

令和元年6月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10602

研究課題名(和文) 膵癌における新たなリンパ節転移機序CCID formationの解明とその制御

研究課題名(英文) Investigate and control of new lymph node metastasis mechanism CCID formation in pancreatic cancer

研究代表者

安井 隆晴 (YASUI, Takaharu)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：60611283

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)：膵癌細胞株で、CCIDを形成することを見出した。癌培養上清添加で形成能が上昇したため、上清添加したリンパ管内皮細胞からmRNAを抽出しマイクロアレイ解析を用い、共通した遺伝子変化を見出し、その中でS100Pに着目した。IL-6添加で、リンパ管内皮でのS100Pは発現が上昇し、リンパ管内皮細胞の遊走能・CCID形成能が上昇した。また、細胞外S100Pによりリンパ管内皮細胞の遊走能・CCID形成能が上昇し、その上昇は細胞外S100Pの受容体であるRAGEアンタゴニストで抑制された。以上により、膵癌においてS100Pによって、部分的にCCIDが制御されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は予後不良の疾患であり、早期診断・治療が困難で、発見時にすでに高度浸潤、遠隔転移を伴うことが多い。その中で、リンパ節転移は高頻度に見られ予後を左右すると言われているが、その機序は不確かな部分が多い。本研究では、膵癌におけるCircular chemorepellent-induced defects (CCID) formationがS100Pによって部分的に調節されており、リンパ節転移を阻害するための有望な標的であることが示唆された。この結果が次世代の個別化治療の開発につながれば、学術的にも広範な波及効果が期待され、将来の膵癌患者の予後改善に貢献をもたらす可能性があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Time-lapse microscopic imaging revealed that spheroids from pancreatic cancer cells caused circular defects in lymphatic endothelial monolayers. The addition of supernatant from the cultured cancer cells enhanced CCID formation. Microarray analysis revealed that the expression of S100P was significantly increased when Lymphatic endothelial cells (LECs) were treated with the supernatant of cultured cancer cells. S100P expression in LECs increased after the addition of IL-6. IL-6 treatment increased migration in LECs and CCID formation. The extracellular S100P increased migration in LECs and CCID formation. The antagonist of S100P significantly suppressed the migration of LECs and CCID formation in LECs. The present findings demonstrated that CCIDs in pancreatic cancer are partly regulated by S100P, suggesting that S100P is a promising target to inhibit lymph node metastasis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 リンパ節転移 CCID formation Collective invasion

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

膵癌は四半世紀の間予後が改善していない癌腫である。早期診断が難しく、発見時には多くが進行した状態であることや有効な補助療法がほとんどなく進行が極めて早いことが、膵癌の生存率に改善が見られない原因として考えられる。膵癌においては早期からリンパ管内に侵入しリンパ組織を循環することが再発の原因となりうるため、リンパ節転移制御は、予後を大きく改善させるための重要な課題である。リンパ節転移に関しては様々な研究が進められているが、最近 **Circular chemorepellent-induced defects (CCID) formation** という新しい研究手法が行われている。これは、リンパ管内皮を **monolayer** として培養した後に **spheroid** を形成した癌細胞集団を共培養するもので癌細胞集団がリンパ管内皮を押しつけるように浸潤していく現象である。**CCID formation** はまさに癌細胞がリンパ管内に侵入し、リンパ管内からリンパ節実質に浸潤する場面を如実に表している可能性がある。以上より、**CCID formation** のメカニズムを解明することは、微小リンパ節転移の形成機序を理解解明する新しい切り口として必要かつ十分な要素だと考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

