

令和元年6月3日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16566

研究課題名(和文) 遺伝子改変膵癌モデルマウスを使用した肝微小転移巣形成促進性ニッチ因子の解明

研究課題名(英文) To elucidate niche factors promoting micro liver metastasis of pancreatic cancer using genetically engineered model mice.

研究代表者

佐田 政史 (SADA, Masafumi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10783508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：KPCマウス及び脾注肝転移モデルを用いた研究により、肝転移部の癌細胞周囲に癌関連繊維芽細胞(CAF)が集簇しており、CAFが転移形成促進的な微小環境を形成していることが示唆された。更にCAFに先立って好中球が集簇していることに着目し、好中球のNeutrophil extracellular traps (NETs)と呼ばれる機構が肝転移形成に促進的に働くことを見出した。また、癌細胞のCD110発現が亢進しているものでは有意に肝転移が増加していた。これらの結果から、膵癌の微小肝転移形成に促進的に働く因子として、宿主側ではCAFと好中球が、癌側ではCD110の発現が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形癌の多くは、進行すると遠隔臓器への転移をきたして致命的となることが多い。中でも膵癌は5年生存率が10%に満たず、その治療成績改善は急務である。膵癌の進行過程において、肝転移をはじめとした遠隔転移の形成は非常に重要な局面であり、転移形成を制御することができれば、予後改善のための大きな一歩となり得る。本研究では膵癌の肝転移におけるごく初期段階に関する詳細な検討を行い、宿主側と癌側での新たな促進因子を見出すことができた。これらの結果は、今後の膵癌の治療成績向上に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Present study using pancreatic cancer spontaneous mice (KPC mice) and a splenic instilled liver metastasis model revealed that cancer-associated fibroblasts (CAF) are concentrated around cancer cells in the liver metastasis. It was suggested that CAFs construct micro environment which promoting liver metastasis formation. Furthermore, we focused on the concentration of neutrophils prior to CAFs and found that a mechanism called neutrophil extra-traps (NETs) work to promote liver metastasis formation.

In addition, liver metastasis was significantly increased when CD110 expression in cancer cells was high level, and it was shown that CD110 expression may be involved in liver metastasis formation of pancreatic cancer.

From these results, it is suggested that CAFs and neutrophils are involved on the host side and CD110 expression on the cancer side as factors that promote the formation of micro liver metastases of pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 微小環境 微小転移 癌関連繊維芽細胞 好中球 NETs CD110

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

最難治癌である膵癌は、高い転移能を有していることから唯一の根治療法である手術可能症例が少ない。そのため、転移を促進する癌細胞の遺伝子変異や遺伝子発現プロファイルを明らかにすることや、遠隔転移の詳細な形成機序を明らかにすることは、膵癌の予後改善のためには必須の検討課題である。

膵癌の進展過程が、癌細胞自身の特性だけによるものなのか、原発巣や転移先の局所微小環境因子の個性も関与しているのかは、明らかではない。膵癌原発巣と転移巣のヒト組織サンプルを用いた解析では、転移を形成する癌細胞は、すでに原発巣で進化を遂げた一部の subclone に起因することが報告されており(Nature 2010, Yachida et al.)、ゲノムレベルでは原発巣と転移巣の癌細胞には大きな違いはないとの報告もある。また、血中を循環する癌細胞の機能的側面からみても、循環腫瘍細胞の中で実際に転移を成立させることができるのは、ごく僅かな細胞であり、原発巣局所で浸潤能力が高い細胞が等しく遠隔転移形成能を有しているとは考えにくい。一方、膵癌原発巣の特徴的病理学的性質として過剰な間質線維の増生である desmoplasia がある。Desmoplasia の形成主体である筋線維芽細胞様の形質を示す活性型膵星細胞は、癌間質相互作用によって癌細胞の浸潤・転移や治療抵抗性に大きな影響を与えていることが明らかにされている。

