

令和元年5月23日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15607

研究課題名(和文) AnnexinII-癌周囲環境の相互作用と分泌因子による浸潤転移メカニズムの解明

研究課題名(英文) Expression of annexin II and stromal tenascin C promotes epithelial to mesenchymal transition and correlates with distant metastasis in pancreatic cancer

研究代表者

高野 重紹 (Takano, Shigetsugu)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20436380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は豊富な間質を有し、癌細胞と周囲微小環境が浸潤転移への関連する。抗癌剤耐性因子として同定されたAnnexin II (Anx2) と間質Tenascin C (TNC) の相互作用について機能実験、および膵癌組織の免疫染色でAnx2発現と間質TNC発現について検討した。ANX2は膵癌細胞で高発現し、3D培養ではANX2抑制で上皮系へ変換し、ANX2-TNC axisは間葉系に誘導した。ANX2-TNC相互作用で浸潤能・アノキス耐性は亢進、癌幹細胞能はそれぞれで亢進した。膵癌組織のANX2-TNC 高発現は血行性転移再発と相関し予後不良であった。膵癌でのANX2-TNCは癌進展機構に関わっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は最も予後不良な癌であり、5年生存率は未だ10%に満たない疾患である。その最大の理由の1つとして挙げられるのは、膵癌自体の悪性度の高さ(浸潤・転移能)と考えられる。本研究でAnnexin-IIとTenascin Cによる、癌細胞と癌周囲微小環境の相互作用について明らかとなったことで、膵癌進展機序の解明および今後の新規治療開発につながる研究成果と考えられる。本研究の内容については2018年 International Journal of Molecular Medicineに受理され、論文報告された。

研究成果の概要(英文)：The interaction of cancer cells and stromal components contributes to cancer progression. We explored the correlation of annexin II (ANX2) and stromal tenascin C (TNC) with pancreatic cancer (PDAC) progression. In ANX2 knockdown cells, there were fewer cells with a mesenchymal appearance in 3D culture and reduced invasion. Morphological change into mesenchymal phenotype and invasion were enhanced more by recombinant TNC treatment in control cells but not in ANX2 knockdown cells. Pancreatosphere formation assays showed that both ANX2 and TNC facilitated stem-like characters, and anoikis assays indicated that the ANX2-TNC interaction contributes to anoikis resistance in PDAC cells. In IHC analyses, the ANX2 High/stromal TNC High expression group showed a significant correlation with distant metastasis and poor outcomes after surgery. In conclusion, ANX2 and stromal TNC regulate invasion along with stemness and anoikis resistance, which are crucial for metastasis in PDAC progression.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：膵癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Annexin II(ANX2)は 36kDa の主に細胞膜に発現を認める phospholipid-, calcium binding protein として知られ、膵臓を含め brain, colorectal, stomach, lung, breast, liver cancer 等の固形癌で発現が増強することが報告されている(Crnogorac-Jurcevic T et al., Gastroenterology 2005)。これまで我々は、樹立したヒト膵癌細胞株である MIA PaCa2 の gemcitabine 耐性株(GEM-MIA PaCa2)(Togawa et al., Pancreas 2004)と、その野生株の Protein Profiling を 2次元電気泳動を用いて比較解析し、ANX2 を抗癌剤耐性因子として同定している(Takano S et al., Ann Surg Oncol 2008, 特許出願番号 2007-519048)。さらに、ANX2 の chemo-resistance の mechanism を解明するために、Bio-Plex system を用いたリン酸化蛋白を含めた cell signaling pathway の網羅的解析を行い(Takano S et al., Br J Cancer 2010)、Akt-mTOR pathway の活性化が膵癌細胞の抗癌剤耐性に関与していることを見出した(Kagawa S, Takano S et al., J Surg Res 2012)。

