

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08685

研究課題名(和文)好中球細胞外トラップが誘導する膵癌転移形成促進性微小環境の解析

研究課題名(英文) Analysis of pancreatic cancer metastasis-promoting microenvironment induced by neutrophil extracellular traps

研究代表者

永井 英司 (NAGAI, Eishi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30264021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌自然発生モデルのKPCLマウスにおいて膵癌内で好中球細胞外トラップ(NETs)が誘導されていること、微小肝転移巣において癌関連線維芽細胞(CAFs)の誘導に先立ち好中球の集簇がみられること、NETs阻害剤を投与することで肝転移の形成が抑制され、CAFsの誘導が抑制されることを示した。また、in vitroにおいて好中球と膵癌細胞を間接共培養すると、膵臓癌細胞がNETs形成を誘発し、その結果NETsが肝転移におけるCAFsの起源である可能性のある肝星細胞の誘導を促進することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌では癌間質相互作用が腫瘍の転移・浸潤に大きな役割を果たしている。その一例として、NETsがCAFsを活性化し、転移促進的な微小環境を形成する可能性が示唆されている。これまでに乳癌や大腸癌においてNETsが肝転移を促進することが報告されているが、それらは癌細胞とNETsの直接の相互作用を検討したものであった。本研究ではNETsが癌細胞そのものではなく、癌間質相互作用に与える影響という新たな視点に立った研究である。また、早期に肝転移を起こす膵癌は極めて予後不良であり、膵癌の肝転移を制御する新規治療法は膵癌の予後を改善する可能性が高く、新たな視点で解決を試みた社会的意義の高い研究といえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that neutrophil extracellular traps (NETs) were induced in pancreatic cancer in KPCL mice (spontaneous cancer model), neutrophil aggregation was observed in microhepatic metastases prior to the induction of cancer-related fibroblasts (CAF), and administration of NETs inhibitors suppressed the formation of liver metastases and suppressed the induction of CAFs.

In addition, we have shown that pancreatic cancer cells induce NETs formation, which in turn promotes the induction of hepatic stellate cells under indirect co-culture of neutrophils and pancreatic cancer cells, which may be the origin of CAFs in liver metastases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 NETs 肝転移 CAFs HSC

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は極めて予後不良であり、ここ 30 年ほとんど生存率の改善がみられない取り残された癌である。膵癌の予後が不良な原因のひとつに膵癌が早期に肝転移を起こすにも関わらず、それに対する有効な治療法がないことが挙げられる。そのため、膵癌の肝転移を制御する新規治療法は膵癌の予後を改善する可能性が高く、その開発は社会的要請度・貢献度・緊急性が高い。

好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: 以下 NETs) は NETosis と呼ばれる好中球の細胞死に伴い好中球の細胞外に放出されるクロマチンの網状構造であり、好中球が微生物を殺傷する新たな機構として 2004 年に Brinkmann らによって報告された。近年 NETs は感染性の疾患のみならず、リウマチ、血管炎等の自己免疫性疾患や担癌患者の血栓症、さらには癌の進展等様々な病態に関与しているとする報告が相次いでいる。癌の進展に関しては乳癌や大腸癌において NETs が転移を促進することが報告されているが、その機序はほとんど解明されていない。一方で NETs による線維芽細胞の活性化が喫煙やプレオマイシン等による肺の線維化に促進的に作用することが報告されている (Chrysanthopoulou, J Pathol, 2014)。これらのことから、癌間質相互作用が重要な役割を果たす膵癌の転移形成においても NETs が癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts: 以下 CAFs) を活性化し、転移促進的な微小環境を形成する可能性が示唆された。

以上より我々は、膵癌肝転移において NETs が転移形成促進的な微小環境形成を促進するのではないかと考え研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は膵癌の主要な死因のひとつである肝転移を制御することで膵癌患者の予後を改善する新規治療を開発することである。NETs を抑制することにより肝転移を抑制することができるという報告は乳癌、大腸癌等でみられるが、その機序はほとんど明らかにされていない。今回我々は膵癌の進展に重要な役割を果たす癌間質相互作用と NETs の関係に着目した。これまでに NETs と癌間質相互作用の関係についての報告はなく、この点が本研究の最大の特徴であり独自性が高く、NETs を標的とした新たな治療法は、膵癌のみならず他癌腫の治療においても飛躍的な進歩をもたらす可能性があると考えられた。