近年の網羅的な遺伝子変異解析や遺伝子発現解析技術の進歩にも関わらず、転移を促進させる特異的遺伝子の同定と実臨床への応用は実現されていない原因のひとつに腫瘍内 heterogeneity を勘案せずに、腫瘍全体を一塊として解析していることが考えられる。当研究室では、一部の癌細胞集団が間質細胞とのより強い相互作用によって浸潤能を亢進させる知見を見出しており(Cancer 2010, Moriyama et al.)、転移成立の際にも転移先微小環境との相互作用をより強く受ける癌細胞集団が存在すると考えている。そこで、癌細胞と転移先微小環境との相互作用を含めた時空間的变化を加味した解析のため、循環腫瘍細胞と転移初期段階である微小転移巣癌細胞の解析、そして転移先局所微小環境(ニッチ)を含めた実際の生体環境に近いプラットフォームでの統合的解析による膵癌転移機序の解明とその制御による転移抑制法の開発を着想した。

### 2. 研究の目的

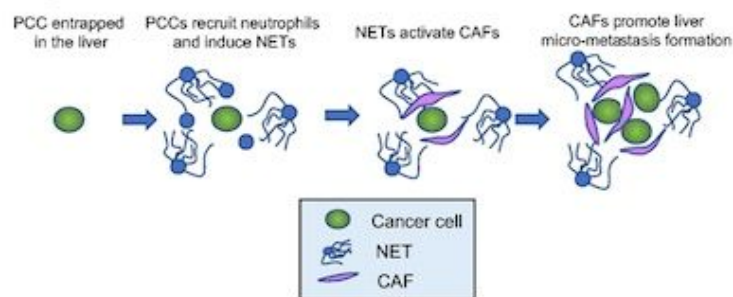
膵癌の遠隔転移で最も頻度の高い肝転移を対象として、従来の実験系で困難であった、微小転移巣の解析、また腫瘍内 heterogeneity や転移先の微小環境を考慮した解析を可能とする新たな実験系を構築する。また、転移成立過程において循環腫瘍細胞のごく一部の癌細胞集団が転移先の微小環境因子との相互作用によって癌の転移成立を支持、促進することを明らかにし、最終的には転移先での癌間質相互作用を標的とすることで転移成立抑制を可能とする治療法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

癌細胞が特異的に発光するよう luciferase を導入した遺伝子改変膵癌モデルマウス(KPCLマウス)を用いて、膵癌の遠隔転移で最も多い肝転移をターゲットとして、KPCLマウスの微小肝転移巣と門脈循環腫瘍細胞の網羅的発現解析を行い、微小転移を形成する特定の癌細胞集団の特性を明らかにする。また、微小転移巣には膵癌原発巣と同様に細胞外基質の沈着という特徴的な病理組織学的所見を認めることから、間質成分を解析して細胞外基質形成責任細胞と転移形成癌細胞の相互作用を検討し、転移先での癌間質相互作用によって微小転移巣形成を促進する分子メカニズムを同定する。

