後に大きく関わる。近年、さまざまな癌腫において肝転移のメカニズムが徐々に解明されてきているが、肝転移における肝内血管内皮細胞の役割については未知の部分が多い。本研究において、癌の肝転移形成に関わる現象として好中球細胞外トラップに着目し、好中球細胞外トラップが肝転移巣での癌関連線維芽細胞の誘導を促進することで肝転移形成を促進している可能性が示唆された。このことは今後の新たな膵癌肝転移の制御法を開発する一助となると思われる。

研究成果の概要(英文)：We have reported that cancer-associated fibroblasts have a role as “leading cells” which lead cancer cell invasion in the tumor microenvironment. Same as cancer-associated fibroblasts, we hypothesized that endothelial cells can function as leading cells because of their high migratory activity in angiogenesis. Although co-culture of pancreatic cancer cells (PCCs) and human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) under 3D condition could not reveal the role of HUVECs as leading cells, HUVECs promoted migration of PCCs. Furthermore, neutrophil extracellular traps promoted the formation of liver metastasis through activation of cancer-associated fibroblasts in the metastatic foci.

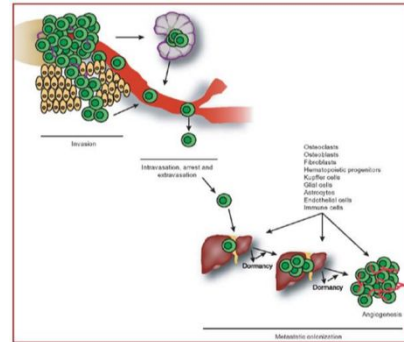
研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 肝転移 血管内皮細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌はわが国において癌死の4位を占め、現在でも5%しか根治しない疾患であるため、膵癌の治療法/診断法の開発は社会的緊急性・重要度が高いがその5年生存率はこの30年間でほとんど改善がない。現在、治癒切除が唯一の根治治療であるが、80%の患者は進行癌で既に切除不能である。そのため、化学療法・放射線療法を主軸とした集学的治療が行われるが、他の消化器癌に比較してその治療効果も乏しいと言わざるを得ない状況である。そのため膵癌の高い転移能を制御する新たな治療法の確立が望まれ、近年では、RNA・microRNA・膵由来間質細胞や膵星細胞など、膵癌の悪性度の関わる様々な因子が報告されている(Cancer Research, 2001, I Andrew; Nature, 2012, Amaia Lujambio & Scott W. Lowe)。しかしながら、遠隔転移としてもっとも頻度の高い肝転移の詳細なメカニズムは未だ不明でその制御法の開発には至っていない(Nature Medicine, 2006, Steeg, P.S)。これまでに正常血管内皮細胞は主に骨髄幹細胞を起源とする(Circulation Research, 2004, Urbich)とされている一方で、腫瘍内の新生血管内皮細胞は主に腫瘍幹細胞に起源を持つことが報告されている(Nature, 2010, Lucia)。さらに腫瘍内の新生血管内皮細胞は各種癌細胞において高発現している VEGF (vascular endothelial growth factor)により血管新生を促進する。血管新生制御のために VEGF を標的とした分子標的治療は確立されているが、血管新生以外の血管内皮細胞の機能を標的とした治療法は未だ開発されていない。



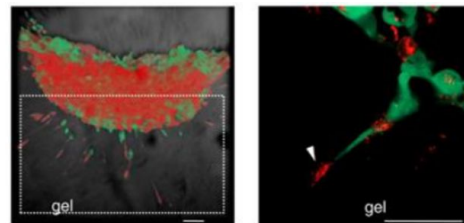
### 2. 研究の目的

膵癌は、非常に予後不良な癌腫であり、その原因の一つとして高い転移能が挙げられる。転移先の臓器は主に肝・肺・腹膜・骨であり、中でも肝転移は膵癌患者の予後に大きく関わる。近年、さまざまな癌腫において肝転移のメカニズムが徐々に解明されてきているが、肝転移における肝内血管内皮細胞の役割については未知の部分が多い。本研究では、膵癌肝転移の過程における肝内血管内皮細胞の新たな役割として癌浸潤を導く leading cell としての機能を解明することを目的としている。さらに、肝内局所の血管内皮細胞をターゲットとした新たな膵癌肝転移の制御法を開発することを目指す。

