

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08705

研究課題名（和文）膵臓癌幹細胞の初期肝転移を決定するエクソソームの関与と転移阻害剤に関する基盤研究

研究課題名（英文）Pancreatic cancer derived exosomes promote early liver metastasis

研究代表者

堀 裕一（Hori, Yuichi）

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：80248004

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）：膵臓癌は癌死亡率の第4位にあり、遠隔転移が予後を左右する。最近、あらゆる細胞はエクソソームと呼ばれる微小な細胞外小胞を分泌して細胞間コミュニケーションを行なっていることが明らかになっており、癌細胞でも様々な報告がある。本研究では、我々が樹立作成した(1)ヒト膵臓癌幹細胞株や(2)癌遺伝子導入により作成したマウス人工膵臓癌幹細胞株由来のエクソソームにより肝臓でのpre-metastatic nicheを再構築できた。また、その転移機構を分子レベルで解明した。本研究成果は、エクソソームを標的とした治療薬の開発に繋がり、膵臓癌の予後改善に貢献できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術、抗がん剤、放射線治療の進歩にもかかわらず、膵臓癌の5年生存率は未だ10%以下で、固形癌の中で最も予後不良と言われる。今後も罹患数や死亡数は増加すると世界中で予測されており、肝臓や肺などへの転移や神経浸潤といった膵臓癌に特徴的な病態の解明やその対策が待たれる。本研究では、膵臓癌の転移機構を明らかにするため、膵臓癌が分泌するエクソソームと呼ばれる微小な小胞に着目して実験を行った。その結果、エクソソーム投与により、転移のプロセスが亢進することが判明した。この成果はエクソソームを標的とした治療薬の開発に繋がり、膵臓癌の予後改善に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer mortality in Japan, and distant metastasis is a major prognostic factor. Recently, it has been revealed that all cells secrete tiny extracellular vesicles called exosomes for intercellular communication, and various reports have been published on cancer cells. In this study, we were able to reconstruct pre-metastatic niche in the liver using exosomes derived from (1) a human pancreatic cancer stem cell line that we established and (2) a mouse artificial pancreatic cancer stem cell line generated by oncogene transfer to pancreatic-tissue specific stem cells. The metastatic mechanism such as epithelial-mesenchymal transition was also elucidated at the molecular level. The results of this research will lead to the development of therapeutic drugs targeting exosomes and contribute to the improvement of the prognosis of pancreatic cancer.

研究分野：膵臓外科学

キーワード：膵臓がん エクソソーム 遠隔転移 肝転移

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は癌死亡率の第4位にあり、早期診断が困難で最も予後不良の疾患であり、発見時には多くの症例ですでに遠隔転移や癌性腹膜炎を伴っている。外科的治療、化学療法、放射線療法による集学的治療の進歩にも関わらず死亡率や死亡数は増加傾向にあり、予後を左右する遠隔転移の病態解明や新しい治療法の開発が急務である。

遠隔転移成立に関しては多くのプロセスがあり、解明されたとは言えない。特に、癌の転移先の臓器親和性に関しては100年以上も明らかになっていなかった。ところが最近、癌細胞が分泌するエクソソーム(細胞外小胞)が臓器親和性を決定するという報告があり、転移研究のパラダイムシフトとなった。本研究では膵癌細胞が分泌するエクソソームが肝臓や肺で pre-metastatic niche を構築し、転移を促進するのかという「問い」を立ててその分子基盤を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に樹立作成した ヒト膵癌幹細胞株や マウス人工膵癌幹細胞株由来のエクソソームを投与して肝臓や肺での pre-metastatic niche を再構築し、転移機構を分子レベルで解明し、新規治療薬の開発を目的としている。我々は 既存の抗がん剤耐性の膵癌患者からヒト膵癌幹細胞株を樹立し^[1]、CD133陽性マウス膵組織幹細胞にK-Ras^{G12D}、変異型p53、CDK4、GFPを恒常的に発現させたマウス人工膵癌幹細胞の作成にも成功している^[2]。我々が樹立したヒト膵癌幹細胞株とマウス人工膵癌が分泌するエクソソームを分離し、遠隔転移の分子機構を解明する本研究は、きわめて特色があり独創的である。本実験が遂行されれば、膵臓癌の遠隔転移メカニズムを明らかにして、全く新しい転移阻害剤が開発され、膵癌の予後を改善でき、臨床医学に多大な貢献をすることが期待できる。

[1] Shimizu K, Chiba S, Hori Y. Identification of a novel subpopulation of tumor-initiating cells from gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *PLoS One* 21: e81283, 2013.