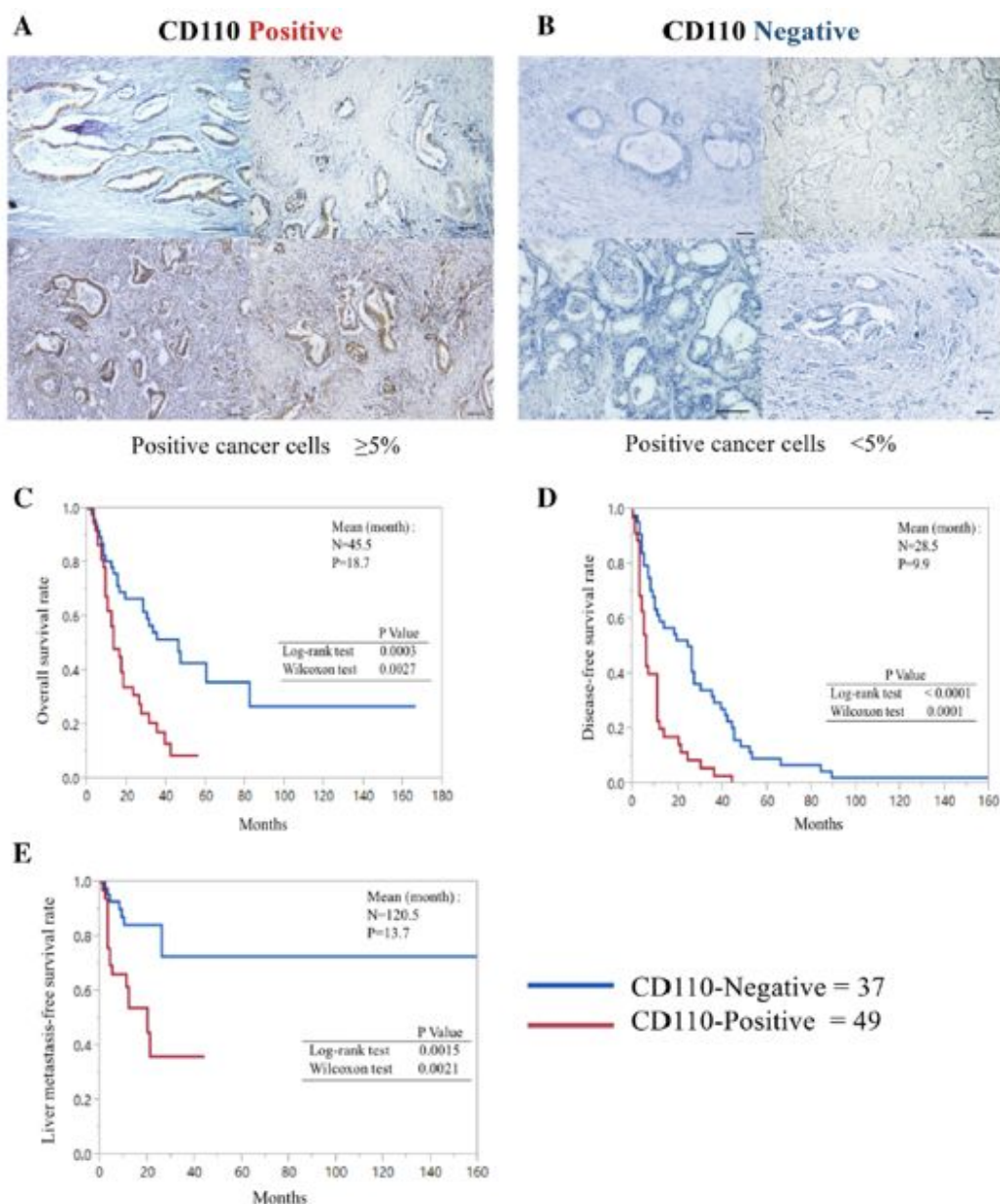
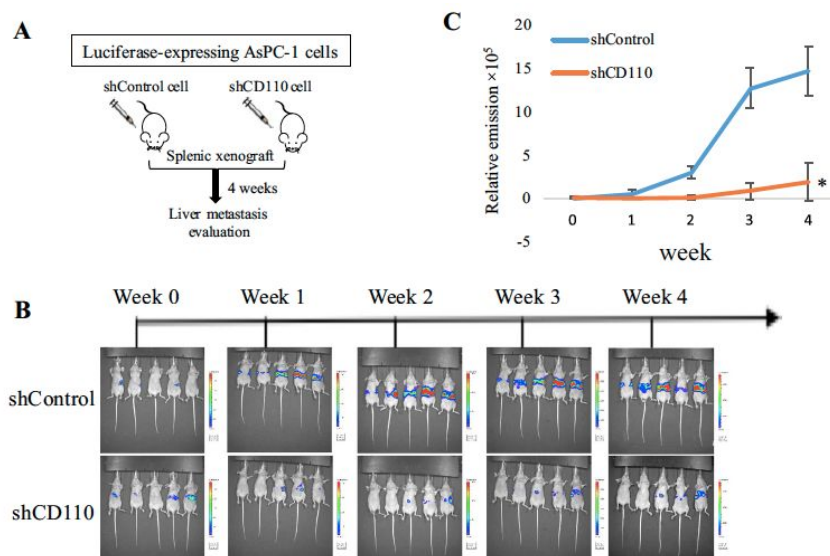
### 4. 研究成果