### 3. 研究の方法

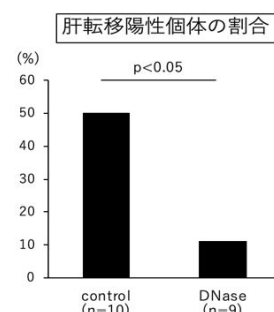
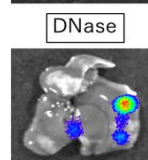
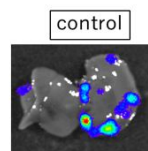
当研究室ではコラーゲンゲル、マトリゲルを用いた3D培養条件で癌関連線維芽細胞が膵癌細胞の浸潤を先導する leading cell として機能することを見出した。

血管内皮細胞は癌組織での血管新生の際に細胞外基質を分解し、組織内に侵入する高い細胞外基質分解能と浸潤能を有していることから血管内細胞も肝転移形成初期において膵癌の浸潤を先導する可能性があるのではないかと考えた。コラーゲンゲル内にレンチウイルスを用いて GFP (緑色)を導入した膵癌細胞と cell tracker (赤色)で染色したヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の懸濁液を注入して3D培養を行い経時的に観察を行った。また、トランスウェルチャンバーを用いて invasion assay を行い、膵癌浸潤における血管内皮細胞の影響を検討した。その他に癌の肝転移形成に関わる減少として好中球細胞外トラップに着目し、マウス好中球と肝転移巣の癌関連線維芽細胞の由来とされる肝星細胞、膵癌自然発癌マウス(KPCマウス; Kras<sup>LSL-G12D/+</sup>; Trp53<sup>LSL-R172H/+</sup>; Cre)由来の膵癌細胞を用いて膵癌肝転移形成における好中球細胞外トラップの役割について検討を行った。

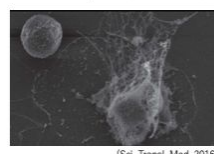
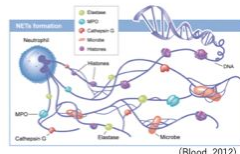


24h

KPCマウス

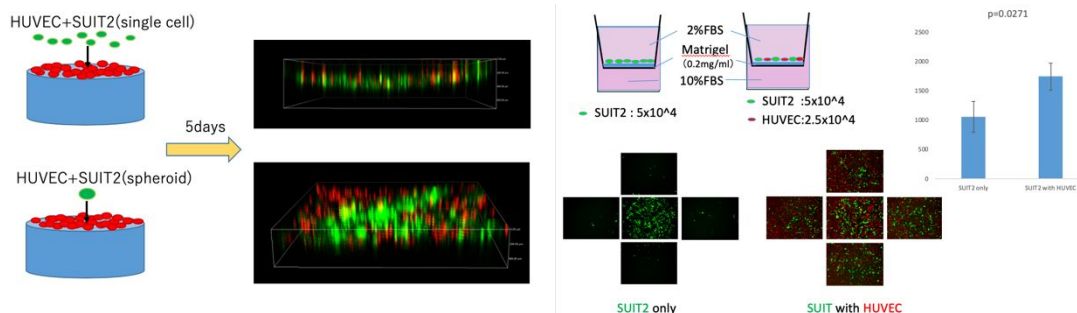


Neutrophil extracellular traps (NETs)