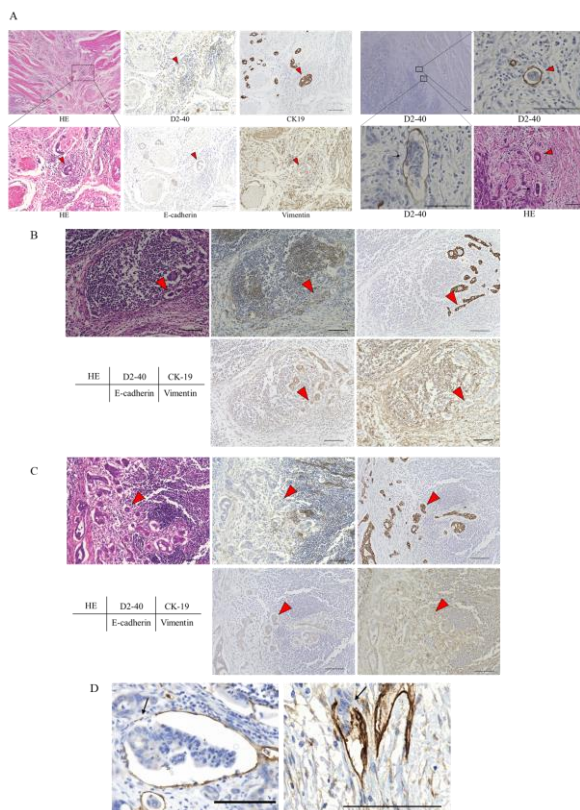
膵癌は予後不良の疾患であり、早期診断・治療が困難で、発見時にすでに高度浸潤、遠隔転移を伴うことが多い。その中で、リンパ節転移は高頻度に見られ予後を左右すると言われているが、リンパ節転移の機序は不確かな部分が多い。**Spheroid** を形成した癌細胞集団がリンパ管内皮細胞を押しつけるように浸潤していく形態(**CCID formation**)は、癌細胞による **Collective invasion** を表している可能性がある。本研究は、この機序を解明することで膵癌の微小リンパ節転移を制御することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、膵癌の **CCID** 形成の分子メカニズムを解析し、その責任細胞のマーカーを同定することで転移責任細胞を **prospective** に同定し、その癌細胞と、リンパ管内皮細胞株や線維芽細胞との相互作用を含めた微小環境における生物学的特徴を明らかにする。具体的には、各膵癌細胞 **spheroid** の **CCID** 形成能の評価や **CCID** 形成に関連する分子の同定を行う。**spheroid** に着目した癌間質相互作用や **CCID** 形成機序の検討も行っていく。膵癌患者の切除標本において、同定したマーカーの免疫組織化学染色を行い、リンパ節転移を含む臨床病理学的因子との相関を検討する。

4. 研究成果

(1) 膵癌細胞はリンパ管およびリンパ節にクラスターとして存在する

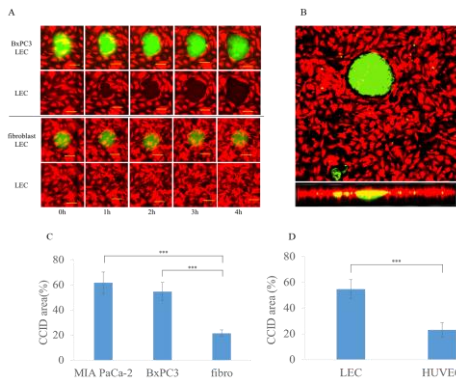


集団浸潤がヒト膵癌組織に存在するかどうかを検討するために、ヒト膵臓組織を HE、D2-40、CK19、E-cadherin、Vimentin で免疫染色した。癌細胞クラスターが原発巣周辺のリンパ管内、ならびにリンパ節の被膜下洞およびリンパ皮質内に存在した。また、リンパ管を貫いて癌細胞クラスターが存在した。さらに、すべての癌細胞クラスターは上皮系マーカーである **E-cadherin** 陽性で、間葉系マーカーである **Vimentin** 陰性であった。以上より、リンパ節転移において癌細胞が **EMT** なしのクラスターの形で侵入することを示唆している。