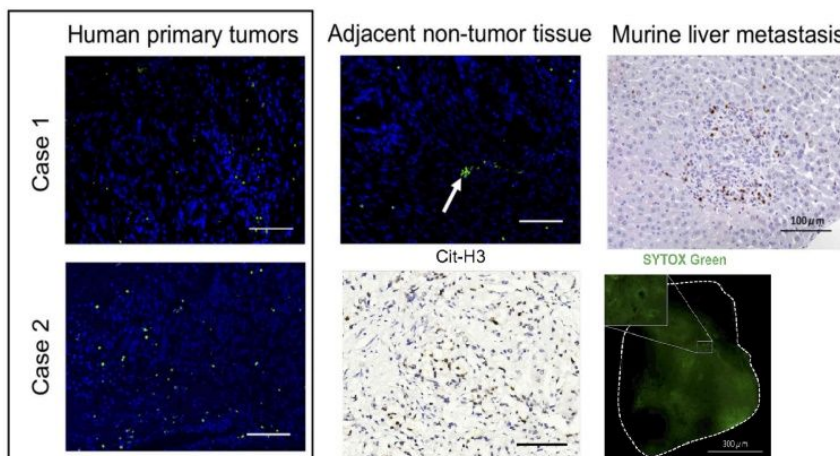
### 3. 研究の方法

まず、ヒト原発性膵癌及び自然膵癌発癌ルシフェラーゼ (KPCL) マウスの肝転移腫瘍における好中球の状態を観察し、膵癌やその転移巣における好中球の動員や NETs 形成状態の確認を試みた。さらに、NETs 阻害剤として知られている DNaseI が、KPCL マウスの自然発生 PDAC 腫瘍に及ぼす影響を調査した。引き続き、肝微小転移マウスモデルを作成し、微小転移の経時的な変化を解析した。さらに NETs 阻害剤投与を行って肝微小転移巣形成に対する NETs 阻害剤の効果を調査した。加えて、マウス好中球に、NETs 誘導剤、癌細胞 (原発腫瘍、転移腫瘍) それぞれがもたらす影響を確認した。さらに、転移巣における NETs の役割を検討すべく、好中球と癌細胞株、さらに肝星細胞を組み合わせて共培養し、肝星細胞の挙動を観察した。

### 4. 研究成果

#### 1. 腫瘍部位における好中球の観察

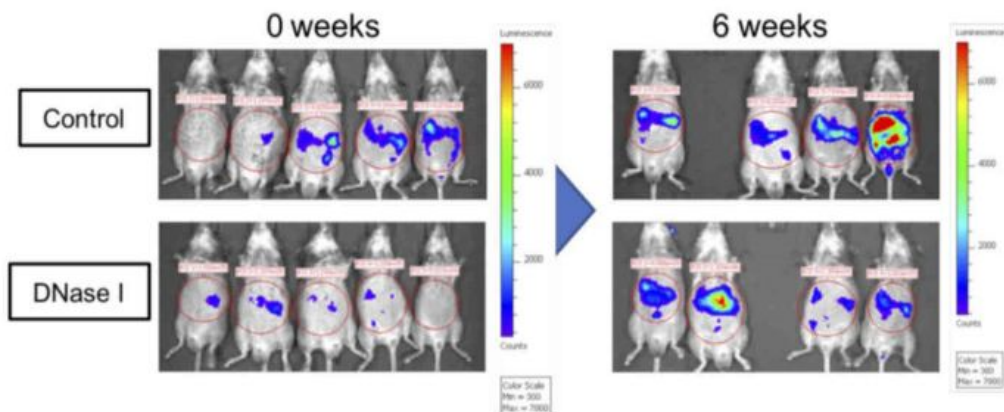
ヒト原発性 PDAC および KPCL マウス肝転移腫瘍から得られた標本を免疫染色分析した。両組織において Ly6G 陽性好中球密度は、隣接する非腫瘍組織よりも腫瘍部において高値であった。ヒストン H3 は、NETs 形成の過程でシトルリン化されることが知られているため、抗シトルリン化ヒストン H3 抗体 (Cit-H3) を用いた免疫染色を行ったところ、KPC マウス肝転移巣では Cit-H3 陽性細胞が浸潤しており、さらに、膜不透過性拡散染色剤である SYTOX Green を腫瘍採取前のマウスに投与し腫瘍を観察したところ、腫瘍断面の直接観察中に不均一に分布した細胞外 DNA が検出された。



## 2. NETs 阻害剤が KPCL マウスの自然発生 PDAC 腫瘍に及ぼす影響

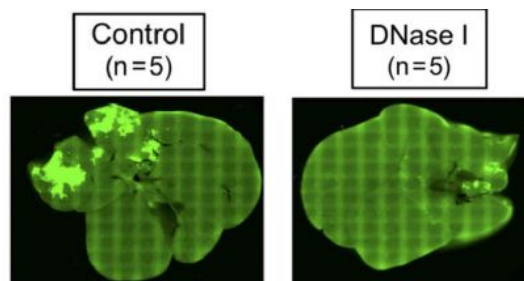
NETs 阻害剤；DNaseI が、KPCL マウスの自然発生 PDAC 腫瘍に及ぼす影響を調査した。肝転移形成の早期段階における変化の観察のため、連日の DNaseI 腹腔内投与の開始を週齢で変え比較したところ、早期に DNaseI 投与を開始したマウスにおいて肝転移を予防できることが判明した。一方、すでにある程度成長した腫瘍には NETs 阻害の治療効果は不十分であることが示唆された。

