

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462070

研究課題名(和文)膵癌間質のプロテオーム解析

研究課題名(英文)Proteomic analysis of stromal tissue of pancreas

研究代表者

遠藤 格 (ENDO, Itaru)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：60211091

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)：膵癌は予後不良な疾患であり、新規治療薬の開発が期待されている。近年、膵癌間質が癌の進展を促進し、抗癌剤耐性にも関与している事が実証された。これまでに、膵癌間質と正常膵間質で発現に差のある蛋白質を網羅的に解析し、CRMP4という候補蛋白質を選出した。膵癌においてCRMP4の発現は強力な予後、再発予測因子であり、静脈浸潤、肝転移とも相関を認めた。本研究では膵炎モデルマウスにおいて、膵炎とCRMP4の関係と、間質におけるCRMP4の発現を確認した。膵前癌病変モデルにおいてもCRMP4発現と前癌病変の進行への関係が明らかになった。動物実験系においてCRMP4が膵癌の発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer has been an aggressive malignancy. Recently, stroma in tumor is reported to be associated with cancer-cell proliferation, apoptosis, differentiation, and invasion in several cancers. Previously, we examined proteins expressing in the stroma of pancreatic tumors or of normal pancreas, and found that CRMP4 differentially expressed in pancreatic tumor stroma compared to normal pancreatic tissue. Of all the CRMPs, only CRMP4 was differentially expressed in pancreatic cancer tissues. CRMP4 staining was highly correlated with poor differentiation and liver metastasis. In this project, we revealed that caerulein-induced pancreatitis augments the expression of CRMP4 in vivo experiment. Sequentially, we investigated the role of CRMP4 in pancreatic cancer precursor lesions in gene engineered mouse model. Our results suggested that CRMP4 is significantly associated with initiation and progression of pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 浸潤 転移 免疫 膵炎 Kras CRMP4

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌の特徴の一つに desmoplasia と呼ばれる現象がある。これは、癌細胞を取り巻く間質において線維芽細胞が増殖し、細胞外マトリックス (ECM) が沈着することで腫瘍の成長と浸潤を促進するものである。類似した現象は他の癌種でも認められており、間質の構造は癌細胞によって構築され、癌の進展 (増殖、生存、浸潤、転移) を促進することが知られている。癌間質を正常化することができれば、間接的に癌の進展を抑制することが可能であると考えられる。実際に腫瘍血管新生を抑制する薬剤が臨床応用されて一定の効果を上げている。線維芽細胞は癌間質の主要な高星細胞であり CAF (cancer associated fibroblast) と称される。癌細胞と CAF の共培養やマウスへの混合移植モデルを活用した研究によって、CAF が癌の進展を促進させ、抗癌剤耐性にも関与していることが実証された。CAF は癌治療の新たな標的として注目を集めている。

CAF を標的とした治療法は既存の癌治療に相乗効果が見込めると考えられている。また、従来の癌細胞を標的とした治療は、癌細胞の集団に不均一性を有しており、使用回数が増加するにつれて薬剤耐性を獲得した細胞が生じやすいと考えられている。それに対し、CAF は癌細胞ほどの不均一性、遺伝子多型を有さないことから、CAF を標的とした治療では治療抵抗性が生じにくいとも期待されている。

癌細胞を標的とした薬剤、レジメンが開発されているにもかかわらず、依然として予後の改善が大幅な改善がみられない現在の状況を鑑みると、CAF や癌間質を標的とした治療戦略の開発、進展は急務であると考えられる。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでの研究から、膵癌間質と正常膵間質を比較した際に発現に差のある蛋白質を網羅的に解析し、その結果から Collapsin response mediator protein 4 (CRMP4) を候補蛋白質として選出した。CRMP4 の機能を、膵癌組織サンプルを用いた実験 (免疫組織化学染色、RT-PCR、Western Blot)、細胞株を用いた実験で (Proliferation assay, Invasion assay) で解明してきた。本研究はこれまでの成果を基礎として、各種疾患モデルマウスを用いて、CRMP4 の機能を in vivo の実験系で確認、検証し治療標的としての可能性を追求することである。慢性膵炎は広く悪性腫瘍の引き金と考えられている。疫学的にも膵炎は膵癌の重要な危険因子である。また、膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) は膵癌の最も一般的な前癌病変とされている。両疾患のモデルマウスを用いて CRMP4 の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) コレシストキニンアゴニストであるセ