[2] Sasai K, Sukezane T, Yanagita E *et al.* Oncogene-mediated human lung epithelial cell transformation produces adenocarcinoma phenotype in vivo. *Cancer Res.* 71: 2541-2549, 2011.

3. 研究の方法

我々はすでに、マウス人工膵癌を移植して in vivo で GEM を長期に投与することによって、GEM耐性でかつ肝臓への高転移株を樹立することに成功している。

1) ヒト膵癌幹細胞株由来エクソソームによる pre-metastatic niche の解析

本研究では転移過程のうち膵癌細胞の extravasation に絞って解析する。当研究室で樹立したヒト膵癌幹細胞株の培養上清からエクソソームを分離し、免疫不全マウス(ヌードマウス)に経門脈的に注入し、数日後に経門脈的に膵癌細胞を注入し、一定の期間の後に、臓器を摘出して組織染色で転移巣を確認する。ヒト膵癌幹細胞株には GFP 遺伝子を導入しているため lineage-tracing 可能である。さらに、pre-metastatic niche に関わる細胞として、Kupffer 細胞、好中球、マクロファージ、星細胞、骨髄由来 myeloid-derived suppressor cell (MDSC) の関与を免疫染色で解析する。また、転移の初期には上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition;

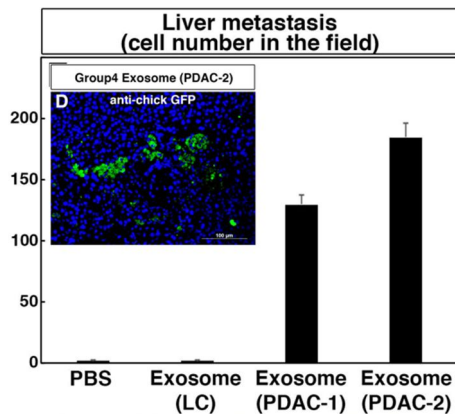
EMT)の関与が指摘されているのでエクソソームにおける EMT の誘導についても解析する。

2) マウス人工膵癌幹細胞株由来エクソソームによる pre-metastatic niche の解析

前述のようにマウス人工膵癌幹細胞株は野生型 BL6 マウスの CD133 陽性マウス膵組織幹細胞に遺伝子導入して作成した(Hori et al. *Stem Cells*, 2013)。免疫不全マウスでは niche 形成における免疫担当細胞の関与が解析できないため、マウス人工膵癌の親株と GEM 耐性/高転移株の培養上清からエクソソームを分離して、野生型 BL6 マウスを使って上記と同様の実験を行う。予備実験の結果、GEM 耐性/高転移株由来のエクソソームを投与したグループでコントロールや親株由来のエクソソームを投与したグループと比較して、肝臓への膵癌細胞の転移能を亢進することを明らかにしており、この実験の再現性を確認したのちにエクソソームの網羅的な比較解析により pre-metastatic niche 形成に重要な役割を持つ micro RNA や蛋白質候補を同定する。また、免疫担当細胞の関与を確認するために、T 細胞や B 細胞が欠損した BL6 由来の Rag2 ノックアウトマウスでも腫瘍形成能や微小環境に与える影響を検討する。

4 . 研究成果

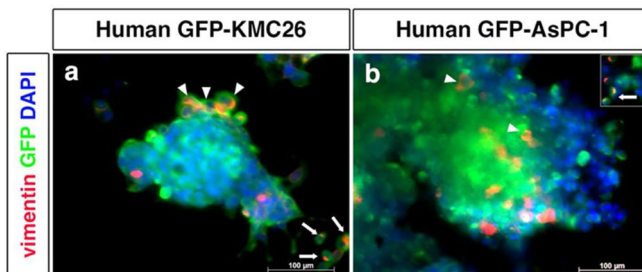
1) ヒト膵癌幹細胞株由来エクソソームによる pre-metastatic niche の解析



ヒト膵癌患者由来のエクソソームを前投与し、その後 GFP ラベルした癌細胞を注入した場合、左図(insert)のように肝転移巣を認めた。さらに、PDAC-1, PDAC-2 由来のエクソソームを投与した場合、胆汁性肝硬変患者(LC)の腹水由来のエクソソームをコントロールとして投与した場合と比較して、明らかに肝転移が亢進することが明らかになった。この転移メカニズムを明らかにするために、血管内皮細胞(HUVEC)を用いた透過性実験を行うと、LC 由来エクソソーム投与群に比べて、PDAC 由