さらに癌細胞の脾臓内注射によって肝微小転移モデルを作成して観察したところ、転移巣における好中球の動員は、CAF の活性化に先行することが判明した。



## 3. 肝微小転移巣形成に対する NETs 阻害剤の効果の検討

肝微小転移モデルに対し連日 DNaseI 投与を行い DNaseI 処理マウスと対照マウスの転移性結節の数を評価したところ、対照群と比較して、DNase I 治療群の転移性結節の数と面積はともに有意に減少していた。



## 4. 癌細胞が NETs 形成にもたらす影響の検討

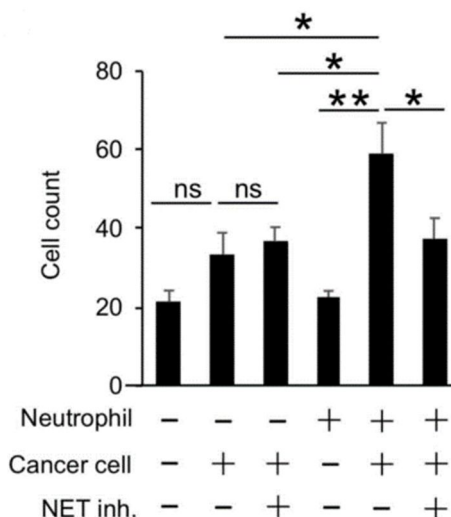
単離されたマウス好中球を、間接的共培養の PCC(マウス癌細胞株)または 24 時間の PCC の上清で処理したところ、原発腫瘍または転移性腫瘍に由来する PCC のすべての培養物は NETs を誘導した。特に、肝臓および肺転移に由来する PCC の培養物は、原発腫瘍に由来するものよりも強力に NETs を誘導した。

## 5. CAF 活性化に対する NETs の効果の解明

肝転移における CAF は常在性肝星細胞 (HSC) に由来することが示されており、NETs が HSC の移行に影響を与えるメカニズムを、Transwell 移行アッセイを用いて検討した。

HSC を PCC または好中球と間接共培養したところ、遊走 HSC 数は変化しなかった。一方、PCC と好中球の両方と共培養した場合、遊走 HSC 数は大幅に増加した。NETs 阻害剤；アポシニンを投与したところ、PCC と好中球両方と共培養した遊走 HSC 数は、PCC または好中球のみとの共培養で観察されたレベルまで減少した。

以上から我々は、NETs が CAF の活性化を介して PDAC の肝微小転移を促進することを示した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Feng Haimin, Moriyama Taiki, Ohuchida Kenoki, Sheng Nan, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Shirahane Kengo, Ikenaga Naoki, Nagai Shuntaro, Nakata Kohei, Mizumoto Kazuhiro, Nakamura Masafumi	4. 巻 40
2. 論文標題 N-acetyl cysteine induces quiescent-like pancreatic stellate cells from an active state and attenuates cancer-stroma interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-021-01939-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwamoto Chika, Ohuchida Kenoki, Shinkawa Tomohiko, Okuda Sho, Otsubo Yoshiki, Okumura Takashi, Sagara Akiko, Koikawa Kazuhiro, Ando Yohei, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Moriyama Taiki, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Eto Masatoshi, Akashi Koichi, Nakamura Masafumi	4. 巻 512
2. 論文標題 Bone marrow-derived macrophages converted into cancer-associated fibroblast-like cells promote pancreatic cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 15 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.04.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takesue S, Ohuchida K, Shinkawa T, Otsubo Y, Matsumoto S, Sagara A, Yonenaga A, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Toma H, Tominaga Y, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M	4. 巻 56
2. 論文標題 Neutrophil extracellular traps promote liver micrometastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma via the activation of cancer-associated fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 596 ~ 605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武居晋、大内田研宙、中山宏道、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
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ(NETs)が導く膵癌肝転移促進的微小環境に関する検討
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武居晋、大内田研宙、松本奏吉、新川智彦、大坪慶輝、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、齋子龍、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
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ(NET)が膵癌肝転移巣における癌関連線維芽細胞の誘導に与える影響の検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第26回日本消化器関連学会週間 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大内田 研宙  (OHUCHIDA Kenoki)  (20452708)	九州大学・大学病院・講師    (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮坂 義浩  (MIYASAKA Yoshihiro)  (40507795)	九州大学・医学研究院・共同研究員    (17102)	
研究分担者	藤田 逸人  (FUJITA Hayato)  (40611281)	九州大学・医学研究院・共同研究員    (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関