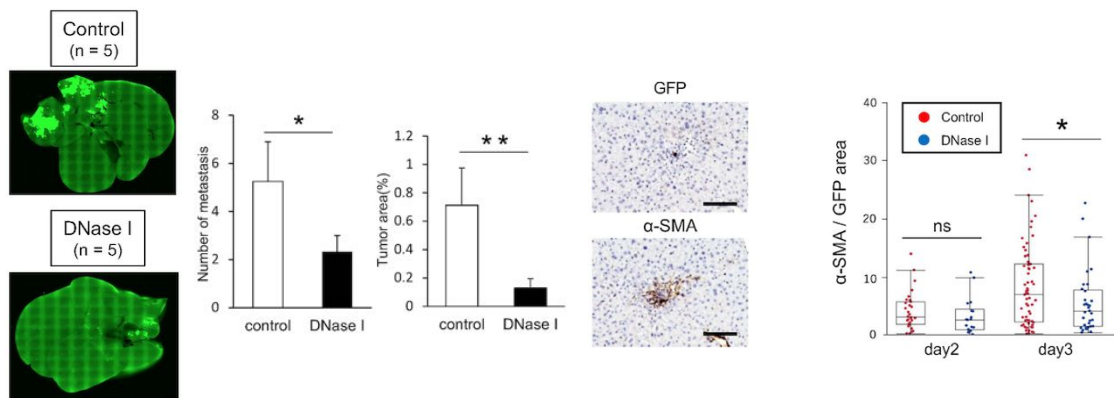


#### 4. 研究成果

膵癌細胞と HUVEC の懸濁液をコラーゲンゲル内に注入する共培養モデルを用いて膵癌浸潤における HUVEC の影響を解析した。癌関連線維芽細胞を用いた実験では膵癌細胞の浸潤を先導する現象が観察されたが、HUVEC では同様の現象は観察されなかった。また、コラーゲンゲル上に HUVEC を単層培養した上に膵癌細胞を散布する実験においても HUVEC と膵癌細胞の相互作用は確認できなかった。しかし、トランスウェルチャンバーを用いた invasion assay では HUVEC との共培養において膵癌細胞の浸潤が促進される様子が確認された。



一方、膵癌肝転移における好中球細胞外トラップの役割について検討を行うために好中球細胞外トラップの阻害剤である DNase I を膵癌細胞の脾注肝転移モデル、膵癌自然発癌モデルマウスにそれぞれ投与した。その結果両モデルにおいて DNase I 投与群では肝転移個数が減少した。また、脾注肝転移モデルにおいては、GFP を導入した癌細胞注入後3日目の肝転移巣の癌関連線維芽細胞の誘導が抑制された。In vitro においては膵癌細胞との共培養により好中球細胞外トラップの形成は促進され、migration assay では好中球細胞外トラップ誘導下で肝転移巣の癌関連線維芽細胞の由来である肝星細胞の遊走能が亢進した。また、この現象は好中球細胞外トラップの阻害剤である apocynin の投与により抑制された。これらのことから好中球細胞外トラップが肝転移巣での癌関連線維芽細胞の誘導を促進することで肝転移形成を促進している可能性が示唆された。



#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Koikawa K, Ohuchida K, Takesue S, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Endo S, Abe T, Okumura T, Horioka H, Sada M, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohuchida R, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Pancreatic stellate cells reorganize matrix components and lead pancreatic cancer invasion via the function of Endo180, *Cancer Letters*, 1(412), 143-154, 2018, 査読有, DOI: 10.1016/j.canlet.2017.10.010

Abe T, Ohuchida K, Koikawa K, Endo S, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Cancer-associated peritoneal mesothelial cells lead the formation of pancreatic cancer peritoneal dissemination, *Int J Oncol*, 50(2), 457-467, 2017, 査読有, DOI:10.3892/ijo.2016.3829

〔学会発表〕(計 3件)

Takesue S, Ohuchida K, Nakayama H, Koikawa K, Shindo K, Nakata K, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nakamura M, Role of neutrophil extracellular traps(NETs) in pancreatic cancer liver metastasis, Pancreas2018, 2018年

Zilong Yan, 大内田研宙、奥村隆志、遠藤翔、阿部俊也、肥川和寛、武居晋、中山宏道、安藤陽平、岐部晋、仲田興平、宮坂義浩、森山大樹、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史、膵癌における肝・肺転移形成機序の相違に関する検討、第72回日本消化器外科学会総会、2017年

武居晋、大内田研宙、安藤陽平、岐部晋、中山宏道、阿部俊也、肥川和寛、遠藤翔、巖子龍、奥村隆志、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史、マウスモデルを用いた膵癌微小転移形成機序の解析、第117回日本外科学会定期学術集会、2017年

〔図書〕(計 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：藤田 逸人

ローマ字氏名：FUJITA, hayato

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁)：40611281

研究分担者氏名：大内田 研宙

ローマ字氏名：OHUCHIDA, kenoki

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：20452708

(2018年)

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。