近年、様々な癌種において癌細胞の上皮間葉系移行(EMT)が、浸潤転移といった癌進展形式における重要な役割を担うことが広く研究され、加えて EMT と抗癌剤耐性の関わりも注目が集まっている。ANX2 の膵癌細胞における機能として t-PA と協調して浸潤能を亢進させることが報告され(Dias VM et al., Gut 2004)、さらに ANX2 発現を抑制することにより肝転移を抑制することが報告されたが(Zheng L et al., PLoS ONE 2011)、その詳細な分子機構については未だ不明である。一方、niche と呼ばれる分子が転移巣での disseminating cancer cells の定着、およびコロニー形成へ深く関与するという概念が示される中、ANX2 の direct binding partner の 1 つとして同定された Tenascin C(TNC) (Esposito I et al., J Pathol 2006)をはじめとした様々な Extracellular matrix(ECM)の重要性が示唆され、癌細胞とそれらの特異的蛋白との相互作用により遠隔巣での転移進展が惹起されるとの見解が示された(Oskarsson T et al., Nat Med 2011)。

## 2. 研究の目的

そこでこれらの背景を踏まえ、膵癌細胞で発現する ANX2 と、微小環境(癌周囲間質)から癌進展を誘導する TNC との interaction を中心に、浸潤転移への関与を in vitro の実験を通じて molecular function の検討を行う。さらに、膵癌切除標本での発現と臨床病理学的因子との関連や、転移形式および予後予測因子としての意義を解析することで、ANX2-TNC axis を target とした新規治療法開発の可能性を模索し、将来の臨床応用を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ANX2 と TNC のヒトおよびマウス膵細胞株での発現の検討

まず、Dr. Hingorani より供与された遺伝子改変膵癌モデルマウス(Hingorani SR et al., Cancer Cell 2003, Cancer Cell 2005)から得られたマウス前癌細胞(PanIN) KC cell とマウス膵癌細胞株 KPC1, KPC2 cell とその肝転移細胞株 KPCLiv cell を用い、ANX2 と TNC の発現の相関を ANX2siRNA を用いた抑制実験により確認し EMT marker との相関についても確認する。さらにヒト膵癌細胞株 PANC-1 において ANX2siRNA による ANX2 抑制および recombinant TNC 添加による E-cadherin 発現の変化について検討する。

### (2) ANX2 および TNC が及ぼす形態学的変化についての検討

次に、我々が開発した 3D culture system (Takano S et al., Nature Protoc. 2013) を用い、ANX2 発現抑制が膵癌細胞に及ぼす形態学的変化を検討する。Preliminary data として膵癌細胞は、膵前癌細胞 PanIN や肝転移細胞と比べ spheroid cyst の割合が少なく、spindle shaped cell の割合が多いことを確認している。さらに recombinant TNC (rTNC)を用い、ANX2 と TNC の相互作用が膵癌細胞における morphological change に寄与するかの検討を行う。

### (3) ANX2 と TNC との相互作用による浸潤および癌幹細胞様機能についての解明

膵癌細胞において ANX2-TNC の相互作用が invasion や cancer stemness に関わるかを in vitro で検討する。具体的には invasion assay, pancreatosphere formation assay, anoiki resistance assay を行い、浸潤能、putative cancer stemness およびアノイキス耐性能について、ANX2 knockdown および rTNC を用いて検討する。

### (4) 膵癌切除標本での ANX2-TNC 発現の臨床病理学的因子と予後についての関連の検討

膵癌切除標本での ANX2 と TNC の発現について免疫組織染色にて検討し、これら 2 つの発現が臨床病理学的因子と予後と関連があるかの解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) ANX2 は前癌膵細胞および膵癌細胞で発現し、膵癌細胞内の TNC 発現は ANX2 発現に

