

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790362

研究課題名(和文) 膵癌における孤在性浸潤の分子機構：孤在性癌細胞に発現する分子の同定および機能解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism of solitary cell infiltration in pancreatic cancer

## 研究代表者

眞杉 洋平 (Masugi, Yohei)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90528598

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、膵癌細胞が組織内に単独で浸潤する特徴的病理像、孤在性浸潤に注目した。この病理像が目立つ膵癌は悪性度が高いことが知られているが、その分子メカニズムは今まで不明であった。我々は膨大な遺伝子発現情報の中から、この現象のキーとなる重要分子二つ、SMAD3とIntegrin beta 4(ITGB4)を見出した。本研究の結果により、これらの分子の高発現はEMTと称される特徴的浸潤様式と強く関わることを、さらにSMAD3ならびにITGB4が膵癌の新規予後予測マーカーとなることが明らかとなった。本研究成果は、極めて高悪性度の膵癌に対する悪性度分子診断や新規治療ターゲット開拓に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study focuses on "Solitary cell infiltration", which is a characteristic pathological finding of pancreatic cancer cells singly infiltrating into the tissue stroma. High degree of solitary cell infiltration is known to reflect the tumor aggressiveness of pancreatic cancer. However the molecular mechanism is unclear. Among vast number of molecules expressed in cancer cells, we found the two important molecules, SMAD3 and Integrin beta 4 (ITGB4), as key player in the mechanism of solitary cell infiltration. We showed that these molecules are related to the promotion of a characteristic invasive property (EMT), and that both SMAD3 and ITGB4 are novel prognostic markers in pancreatic cancer. Our results are expected to contribute to the molecular diagnosis of tumor aggressiveness and the exploitation of novel molecular targets in clinical cancer of the pancreas.

研究分野：人体病理学

キーワード：人体病理学 孤在性浸潤 上皮間葉移行 膵癌 予後 マイクロアレイ SMAD3 ITGB4

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、高い浸潤能と転移能を特徴とする非常に悪性度の高い癌腫である。膵癌の 90% 以上を占める膵管癌では、癌腺管が浸潤先進部において分化度を減じ、間質内に遊離発育する像が病理標本上でしばしば観察される。癌細胞の遊離発育が癌の悪性度と相関することは他の癌腫において以前から知られており、例えば大腸癌の浸潤先進部でみられる簇出 budding は、転移や予後と相関することが報告されている。一方、上皮細胞が細胞間接着や極性を失うと同時に、間葉様形質を獲得する過程をさす上皮間葉移行 Epithelial-mesenchymal transition (EMT) という現象が、発生段階のみならず創傷治癒や癌の浸潤・転移に関わることに近年注目が集まり、多数の論文が発表されている。申請者は、膵管癌の遊離浸潤、中でも他臓器癌に比べ膵癌で比較的特徴的な病理像である癌細胞が間質内で単独に浸潤する像、孤在性浸潤 solitary cell infiltration (SCI) に着目すると、SCI が高度の膵癌はリンパ節転移陽性症例が多く、予後不良であることを報告した(図 1)。また膵癌の浸潤先進部、特に孤在性浸潤癌細胞では上皮性接着分子 E カドヘリンの発現減少が認められ、間葉系マーカーであるビメンチンがしばしば発現することを見出し、膵癌における孤在性浸潤が EMT の組織学的指標となることを同時に報告した(Masugi, et al. Hum Pathol 2010)。しかしながら、膵癌における孤在性浸潤の分子機構については不明であった。

申請者のグループは、免疫不全マウスの膵臓にヒト膵癌組織を移植すると、移植されたマウス体内で、元のヒト膵癌の分化度や転移能をよく保持した腫瘍を形成することを報告し(Loukopoulos, et al. Pancreas 2004)。さらにこのモデルで得られた膵癌組織の遺伝子発現をマイクロアレイ解析することで、外科的切除膵癌 12 症例の網羅的遺伝子発現情報を得ており(Yamazaki, Masugi, et al. Lab invest 2009) この網羅的遺伝子情報を孤在性浸潤の病理情報とリンクさせることで、膵癌の孤在性浸潤の分子メカニズムに迫る。

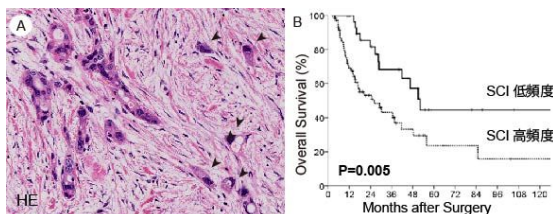
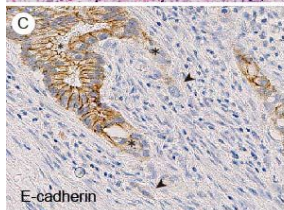