ルレインを用いて、急性膵炎、慢性膵炎を惹起した実験動物モデルを確立した。CRMP4 の発現レベルとそのリン酸化フォームの強度を検証した。CRMP4 と T リンパ球マーカーである CD3 との共染色を行う。

(2) Pdx-Cre マウスと KrasG12D マウスを交配し、膵特異的に Kras 変異を起こした KrasG12D マウスを作成する。KrasG12D 発現マウスによる膵前癌病変モデルマウスと CRMP4 ノックアウトマウスとの交配で得られた、Kras 変異 CRMP4 ノックアウトマウスを比較し膵癌前癌病変の発達過程を比較する。

### 4. 研究成果

(1) 急性膵炎、慢性膵炎は CRMP4 の発現とリン酸化を促進する。多中心性の信号がリンパ球の浸潤した間質領域に観察された (図 1)。

急性膵炎、慢性膵炎の間質における CRMP4 が CD3 陽性細胞と一致しており、CRMP4 の局在を明らかにした (図 2)。

図 1. 膵炎モデルマウス免疫組織化学

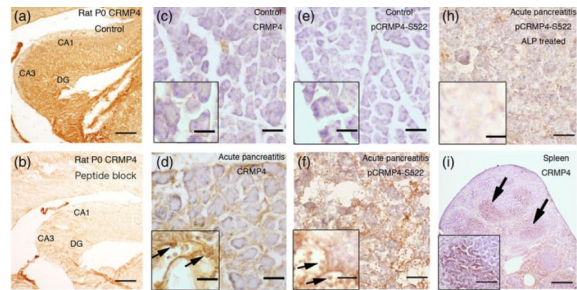
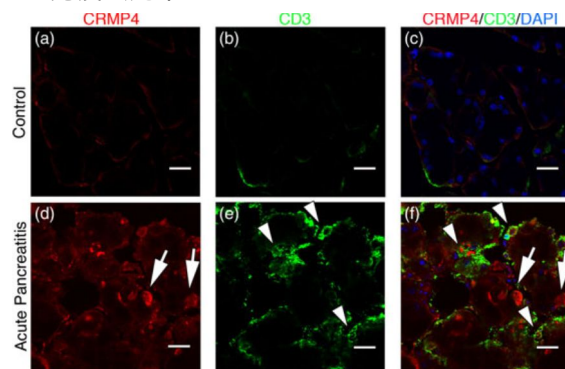


図 2 急性膵炎モデルにおける CRMP4 と CD3 の免疫蛍光染色



(2) Kras 変異マウスの作成と膵前癌病変モデルマウス作成に成功した (図 3)。

膵前癌病変マウスと CRMP4 ノックアウト膵前癌病変モデルマウスの検討を行った結果、CRMP4 ノックアウトの群で PanIN が低 Grade になる傾向を確認した (図 4)。

図3 膵前癌病変モデル、Kras 変異 CRMP4 ノックアウトマウス作成概念図

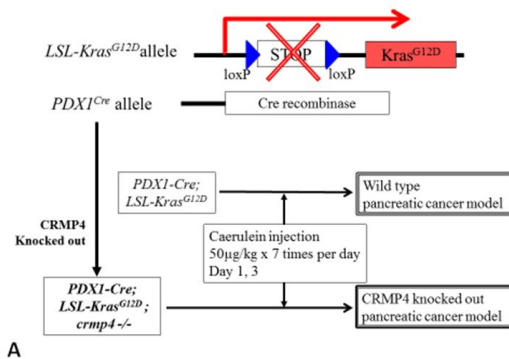


図4 膵前癌病変モデル、CRMP4 ノックアウト膵前癌病変モデルマウスの比較

CRMP4 delays progression of pancreatic cancer precursor lesions in mice  
Chai square test;  $p=0.024$

Grade of PanIN	<i>Pdx-Cre; Kras<sup>G12D</sup>; Crmp4<sup>+/+</sup></i> (n=18)	<i>Pdx-Cre; Kras<sup>G12D</sup>; Crmp4<sup>-/-</sup></i> (n=8)
PanIN 2 $\geq$	13	2
Normal-PanIN1A/1B	5	6
Day	141.1 $\pm$ 41.5	124.3 $\pm$ 27.1