来エクソソーム投与群では明らかな透過性亢進を認めたことから(data not shown)、膵癌細胞由来のエクソソームは血管内皮の細胞接着分子を傷害することにより癌細胞の転移を亢進する役割があることが示唆された。現在、論文投稿準備中である。

一方、ヒト膵癌細胞株である AsPC-1 と我々が樹立した KMC を in vitro で培養すると、コロニーから budding してくる細胞があり、免疫染色の結果、これらの細胞は vimentin 陽性の細胞であることが判明した(左図)、分泌するエクソソームが EMT を誘導することを明らかにした。この成果を論文としてまとめた

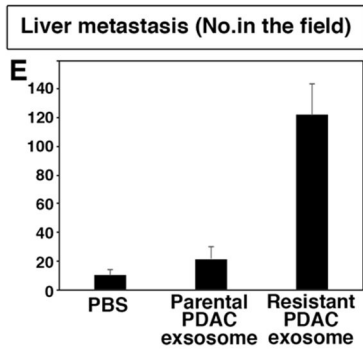


この成果を論文としてまとめた

(Nakayama et al. *Med Mol Morphol* in press)。

2) マウス人工膵癌幹細胞株由来エクソソームによる pre-metastatic niche の解析

作成したマウス人工膵癌の親株と GEM 耐性/高転移株の培養上清からエクソソームを分離して、上記と同様の実験を行った結果、GEM 耐性/高転移株由来のエクソソームを投与したグループで親株由来のエクソソームを投与したグループと比較して、肝転移が亢進することを明らかにし



た(左図)。

さらに、親株と耐性株細胞の遺伝子発現をマイクロアレイで比較して、転移に関わる候補遺伝子を抽出したところ、pre-metastatic niche 形成に重要な役割を持つ分子の同定にも成功した(論文投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyoshi M, Shiroto A, Kadoguchi H, Usami M, Hori Y	4. 巻 66
2. 論文標題 Prebiotics improved the defecation status via changes and short-chain fatty acids in hemodialysis patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 E12-EE21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Machinaga Akihito, Hori Yuichi, Shimizu Kazuya, Okahara Kyohei, Yanagita Emmy, Miyoshi Makoto, Itoh Tomoo, Sasai Ken	4. 巻 48
2. 論文標題 Xenografts Derived From Patients? Ascites Recapitulate the Gemcitabine Resistance Observed in Pancreatic Cancer Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001438	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 Miyoshi M, Kadoguchi H, Usami M, Hori Y	4. 巻 67
2. 論文標題 Synbiotics improved stool form via changes in the microbiota and short-chain fatty acids in hemodialysis patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 E112-E118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nakayama F, Miyoshi M, Kimoto A, Kawano A, Miyashita K, Kamoshida S, Shimizu K, Hori Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Pancreatic cancer cell-derived exosomes induce epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells themselves partially via transforming growth factor 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-022-00321-0.	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 -