(1) 膵癌自然発生マウス(KPCマウス)および脾注肝転移モデルを用いた研究により、肝転移部の癌細胞周囲に癌関連繊維芽細胞(CAF)が集簇しており、CAFが転移形成促進的な微小環境を形成していることが示唆された。さらに肝転移マウスモデルを経時的に解剖して微小肝転



移巣の形成過程について観察したところ、CAFに先立って好中球が集簇していることを発見した。好中球には、近年発見された核内のクロマチンを放出して微生物などを捕捉する Neutrophil extracellular traps (NETs) と呼ばれる機構があり、敗血症や癌を含む様々な分野で注目されている。この機構が肝転移形成に関わっているのではないかと考え、NETs 阻害剤である DNase をマウスの腹腔内に投与すると、肝転移形成および CAFs の活性化が抑制されていることが確認でき、NETs が CAFs の活性化を介して膵癌の肝転移形成を促進していることが示唆された(右上図)。これらの結果を原著論文として投稿中である。

(2) 膵癌を除いた複数の癌種で CD110 の発現が肝転移形成において促進的に働くという報告があることから、膵癌の肝転移モデルにおいて CD110 の発現を免疫組織学的に解析した。その結果、膵癌細胞においても CD110 の発現が亢進しているものでは有意に肝転移が増加し、さらに CD110 を欠失させると肝転移が有意に減少したことから、膵癌においても CD110 の発現が肝転移形成に大きく関わっていることが示唆された(右図)。



また、実際のヒト膵癌症例の切除標本においても CD110 の発現について免疫組織化学染色で解析したところ、癌組織での CD110 が高発現している症例においては、有意に肝転移が増加して

いた。CD110 の高発現は、無再発生存率および全生存率とも有意に相関しており、いずれにおいても CD110 高発現例で予後が不良であった(上図)。これらの結果から、癌細胞における CD110 の発現が膵癌における新たな肝転移および予後の予測因子となり得ることが示唆された。これらの結果を原著論文として発表した。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yan Z, Ohuchida K, Zheng B, Okumura T, Takesue S, Nakayama H, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, CD110 promotes pancreatic cancer progression and its expression is correlated with poor prognosis, *J Cancer Res Clin Oncol*, 145(5):1147-1164, 2019, 査読有、DOI: 10.1007/s00432-019-02860-z

### 〔学会発表〕(計 6 件)

武居晋、大内田研宙、中山宏道、肥川和寛、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、中村雅史、膵癌肝転移での癌関連線維芽細胞局所誘導における好中球細胞外トラップ(NETs)の役割に関する検討、第 26 回日本消化器関連学会週間 JDDW2018KOBE、2018 年  
巖子龍、大内田研宙、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、永井俊太郎、大塚隆生、中村雅史、CD110 の阻害は、マウスの膵癌肝転移を抑制する、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年  
武居晋、大内田研宙、中山宏道、肥川和寛、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、中村雅史、膵癌微小肝転移における癌関連線維芽細胞の誘導と好中球細胞外トラップ(NETs)、第 73 回日本消化器外科学会総会、2018 年

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, *Pancreas*2018, 2018 年

武居晋、大内田研宙、相良亜希子、米永晃子、関維雨、馮海旻、安藤陽平、岐部晋、木庭遼、中山宏道、肥川和寛、巖子龍、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、永井俊太郎、大塚隆生、中村雅史、膵癌肝転移における好中球細胞外トラップ(NETs)の役割、第 118 回日本外科学会定期学術集会、2018 年

Yan Z, Ohuchida K, Zheng B, Okumura T, Koikawa K, Takesue S, Nakayama N, Shirahane K, Shimizu Y, Moriyama T, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, CD110 is Associated with Pancreatic Cancer Patient Survival and Promotes cancer Progression, Especially Liver Metastasis, The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association, 2017 年

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

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。