左図

A: 原発周囲リンパ管内クラスター、B: リンパ節辺縁洞内のクラスター、C: リンパ節皮質内のクラスター、D: リンパ管内皮細胞を貫いて存在するクラスター

(2) 膵癌細胞のスフェロイドが LEC 単層で CCID を誘導する

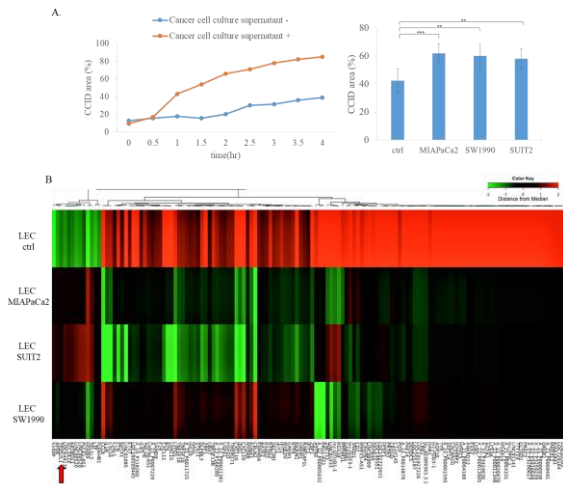


膵癌細胞を使用し、CCID 形成を起こすことを見出した。ヒト線維芽細胞よりも癌細胞で CCID 形成は起こりやすく、血管内皮細胞よりもリンパ管内皮細胞のほうが defect を形成しやすかった。

左図

A:CCID のタイムラプス像、B:CCID の三次元像、C:癌細胞と線維芽細胞での CCID 比較、D:血管内皮とリンパ管内皮との CCID 比較

(3) 癌細胞上清添加で LEC の CCID 形成および S100P 発現を増加させた

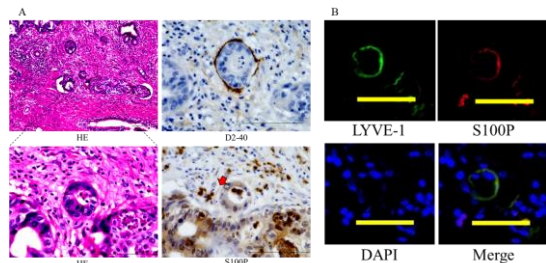


癌細胞上清で CCID 形成が増加することを見出した。癌細胞上清の処理後に LEC において遺伝子発現がどのように変化したかを調べるために 3 つの膵癌細胞株からの培養上清で処理した LEC を用いてマイクロアレイ分析を行い、膵癌細胞由来の培養上清を用いた LEC における共通した遺伝子発現変動を見出した。

左図

A:癌培養上清添加での CCID 形成能、B:癌上清添加での共通した LEC の遺伝子変動のヒートマップ

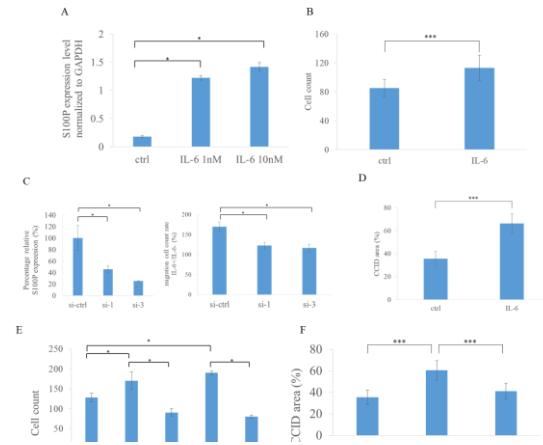
(4) 原発腫瘍周辺のリンパ管で S100P を発現した



S100P は腫瘍細胞において高度に発現されたが、S100P は原発巣周囲のリンパ管内に腫瘍クラスターが存在する部位で LEC において発現された。

A:免疫染色画像、B:蛍光免疫染色画像

(5) S100P は LEC の移動を制御し、CCID 形成に関与している



以前前立腺癌において IL-6 添加によって細胞内の S100P 発現が上昇した報告があるため、IL-6 添加実験を施行した。IL-6 添加でリンパ管内皮での S100P は発現が上昇し、さらにリンパ管内皮細胞の遊走能・CCID 形成能が上昇した。また、細胞外 S100P の影響も考えられたため、細胞外 S100P での検討も行った。S100P 添加によりリンパ管内皮細胞の遊走能・CCID 形成能が上昇し、その上昇は細胞外 S100P の受容体である RAGE アンタゴニストで抑制された。