図 1: 孤在性浸潤 (SCI)  
A. 膵癌における孤在性浸潤癌細胞 (矢頭) B. SCI 高頻度群は有意に予後不良 C. 膵癌浸潤先進部 (\*), 特に孤在性癌細胞 (矢頭) では顕著な E カドヘリンの膜発現減少がみられる



2. 研究の目的

膵癌の孤在性癌細胞で発現する分子の同定とその機能解析を行い、膵癌の悪性度診断や新規治療法の開発へと展開するための基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

- (1) 膵癌の網羅的遺伝子情報が得られている同種性移植マウスモデル 12 例について、弧在性浸潤を評価し、クラスター解析を行い、膵癌の弧在性浸潤関連分子候補を得る。
- (2) 候補分子の中から、弧在性浸潤癌細胞に発現する分子をさらに絞り込み、免疫染色を用いて確認する。
- (3) 弧在性浸潤癌細胞に発現する分子について、多症例の膵癌組織で免疫染色を行い、その臨床病理学的意義を明らかにする。
- (4) 弧在性浸潤癌細胞に発現する分子について、膵癌細胞を用いて、遺伝子導入や RNAi を用いたノックダウンを行い、膵癌細胞における分子の機能や EMT を中心とした分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 膵癌の弧在性浸潤関連分子の絞り込み  
同種性移植マウスモデルの移植元膵癌症例 12 例について、弧在性浸潤を評価すると、弧在性浸潤が高頻度の症例は 8 例、低頻度の症例は 4 例であった。弧在性浸潤の病理情報群はし、網羅的遺伝子情報と弧在性浸潤の病理情報をリンクさせることで、弧在性浸潤に関連の深い分子候補群を得た(図 2)。

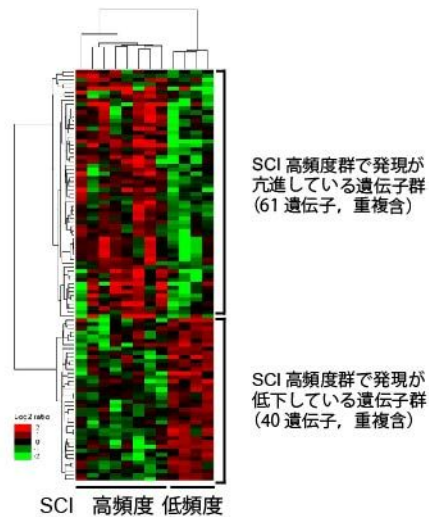


図 2: 膵癌 SCI に関わる分子候補の絞り込み  
膵癌 SCI の情報を基に網羅的遺伝子発現情報をクラスター解析する。

(2) 弧在性浸潤癌細胞に発現する分子

弧在性浸潤が EMT の組織像と関連が深いことから、EMT と関連が深い TGFβ シグナルの中心分子 SMAD3、癌間質相互作用に関連が深いと思われる Integrin beta 4 (ITGB4) に着目して、免疫染色を行ったところ、いずれの分子も浸潤先進部で強い発現がみられ、弧在性

浸潤癌細胞に発現がみられる (図3)。

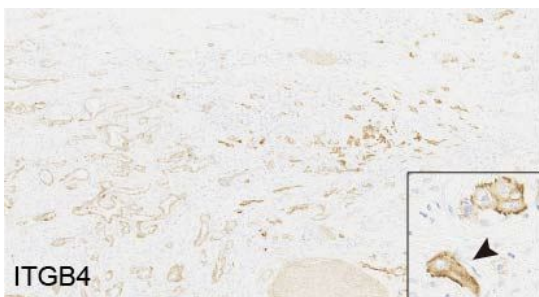


図3: 膵癌の孤在性浸潤癌細胞に発現する分子SCI高頻度群で高発現を示す integrin  $\beta$ 4(ITGB4)は膵癌遊離発育部(右)で強い陽性像を示す(inset 矢頭は孤在性浸潤癌細胞)。

### (3) SMAD3・ITGB4の臨床病理学的意義

多症例(100例強)の膵癌切除検体を用いてSMAD3ならびにITGB4の免疫染色を行ったところ、いずれもが膵癌の予後予測マーカーとなることが示された。またリンパ節転移の有無や分化度などと有意に相関することが示された(図4)。

