

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462067

研究課題名(和文)膵臓癌のリンパ行性転移のメカニズム解明とその制御法確立のための基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research for elucidation and control of lymphatic metastasis for pancreatic cancer

研究代表者

蔵原 弘(KURAHARA, HIROSHI)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：70464469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1.膵臓において、免疫抑制方向に分化したM2-tumor associated macrophage (M2-TAM)がリンパ管新生を増強しリンパ行性転移を促進する。葉酸レセプター陽性のTAMが血管新生を介して癌の浸潤・転移において特に重要な役割を有する。2.治療前の血清CA19-9値、DUPAN-2値、および原発巣におけるp53とPDGFR- $\alpha$ の発現は血行性転移の予測因子である。3. MicroRNA-375によって制御されるZFP36L2が膵癌細胞の浸潤能を増強させ、膵癌進展を促進する。4.新規癌転移抑制遺伝子HMP19を同定し、増殖抑制や浸潤能抑制のメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1. M2-tumor associated macrophages those differentiated to immunosuppression increase lymphangiogenesis and promote lymphatic metastasis in pancreatic cancer. TAM that express folate receptor- $\alpha$  play important roles in invasion and metastasis via angiogenesis in pancreatic cancer. 2. Pretreatment serum CA 19-9 and DUPAN-2 levels, and expression of p53 and PDGFR- $\alpha$  in the primary tumor are predictors of hematogenous metastasis; and important factors for determination of therapeutic strategy for pancreatic cancer. 3. MicroRNA screening using a next-generation sequencer revealed that ZFP36L2 which is regulated by microRNA-375 increase invasive ability of pancreatic cancer cells and promote tumor progression. 4. We identify a novel metastasis suppressor gene HMP 19 by genome-wide shRNA screening using non-metastatic pancreatic cancer cell line and revealed the mechanisms of inhibition of progression and invasion.

研究分野：消化器外科

キーワード：リンパ節転移 リンパ節微小環境 上皮間葉移行 血行性転移 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

消化器癌の転移経路には主に血行性経路とリンパ行性経路とがあり、転移のメカニズム解明とその制御は癌治療の成績向上のための重要課題である。リンパ行性転移のメカニズムに関しては未だ解明されていない点が多い。われわれの教室ではリンパ節転移の初期像であるリンパ節微小転移の正確な迅速診断の重要性、原発巣における接着因子の発現低下、リンパ管新生、ケモカイン、ケモカインレセプターの発現増強と微小転移を含むリンパ行性転移との関連を報告してきた。

近年、腫瘍微小環境の重要性が報告されており、腫瘍周囲間質細胞（線維芽細胞、炎症細胞等）と癌の進展促進との関連が注目されている。癌細胞の接着因子、リンパ管新生因子、ケモカイン等の発現の増減には癌細胞と周囲間質細胞との相互作用が重要な役割を有すると考えられ、リンパ行性転移に関しても腫瘍微小環境が大きく関与している可能性がある。研究代表者らはこれまで癌のリンパ行性転移のメカニズムの解明とその制御という命題に取り組む中で、特に腫瘍微小環境の役割に注目して研究してきた“癌のリンパ行性転移のメカニズム解明”(若手研究 B: H19-21: 課題番号 20790963)、“消化器癌のリンパ行性転移を促進する腫瘍微小環境の解明とその制御”(基盤研究 C: H22-23: 課題番号 22591526)。

## 2. 研究の目的

膵臓癌のリンパ行性転移のメカニズムの解明とその制御法の開発を目的とする。リンパ行性転移は膵臓癌の大きな予後不良因子であり、そのメカニズム解明と制御は膵臓癌の治療における重要課題である。本研究では以下の3点について明らかにする。

1) リンパ行性転移における腫瘍関連マクロファージの役割

2) リンパ行性転移における癌細胞の上皮間質移行の役割

3) リンパ行性転移を制御する転移抑制遺伝子の同定とその働きの解明

## 3. 研究の方法

手術により切除した腫瘍周囲リンパ節において腫瘍関連マクロファージ (tumor associated macrophage: TAM)、葉酸レセプター陽性 TAM の集積と血管新生、リンパ管新生、リンパ行性転移との関連を RT-PCR や免疫染色を用いて検討した。膵癌症例に対して、治療前に施行した endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration (EUS-FNA) による生検検体を用いた p53 および PDGFR- 発現を評価し、血行性転移との関連を検討した。膵癌切除症例における癌部と非癌部の次世代シーケンサーを用いた microRNA スクリーニングにより膵癌抑制性の新規 microRNA とそのターゲット蛋白を同定し、膵癌における機能解析および予後との関連を検討した。膵癌細胞株に shRNA ライブラリーを導入した genome-wide スクリーニングにより、新規癌転移抑制遺伝子を同定し、その機能解析および予後との関連を検討した。

## 4. 研究成果

以下のことを明らかにして報告した。

1. 膵癌の腫瘍微小環境において、免疫抑制方向に分化した腫瘍関連マクロファージ (M2-tumor associated macrophage: M2-TAM) がリンパ管新生を増強しリンパ行性転移を促進する。

葉酸レセプター (folate receptor: FR) 陽性の TAM が血管新生を介して癌の浸潤・転移において特に重要な役割を有する。リンパ行性転移に際しては、原発巣のみならず、領域リンパ節におけるリンパ管新生がリンパ節転移に先んじて生じている。

2. 膵癌症例において、治療前の血清 CA19-9 値、DUPAN-2 値、および膵癌原発巣における p53 と PDGFR- の発現は血行性転移の予測因子であり、術前治療を含めた膵癌治療方針決定において重要な因子である。

3. 次世代シーケンサーを用いた膵癌の幹

部と非癌部の microRNA スクリーニングにより, microRNA-375 によって制御される ZFP36L2 が癌細胞の浸潤能を増強させ, 膵癌進展を促進する.

