

令和元年5月30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：17K16567

研究課題名(和文)肝内微小環境による膵癌細胞のセレクション機構解明と微小環境ストレスの制御

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms that hepatic microenvironment sort out pancreatic cancer cells, and management the stress in microenvironment.

研究代表者

堀岡 宏平 (HORIOKA, Kohei)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10783699

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)：膵癌の肝転移成立において、癌微小環境内に誘導される好中球が癌細胞、特に肝組織におけるセレクション機構によってトラップされた癌細胞と相互作用することによって好中球細胞外トラップ(NETs)がおり、肝星細胞を活性化して癌細胞が定着する足場を形成し、肝転移が成立していくといったひとつのメカニズムについて明らかにすることができた。また、NETs阻害薬による膵癌の肝転移抑制効果についても可能性を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって膵癌の主要な転移先臓器である肝臓での転移成立に、微小環境内の好中球が細胞外トラップといった機構を介して、促進的に働いている可能性を明らかにし、その制御によって膵癌の肝転移を抑制できる可能性を示した。高頻度かつ早期から肝転移を起こす膵癌において、肝転移の制御が可能となればその悲惨な予後は大きく改善する可能性がある。本研究は従来の癌細胞を標的とした治療開発とは異なった新たな視点からの治療戦略を構築する一助となりうる。

研究成果の概要(英文)：NETs are extracellular DNA meshworks released from neutrophils together with proteolytic enzymes against foreign pathogens. Emerging studies suggest their contribution to liver metastasis in several types of cancer.

In this study, we showed DNase I, a NET inhibitor, suppressed liver metastasis and micrometastasis on spontaneous pancreatic cancer mouse models and liver metastasis mouse model that was generated by intrasplenic tumor injection. We found DNase also suppressed the recruitment of activated CAFs, which play a pivotal role in the tumor-supportive microenvironment in the micrometastatic foci. In vitro experiments showed that pancreatic cancer cells induced NET formation and consequently NETs enhanced the migration of hepatic stellate cells, which was the possible origin of CAFs in the liver metastasis. These results suggest that NETs is one of the candidate therapeutic targets to inhibit liver metastasis enhanced via CAF activation in pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：pancreatic cancer liver metastasis CAFs NETs DNase hepatic stellate cells

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

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は我が国における癌死の第4位であり、現在100人中5人しか治癒しない難治性疾患である。早期に局所浸潤や遠隔転移をきたすため、診断時には切除不能である症例が多く、その予後は不良である。そのため、膵癌の治療法・診断法の開発は、社会的要請度・緊急性が高い。

膵癌は高頻度に肝臓への転移をきたす。手術で切除可能であった症例であっても、その半数が肝転移で再発する。そのため、膵癌の肝転移を制御することが可能となれば膵癌の予後は大きく向上し得る。癌の転移は、原発巣から癌細胞が遊離し周囲組織へ浸潤し血管内へ侵入、循環癌細胞となり体内を循環、遠隔臓器へ到達し、血管外へ遊走、遠隔臓器で定着(コロナイゼーション)し再増殖する、という過程を経て転移巣が形成されて成立する(Kang, Cancer Cell, 2013, )。大半の癌患者の血液中から循環癌細胞は検出されるが、循環癌細胞の存在は必ずしも遠隔転移の成立を意味しない。したがって、遠隔臓器へ到達した癌細胞の多くはその組織に生着できずに淘汰されている。ごくわずかな生き残った癌細胞のみが休眠状態を経て再活性化・増殖し、転移巣を形成する(Kienast, Nat med, 2010) (Ghajar, Nat Cell Biol, 2013)。この遠隔転移における癌細胞の定着・増殖のメカニズムをめぐっては、癌幹細胞(Abel, Gastroenterology, 2013)や間葉上皮転換(Ocana, Cancer Cell, 2012)など癌細胞の側からの要因と、遠隔臓器における微小環境(転移ニッチ)側の要因(Wang Cell Stem Cell, 2012)という主に2つの観点から研究がなされてきたが、未だ詳細は明らかになっていない。転移先臓器の微小血管に到達した90%の循環癌細胞が淘汰されると言われているが、その原因として血管から受ける機械的な圧力が注目されている。つまり、毛細管のようなコンプライアンスが低く伸展が制限される環境に細胞が捕捉される(Chambers, Nat Rev Cancer, 2002)と、血管内腔の形状に依存して細胞は変形し、その結果細胞死へとつながる(Wong, Cancer Res, 2001)。さらに、転移先臓器の微小血管内に捕捉された循環癌細胞が血管内皮細胞の能動的な動きによって血管外へと誘導されるメカニズムを提唱している報告もある(Kanada, PeerJ, 2014)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌において肝転移が成立する際に作動する循環癌細胞の選択機構の解明と、肝内微小環境におけるセレクション機構を利用した肝転移制御、新規治療法の開発である。