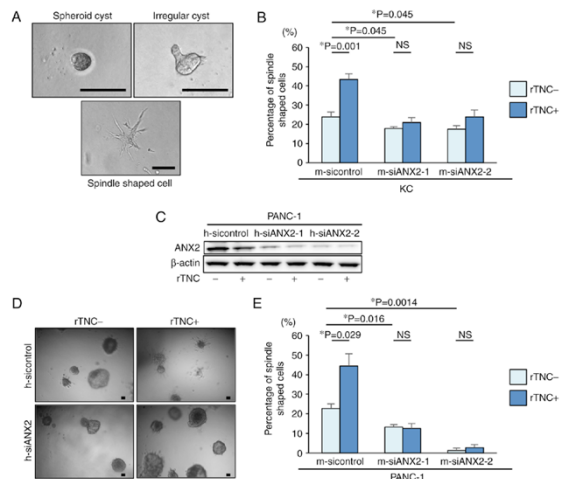
影響されない。

遺伝子改変膀胱癌モデルマウスから得られたマウス PanIN 細胞株 KC と膀胱癌細胞株 KPC1, KPC2, その肝転移細胞株 KPCLiv について ANX2 蛋白発現を western blot にて検討すると、原発巣である KC および KPC 細胞株で発現が高く、KPCLiv で比較的発現が低かった。TNC 発現は KPC 細胞で高かった。ANX2 と TNC の発現の相関を mouseANX2 特異的 siRNA を用いて、細胞内 TNC 発現の変化にて確認すると、KPC 細胞においては TNC 発現の変化は認めなかった。

次に、ヒト膀胱癌細胞株 PANC-1 を用い、ANX2siRNA を用いた ANX2 抑制および recombinant TNC 添加にて上皮 marker である E-cadherin 発現との相関について確認すると、control 細胞に TNC を添加すると E-cadherin の発現は低下するが、ANX2 knockdown 細胞では TNC 添加でも E-cadherin 発現の低下は認めなかった。これらのことから、ANX2-TNC 発現は膀胱癌細胞において EMT を誘導する可能性が示唆された。

(2) 膀胱前癌細胞および膀胱癌細胞では ANX2 発現抑制により epithelial phenotype に、ANX2-TNC axis は mesenchymal phenotype に誘導する。

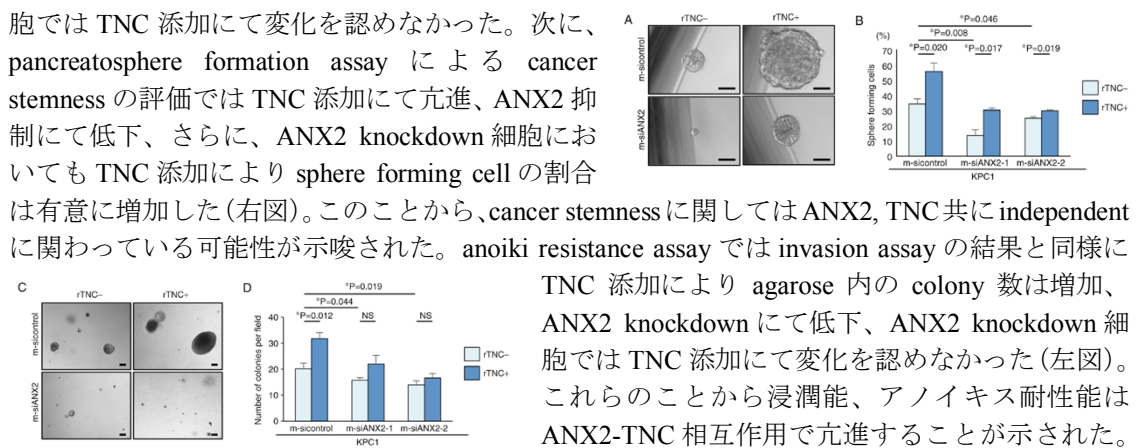
3D culture system を用いマウス膀胱異型細胞に及ぼす形態学的変化を検討すると、KC 細胞で TNC 添加により control 細胞では spindle shaped cell の割合が有意に上昇し、ANX2siRNA による ANX2 発現抑制を行うと、spindle shaped cell の割合が有意に減少した(右図)。興味深いことに、ANX2 knockdown 細胞では TNC 添加でも変化を認めなかった。さらに、同様の実験をヒト膀胱癌細胞株 PANC-1 でも行い上記と同様な結果が得られ、ANX2 と TNC の相互作用が膀胱異型細胞における mesenchymal な morphological change に寄与する可能性が示唆された。