4. 非転移性の膵癌細胞株に shRNA ライブラリーを導入した genome-wide スクリーニングにより, 新規癌転移抑制遺伝子 HMP19 を同定し, 増殖抑制や浸潤能抑制のメカニズムを明らかにした.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Clinical impact of circulating tumor cells and therapy response in pancreatic cancer. Okubo K, Kurahara H, Natsugoe S. Eur J Surg Oncol. 2017 S0748-7983(17)30345-1. (査読有り)

2. ZFP36L2 promote cancer cell aggressiveness and is regulated by antitumor microRNA-375 in pancreatic ductal adenocarcinoma. Yonemori K, Kurahara H, Natsugoe S. Cancer Sci. 2017;108(1):124-135. (査読有り)

3. Clinical significance of serum carbohydrate antigen 19.9 and duke pancreatic monoclonal antigen type 2 for the prediction of hematogenous metastases in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. Kurahara H, Natsugoe S. Pancreatol. 2016;16(6):1051-1056. (査読有り)

4. Aberrant methylation of MUC1 and MUC4 promoters are potential prognostic biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. Yokoyama S, Kurahara H, Hollingsworth MA. Oncotarget. 2016;7(27):42553-42565. (査読有り)

5. MicroRNA in pancreatic cancer. Yonemori K, Kurahara H, Natsugoe S. J Hum Genet. 2017;62(1):33-40. (査読有り)

6. Suppression of pancreatic cancer growth and metastasis by HMP19 identified through genom-wide shRNA screen. Kurahara H, Natsugoe S, Welch DR. Int J Cancer. 2016;139(3):628-638. (査読有り)

7. Impact of p53 and PDGFR- expression on metastasis and prognosis of patients with pancreatic cancer. Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. World J Surg. 2016;40(8):1977-1984. (査読有り)

8. Predictors of early stages of histological progression of branch duct IPMN. Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. Langenbecks Arch Surg. 2015;400(1):49-56. (査読有り)

[学会発表](計 10 件)

1. Borderline Resectable 膵癌に対する化学放射線療法後の手術適応および手術時期の検討. 蔵原 弘, 前村公成, 夏越祥次. 第 78 回日本臨床外科学会. グランドプリンス新高輪(東京都港区)11月26日. 2016.

2. 膵癌における血行性転移予測のためのバイオマーカー. 蔵原 弘, 前村公成, 夏越祥次. 第 14 回日本消化器外科学会大会. 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)11月14日. 2016.

3. Appropriate treatment strategy for IPM. Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. The 20<sup>th</sup> meeting of the International Association of Pancreatology. 仙台国際センター(宮城県仙台市)August 6, 2016.

4. 膵臓癌に対する集学的治療における切除術および化学放射線療法. 蔵原 弘, 前村公成, 夏越祥次. 第 38 回日本癌局所療法研究会. 京王プラザホテル(東京都新宿区)6月10日. 2016.

5. p53 と PDGFR- を用いた膵癌の血行性転移予測と今後の治療戦略. 蔵原 弘, 前村公成, 夏越祥次. 第 116 回日本外科学会. 大阪国際会議場(大阪府大阪市)4月16日. 2016.

6. 進行膵癌に対する化学放射線療法の効果予測因子. 蔵原 弘, 前村公成, 夏越祥次. 第 70 回日本消化器外科学会. アクトシティ浜松(静岡県浜松市)7月17日. 2015.

7. 切除不能局所進行膵癌に対する化学放射線療法. 蔵原 弘, 前村公成, 夏越祥次. 第 46 回日本膵臓学会. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)6月19日. 2015.

8. 分子型 IPMN に対する適切な手術時期の検討: 早期癌を見逃さないために. 蔵原 弘, 前村公成, 夏越祥次. 第 12 回日本消化器外科学会大会. 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)10月26日. 2014.

9. 手術症例からみた IPMN 診療における留意

点・蔵原 弘，前村公成，夏越祥次．第 45 回日本膵臓学会．北九州国際会議場（福岡県北九州市）7 月 11 日．2014．

研究者番号：70237577

10．IPMN の至適治療方針．蔵原 弘，前村公成，夏越祥次．第 26 回日本肝胆膵外科学会．和歌山県民文化会館（和歌山県和歌山市）6 月 11 日．2014．

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

蔵原 弘 (KURAHARA HIROSHI)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教  
研究者番号：70464469

### (2)研究分担者

又木 雄弘 (MATAKI YUKO)  
鹿児島大学・附属病院・特任講師  
研究者番号：10444902

前村 公成 (MAEMURA KOSEI)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授  
研究者番号：30398292

新地 洋之 (SHINCHI HIROYUKI)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  
研究者番号：60284874

夏越 祥次 (NATSUGOE SHOJI)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授