これらの結果から、CRMP4 が膵炎、膵前癌病変モデルマウスにおいて疾患発症に関与していることが明らかになった。間質における CRMP4 発現が膵炎、膵前癌病変に関与が示唆された。

#### 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 7 件)

- Hiroshima Y, Lwin TM, Murakami T, Maw AA, Kuniya T, Chishima T, Endo I, Clary BM, Hoffman RM, Bouvet M. Effective fluorescence-guided surgery of liver metastasis using a fluorescent anti-CEA antibody. J Surg Oncol. 2016 Oct 3. 24462. , 査読有
- Sato S, Nakamura F, Hiroshima Y, Nagashima Y, Kato I, Yamashita N, Goshima Y, Endo I. Caerulein-induced pancreatitis augments the expression and phosphorylation of collapsin response mediator protein 4. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2016 Jul;23(7):422-31. , 査読有
- Hiroshima Y, Matsuo K, Kawaguchi D, Kikuchi Y, Endo I, Koda K, Togo S, Hoffman RM, Tanaka K. Modified Liver Hanging Maneuver for En-bloc Right-sided Hepatectomy Combined with Total Caudate Lobectomy for

Colon-Cancer Liver Metastasis and Hepatocellular Carcinoma. Anticancer Res. 2016 Apr;36(4):1729-35. , 査読有

4. Hiroshima Y, Maawy A, Zhang Y, Murakami T, Momiyama M, Mori R, Matsuyama R, Katz MH, Fleming JB, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Endo I, Hoffman RM, Bouvet M.: Metastatic recurrence in a pancreatic cancer patient derived orthotopic xenograft (PDOX) nude mouse model is inhibited by neoadjuvant chemotherapy in combination with fluorescence-guided surgery with an anti-CA 19-9-conjugated fluorophore. PLoS One. 2014 Dec 2; 9(12):e114310. , 査読有

5. Hiroshima Y, Zhang Y, Murakami T, Maawy A, Miwa S, Yamamoto M, Yano S, Sato S, Momiyama M, Mori R, Matsuyama R, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Endo I, Zhao M, Hoffman RM.: Efficacy of tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R in combination with anti-angiogenesis therapy on a pancreatic cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) and cell line mouse models. Oncotarget. 2014 Dec 15; 5(23):12346-57. , 査読有

6. Hiroshima Y, Maawy A, Hassanein MK, Menen R, Momiyama M, Murakami T, Miwa S, Yamamoto M, Uehara F, Yano S, Mori R, Matsuyama R, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM.: The tumor-educated-macrophage increase of malignancy of human pancreatic cancer is prevented by zoledronic acid. PLoS One. 2014 Aug 12; 9(8):e103382. , 査読有

7. Homma Y, Taniguchi K, Murakami T, Nakagawa K, Nakazawa M, Matsuyama R, Mori R, Takeda K, Ueda M, Ichikawa Y, Tanaka K, Endo I.: Immunological impact of neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Ann Surg Oncol. 2014 Feb; 21(2):670-6. , 査読有

[学会発表](計 2 件)

- Hiroshima Y, Zhang Y, Maawy A, Sato S, Murakami T, Yamamoto M, Uehara F, Miwa S, Yano S, Momiyama M, Chishima T, Tanaka K, Maawy A, Endo I, Hoffman RM.: Establishment of a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) model of patient cervical cancer. 105<sup>th</sup> ACCR, Poster, San Diego, USA, 2014, 4.
- Hiroshima Y, Zhao M, Katz MH. G, Fleming JB, Sato S, Murakami T, Yamamoto M, Uehara F, Miwa S, Yano S, Momiyama M, Zhang Y, Chishima T, Maawy A, Tanaka K, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM.: Efficacy of Salmonella typhimurium A1-R and anti-VEGF therapy on a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) pancreatic cancer model. 05<sup>th</sup> ACCR, Poster, San Diego, USA, 2014, 4.

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ycusurg2.jp/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

遠藤 格 (ENDO, Itaru)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：60211091

### (2)研究分担者

廣島 幸彦 (HIROSHIMA, Yukihiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60718021

森 隆太郎 (MORI, Ryutaro)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：90596412

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者