A:IL-6 添加での LEC の S100P mRNA 発現、B:IL-6 添加での LEC 遊走能、C:S100P ノックダウン LEC での IL-6 添加遊走能増強効果減弱、D:IL-6 添加での CCID 形成、E:癌培養上清・S100P・RAGE (細胞外 S100P 受容体) アンタゴニスト投与での LEC 遊走能、F:S100P・RAGE アンタゴニスト投与での CCID 形成

以上により膵癌における CCID が S100P によって部分的に調節されており、S100P がリンパ節転移を阻害するための有望な標的であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Nakayama H, Ohuchida K, Yoshida M, Miyazaki T, Takesue S, Abe T, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Shirahane K, Manabe T, Ohtsuka T, Toma H, Tominaga Y, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Degree of desmoplasia in metastatic lymph node lesions is associated with lesion size and poor prognosis in pancreatic cancer patients, *Oncol Lett*, 14(3)3141-3147, 2017, 査読有, DOI: 10.3892/ol.2017.6549

〔学会発表〕（計 6 件）

①中山宏道、大内田研宙、安藤陽平、岐部晋、武居晋、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、大塚隆生、中村雅史、膵癌転移の新知見：癌細胞塊のリンパ管内皮透過性亢進による転移形成促進機構の発見、第 73 回日本消化器外科学会総会、2018 年

②中山宏道、大内田研宙、相良亜希子、米永晃子、安藤陽平、岐部晋、武居晋、肥川和寛、巖子龍、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、藤田逸人、永井俊太郎、岡部安博、大塚隆生、水元一博、中村雅史、膵癌リンパ節転移におけるリンパ管内皮細胞の役割についての検討、第 49 回日本膵臓学会大会、2018 年

③中山宏道、大内田研宙、安藤陽平、岐部晋、武居晋、肥川和寛、巖子龍、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、藤田逸人、永井俊太郎、岡部安博、大塚隆生、水元一博、中村雅史、腫瘍由来 VEGFC はリンパ管内皮のクリアランスを促進しリンパ節転移に関わる、第 118 回日本外科学会定期学術集会、2018 年

④中山宏道、大内田研宙、吉田真樹、宮崎哲之、安藤陽平、岐部晋、武居晋、肥川和寛、阿部俊也、遠藤翔、奥村隆志、進藤幸治、森泰寿、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、水元一博、中村雅史、膵癌患者のリンパ節転移巣における間質増生の程度は、そのリンパ節転移巣のサイズと相関し予後にも関わる、第 25 回日本消化器関連学会週間、2018 年

⑤Nakayama H, Ohuchida K, Takesue S, Kibe S, Ando Y, Abe S, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Shirahane K, Tominaga Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M, A novel mechanism in lymphatic metastasis of pancreatic cancer, The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association, 2017 年

⑥中山宏道、大内田研宙、武居晋、安藤陽平、岐部晋、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、巖子龍、吉田真樹、奥村隆志、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史、膵癌のリンパ節転移における新たな機序の解明、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：寅田 信博

ローマ字氏名：(TORATA, nobuhiro)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：臨床検査技師

研究者番号 (8 桁)：00398075

研究分担者氏名：森山 大樹

ローマ字氏名：(MORIYAMA, taiki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：70586859

研究分担者氏名：大内田 研宙

ローマ字氏名：(OHUCHIDA, kenoki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：20452708

(2018 年)

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。