### 3. 研究の方法

マウス肝転移モデルの作成、癌細胞捕捉状態、転移形成過程の観察

膵癌自然発生マウスモデル(KrasLSL-G12D, PDX1-Cre, and Trp53R172H; KPC マウス)から outgrowth 法で樹立した癌細胞にレンチウイルスを用いて GFP を導入し、GFP 発現膵癌細胞を脾注した肝転移、肺転移モデルを作成した。脾注後、経時的にマウスを解剖し、肝転移・肺転移巣について HE 染色、免疫染色などで病理組織学的に癌細胞、微小環境内の構成細胞を評価し、さらにそれぞれ転移先臓器から癌細胞を採取、培養した。

肝転移モデルマウスの好中球細胞外トラップ(NETs)形成評価、NETs 阻害薬投与

NETs 形成の際にヒストン H3 はシトルリン化することが知られている。肝転移モデルマウスのパラフィン包埋切片を用いた Cit-H3 抗体の免疫染色によって好中球のヒストン H3 のシトルリン化について評価し、さらに細胞外 DNA の放出については細胞膜非透過性核酸染色液の SYTOX Green を静脈注射後に解剖、摘出した肝組織を蛍光顕微鏡で直接観察、あるいは凍結切片を観察することによって評価した。NETs 阻害薬の DNase をルシフェラーゼ発現膵癌自然発生マウス(KrasLSL-G12D, PDX1-Cre, Trp53R172H, LuciferaseLSL; KPCL マウス)が腫瘍を形成した後の13週齢から連日腹腔内投与し、肝転移モデルについては癌細胞の脾注直前から投与を開始した。原発巣、転移巣の腫瘍形成について IVIS によるルシフェラーゼ発光値、組織切片の GFP 発現などを観察して評価した。

In Vitro における NETs の誘導、CAFs 誘導実験

C57BL/6 マウスの大腿骨、および脛骨から濃度勾配遠心法や磁気ビーズを用いて好中球を分離採取し、採取した好中球の純度について Ly6G, CD11b 抗体を用いてフローサイトメトリーで評価した。分離採取した好中球を、24 ウェルのトランスウェルチャンバー内で KPC マウスから樹立した膵癌細胞(原発巣、または転移巣由来)と間接共培養し、24 時間後に固定して好中球を Cit-H3 抗体で免疫染色し、NETs の形成について評価した。また NETs による線維芽細胞の運動能変化を評価するため、肝星細胞をトランスウェルアッセイにて、下段に癌細胞、好中球、あるいはその両方を播種し、上段に肝星細胞を播種して 24 時間後の肝星細胞の遊走・浸潤を評価した。肝星細胞の培養液に apocynin を添加することによって、NETs を抑制し、その変化について評価した。

### 4. 研究成果

マウス肝転移・肺転移モデルの作成と転移先臓器における癌細胞捕捉状態の経時的観察

In Vivo において C57BL/6 マウスに GFP を導入した膵癌自然発生マウスモデル由来の膵癌細胞を脾注して肝転移・肺転移モデルを作成し、癌細胞のトラップから微小転移の形成まで時間

ごとに解剖して経時的变化を観察した。肝微小転移巣では肺に比べて有意に  $\alpha$ -SMA 陽性癌関連線維芽細胞が多く誘導されていたが、癌関連線維芽細胞 (CAFs) に先立って Lys6G 陽性の好中球が集簇していることも確認された。その後 CAFs が存在する部分にのみ癌細胞が増殖し、転移形成が見られるようになった(図 1)。また、ヒト膀胱癌組織の免疫染色でも周辺組織に比べて腫瘍部において好中球が有意に集簇している像を確認した。