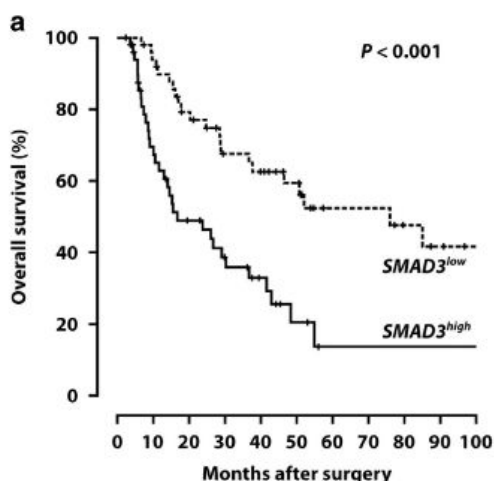


図4: SMAD3高発現膵癌は予後不良である。

### (4) 膵癌SCIの分子機構

膵癌細胞株を用いてSMAD3のノックダウンを行うと、移動能が低下し、EMTが抑制された。興味深いことにこの現象は、通常TGF $\beta$ シグナルにおいてSMAD3が核移行するために重要なSMAD4が欠損している膵癌細胞でも確認された。臨床的に膵癌の約60%でSMAD4の機能喪失型遺伝子異常がみられ、このような膵癌細胞では通常のTGF $\beta$ シグナルは機能していないが、申請者らの結果からSMAD4非依存的なSMAD3の活性化が膵癌EMTの誘導に重要である可能性が示唆された。

膵癌細胞株でITGB4のノックダウンを行うと、移動能・浸潤能が低下した(図5)。ITGB4を過剰発現させると移動能・浸潤能が高まり、EMTが誘導された。ITGB4はEMTを起こした癌細胞で細胞先端、一部フィロポディアに局在し、浸潤先端部においてラミニンなどの細胞外マトリックスとの相互作用に重要な役

割を果たすと推測された。一方、ITGB4はEGFRやcMET等のチロシンキナーゼ型受容体の作用を高めることも知られており、癌細胞の浸潤や生存に極めて重要な役割を果たしていると考えられる。

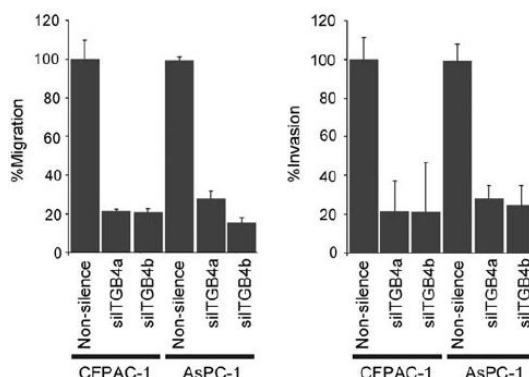


図5: ITGB4ノックダウンで膵癌細胞の移動能ならびに浸潤能が低下する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Masugi Y, Yamazaki K, Emoto K, et al. Up-regulation of integrin beta 4 promotes epithelial-mesenchymal transition and is a novel prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. Lab Invest 査読有, 95:308-19. 2015  
DOI: 10.1038/labinvest.2014.166.

Yamazaki K, Masugi Y, Effendi K, et al. Up-regulated SMAD3 promotes epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. Lab Invest 査読有, 94:683-91. 2014  
DOI: 10.1038/labinvest.2014.53.

Emoto K, Masugi Y, Yamazaki K, et al. Presence of primary cilia in cancer cells correlates with prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Hum Pathol 査読有, 45:817-25. 2014  
DOI: 10.1016/j.humpath.2013.11.017.

[学会発表](計3件)

眞杉洋平、山崎剣、他. Up-regulation of integrin beta 4 promotes epithelial-mesenchymal transition and is a novel prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. 第60回日本病理学会秋期特別総会, 2014年11月20日~2014年11月21日, 沖縄(国立劇場おきなわ、浦添市)  
(備考)優秀演題賞を受賞。

Masugi Y, Yamazaki K, et al. Up-regulation of integrin beta 4 promotes

epithelial-mesenchymal transition and is a novel prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. American Association of Cancer Research annual meeting, 2014年04月05日~2014年04月09日, サンディエゴ (アメリカ合衆国)

Yamazaki K, Masugi Y, et al. SMAD3 upregulation is a novel biomarker of poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. American Association of Cancer Research annual meeting, 2013年04月06日~2013年04月10日, ワシントン DC (アメリカ合衆国)

〔その他〕

ホームページ

慶應義塾大学医学部病理学教室

慶應義塾大学病院病理診断部

<http://www.keio-pathology.net/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

眞杉 洋平 (MASUGI Yohei)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90528598