[学会発表] 計23件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 後藤百香、清水一也、三好真琴、寺田夢、脇田美音、大下彩、高嶋宏滋、宮下久美子、渡邊ありさ、中山郁也、河野朱莉、前谷織江、堀裕一
2. 発表標題 膵臓がん細胞由来エクソソームは血管内皮細胞を傷害して遠隔転移を亢進する
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前谷織江、清水一也、三好真琴、寺田夢、脇田美音、大下彩、高嶋宏滋、宮下久美子、渡邊ありさ、後藤百香、中山郁也、河野朱莉、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵臓がんorthotopic allograft implantationマウスモデルの開発
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akari Kawano, Kazuya Shimizu, Makoto Miyoshi, Kumiko Miyashita, Yume Terada, Mion Wakita, Aya Oshimo, Hiroshi Takashima, Yuichi Hori
2. 発表標題 Exosomes from pancreatic cancer cells promote distant metastasis due to injured vascular endothelial cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山郁也、清水一也、三好真琴、寺田夢、脇田美音、大下彩、高嶋宏滋、宮下久美子、渡邊ありさ、後藤百香、河野朱莉、前谷織江、味木徹夫、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵臓がん細胞のorthotopic allograft implantationマウスモデルの開発
3. 学会等名 JDDW2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤百香、三好真琴、清水一也、宮下久美子、前谷織江、堀裕一
2. 発表標題 膵臓がん細胞由来エクソソームは血管内皮細胞を傷害して遠隔転移を亢進する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前谷織江、三好真琴、清水一也、宮下久美子、後藤百香、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵臓がん同所性移植片移植マウスモデルの開発
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kumiko Miyashita, Makoto Miyoshi, Kazuya Shimizu, Ken Sasai, Tsuyoshi Akagi, Yuichi Hori
2. 発表標題 Monoamine oxidase B inhibitor has anti-proliferative effect on Gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀裕一、清水一也、三好真琴、寺田夢、脇田美音、大下彩、高嶋宏滋、宮下久美子、後藤百香、中山郁也、河野朱莉、前谷織江、渡邊ありさ、味木徹夫
2. 発表標題 膵臓がん細胞由来エクソソームは血管内皮細胞を傷害して遠隔転移を亢進する
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊ありさ、清水一也、三好真琴、寺田夢、脇田美音、大下彩、高嶋宏滋、宮下久美子、後藤百香、中山郁也、河野朱莉、前谷織江、味木徹夫、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵臓がんorthotopic allograft implantationマウスモデルの開発
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高嶋宏滋、清水一也、鶴田大生、梅本陵平、寺田夢、脇田美音、大下彩、三好真琴、味木徹夫、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは肝転移を亢進する
3. 学会等名 第50回日本膵臓学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺田夢、清水一也、鶴田大生、梅本陵平、脇田美音、大下彩、高嶋宏滋、宮下久美子、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは遠隔転移を亢進する
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大下彩、清水一也、鶴田大生、梅本陵平、寺田夢、高嶋宏滋、脇田美音、宮下久美子、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは肝転移を亢進する
3. 学会等名 第27回JDDW
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 脇田美音、清水一也、鶴田大生、梅本陵平、寺田夢、大下彩、高嶋宏滋、宮下久美子、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは肝転移を亢進する
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅本陵平、清水一也、鶴田大生、大下彩、高嶋宏滋、寺田夢、脇田美音、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 抗がん剤耐性の膵臓癌に対する脂質メディエーターの効果
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴田大生、清水一也、梅本陵平、大下彩、寺田夢、高嶋宏滋、脇田美音、宮下久美子、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは遠隔転移を亢進する
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴田大生、清水一也、梅本陵平、角井祐介、竹垣普恵、西村綾乃、三好真琴、赤城剛、笹井研、堀裕一
2. 発表標題 抗がん剤Gemcitabine耐性マウス膵癌細胞の樹立とその解析
3. 学会等名 第49回日本膵臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅本陵平、清水一也、鶴田大生、角井祐介、竹垣普惠、西村綾乃、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 抗がん剤Gemcitabine耐性マウス膵癌細胞の樹立とその解析
3. 学会等名 第50回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihito Machinaga, Yuichi Hori, Kazuya Shimizu, Kyohei Okahara, Makoto miyoshi, Tomoo Itho, Ken Sasai
2. 発表標題 Ascites-derived PDX models effectively recapitulate the gemcitabine-resistance observed in pancreatic cancer patients.
3. 学会等名 AACR special conference on Pancreatic Cancer: Advances in Science and Clinical Care (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大永智貴、渡邊ありさ、三好真琴、宮下久美子、後藤百香、中山郁也、河野朱莉、前谷織江、木本愛、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌患者由来腫瘍片の同所性異種移植は遠隔転移とがん関連凝固異常を再現できる
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木本愛、中山郁也、三好真琴、宮下久美子、後藤百香、河野朱莉、前谷織江、渡邊ありさ、大永智貴、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 膵臓がん細胞由来のエクソソームは自身の上皮間葉転換を誘発する
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyashita K, Miyoshi M, Shimizu K, Kawano A, Hori Y
2. 発表標題 Patient-derived orthotopic pancreatic cancer tissue xenografts recapitulate remote metastasis and cancer-associated hypercoagulation
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyashita K, Miyoshi M, Kimoto A, Ohnaga T, Shimizu K, Hori Y
2. 発表標題 Patient-derived orthotopic pancreatic cancer tissue xenografts recapitulate remote metastasis and cancer-associated hypercoagulation
3. 学会等名 American pancreatic Association 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyoshi M, Miyashita K, Kimoto A, Ohnaga T, Shimizu K, Hori Y
2. 発表標題 Pancreatic cancer cell-derived exosomes induce their own epithelial-mesenchymal transition
3. 学会等名 American pancreatic Association 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 膵臓がん幹細胞に対する抗体	発明者 堀裕一、清水一也、 立花太郎、伊原寛一 郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/017037	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	清水 一也 (Shimizu Kazuya) (50335353)	神戸大学・保健学研究科・保健学研究員 (14501)	
研究分担者	三好 真琴 (Miyoshi Makoto) (50433389)	神戸大学・保健学研究科・講師 (14501)	

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