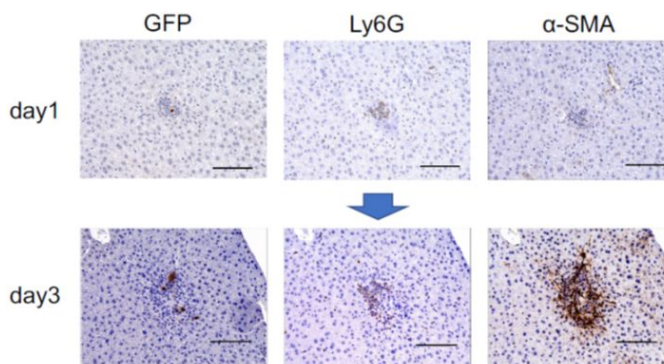


図 1. 癌細胞脾注後 1,3 日目の免疫組織化学染色

### 肝転移形成における好中球細胞外トラップ(NETs)の関与

好中球には微生物を傷害する際に DNA やタンパク分解酵素、ヒストン等からなる網状の構造物、好中球細胞外トラップ (NETs) を放出する現象があり (Brinkmann V. Science. 2004)、近年その NETs が癌の進展を促進することが報告されている (Park J. Sci Transl Med. 2016) (Tohme S. Cancer Res. 2016)。NETs の放出は、肺線維化を促進することも知られており、今回確認した微小肝転移巣における好中球の集簇に引き続く CAFs の増殖、転移形成にも何らかの役割を果たしている可能性があると考えた。NETs の実行を確認するため、KPCL マウスから採取した癌細胞を脾注した肝転移モデルマウスの膀胱癌組織において、NETs に伴って生じるシトルリン化ヒストン (Cit-H3) の発現を免疫組織化学染色で評価したところ、肝転移巣において Cit-H3 陽性細胞の浸潤を認めた(図 2)。さらに NETs によって放出される DNA の網を可視化するため、細胞膜非透過性核酸染色液を静注後に癌細胞を脾注し、解剖して肝組織を観察したところ、不均一に分布した細胞外 DNA が観察された(図 3)。

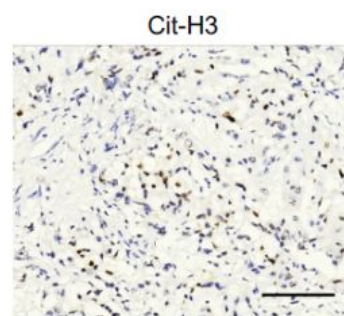


図 2. 肝転移巣の Cit-H3 免疫染色

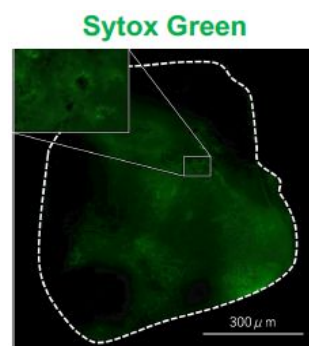


図 3. 肝転移巣の細胞外 DNA

次に、膀胱癌の肝転移形成における NETs の役割を調べるため、KPCL マウス、および肝転移モデルマウスに NETs 阻害薬である DNase を腹腔内投与した。個体のルシフェラーゼの発光値で腫瘍形成能について評価すると、DNase 投与群ではコントロール群と比べて発光値に差は見られなかったものの、肝組織について評価すると、DNase 投与群で有意にルシフェラーゼ発光が低下しており、肝転移の抑制効果が観察された(図 4)。病理組織学的評価においても、DNase 投与群ではコントロール群に比べて GFP 陽性癌細胞の数が有意に減少しており、肝転移形成能の低下が裏付けられた。さらに微小環境内の間質細胞についても病理組織学的に評価を行ったところ、 $\alpha$ -SMA 陽性の癌関連線維芽細胞が減少しており、 $\alpha$ -SMA/GFP の面積比、 $\alpha$ -SMA 陽性病変の割合、いずれもコントロール群に比べて有意な低下が見られ、NETs の阻害による CAFs の抑制、転移形成の抑制効果が確認された。

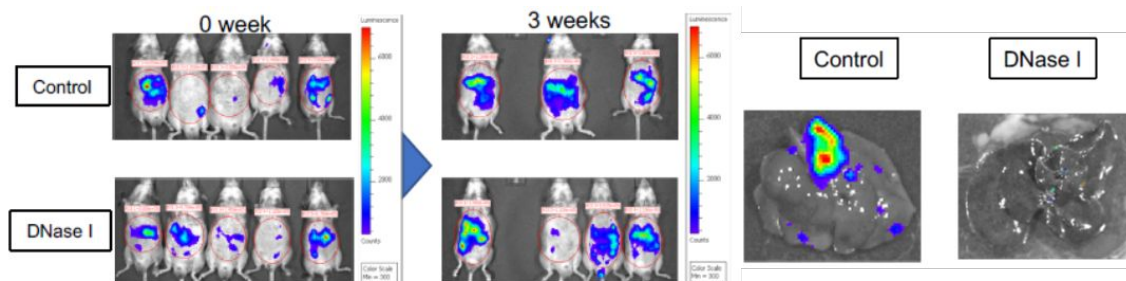


図 4. ルシフェラーゼ発光値による DNase 投与と腫瘍形成能(左)、肝転移形成能(右)の影響評価

### 癌細胞による NETs 誘導と CAFs の活性化

In vitro の実験において、癌細胞が NETs の実行に及ぼす影響を調べるため、C57BL/6 マウスから好中球を分離採取し、NETs 誘導薬の phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) で処理した後に固定、Cit-H3 の発現について蛍光免疫染色で確認し、採取した好中球に NETs の誘導が可能であることを確認した。(図 5)膀胱癌組織内での NETs 誘導メカニズムについて検討するため、採取した好中球を膀胱癌自然発生マウスから樹立した癌細胞とトランスウェルチャ

ンバー内で間接共培養した。すると、24 時間の間接共培養によって好中球の NETs 形成が促進されたが、原発巣由来の癌細胞と肝転移あるいは肺転移巣由来の癌細胞による NETs 形成促進効果を比較してみると、おもしろいことに転移巣由来の癌細胞において、NETs 促進効果が高い傾向が見られた。つづいて NETs が CAFs の活性化に与える影響について評価するため、肝転移巣における CAFs の由来細胞とされている肝星細胞を、好中球、癌細胞と間接共培養し、その形質変化について観察した。肝星細胞を癌細胞、あるいは好中球とそれぞれ共培養しても肝星細胞の遊走能に影響はなかったが、癌細胞、好中球の同時存在下に共培養すると有意に肝星細胞の遊走能が増加し、さらに NETs 阻害薬の apocynin を添加して共培養すると肝星細胞の遊走能促進効果は打ち消された。つまり、癌細胞と好中球の相互作用によって引き起こされる NETs が肝星細胞の遊走能促進効果を有している可能性が示唆された。

以上から、膵癌の肝転移成立において、癌微小環境内に誘導される好中球が癌細胞、特に肝組織におけるセレクション機構によってトラップされた癌細胞と相互作用することによって NETs が起こり、肝星細胞の活性化から癌細胞が定着する足場を形成し、肝転移が成立していくといったひとつのメカニズムについて明らかにすることができた。また、NETs 阻害薬による膵癌の肝転移抑制効果についても可能性を見出すことができた(図 6)。

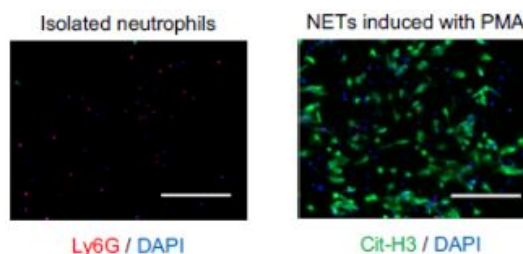


図 5. 好中球への PMA 投与による NETs 誘導

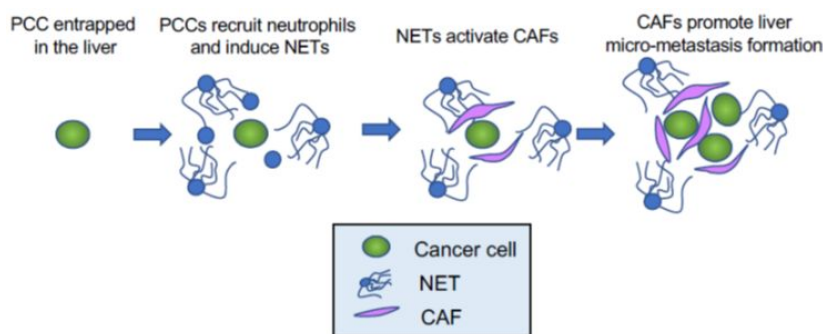


図 6. 癌細胞の捕捉から好中球、NETs、CAFs の誘導を介した肝転移形成メカニズム

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 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 2018、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

肥川和寛、大内田研宙、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史、肝星細胞が誘導する新たな膵癌局所微小浸潤機序の解明、第 25 回日本消化器関連学会週間 第 15 回日本消化器外科学会大会、2017 年

〔図書〕(計 0 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：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。