(3) 膀胱癌細胞では ANX2-TNC 相互作用で浸潤能は亢進し、癌幹細胞様機能は independent に、アノイキス耐性は ANX2-TNC 相互作用にて亢進する。

膀胱癌細胞では TNC 添加にて変化を認めなかった。次に、pancreatosphere formation assay による cancer stemness の評価では TNC 添加にて亢進、ANX2 抑制にて低下、さらに、ANX2 knockdown 細胞においても TNC 添加により sphere forming cell の割合は有意に増加した(右図)。このことから、cancer stemness に関しては ANX2, TNC 共に independent に関わっている可能性が示唆された。anoiki resistance assay では invasion assay の結果と同様に TNC 添加により agarose 内の colony 数は増加、ANX2 knockdown にて低下、ANX2 knockdown 細胞では TNC 添加にて変化を認めなかった(左図)。これらのことから浸潤能、アノイキス耐性能は ANX2-TNC 相互作用で亢進することが示された。

続いて、機能解析として膀胱癌細胞において ANX2-TNC の相互作用が invasion や cancer stemness に関わるかを検討した。Invasion assay では左図のように、浸潤能は TNC 添加により亢進、ANX2 knockdown にて低下、ANX2 knockdown 細胞

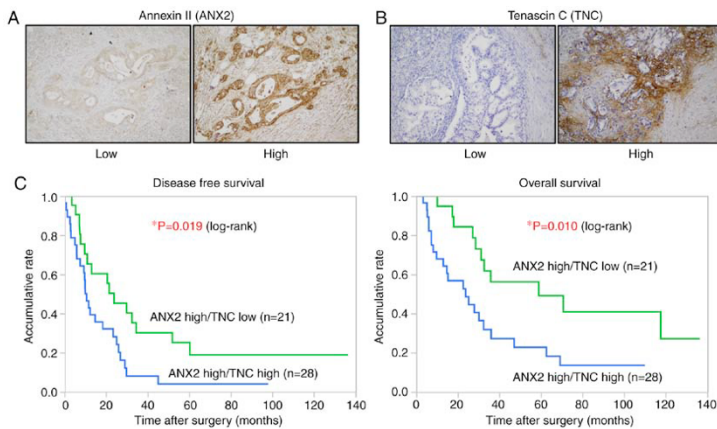


(4) 膀胱癌切除標本での ANX2-TNC 高発現は血行性転移再発と相関し予後不良の因子である。

まず、84例の膀胱癌切除標本での癌細胞 ANX2 発現と間質 TNC 発現を免疫組織染色にて強弱2群に分けて検討すると、2つの発現の相関は認めなかった(右図)。

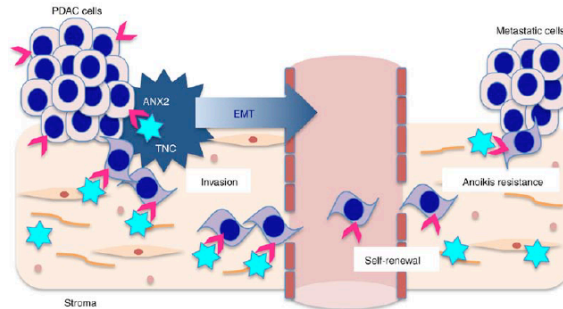
Table I. Correlation between expression of ANX2 and stromal TNC in pancreatic ductal adenocarcinoma tissues.

Expression of ANX2	Stromal TNC expression		P-value
	High (n=43)	Low (n=35)	
High (n=49)	28	21	NS
Low (n=29)	15	14	



次に、臨床病理学的因子について検討すると、ANX2 高発現 49 例中間質 TNC 高発現群 (n=28) は低発現群 (n=21) と比較しリンパ節転移 (p=0.026)、遠隔転移 (p=0.007) が多く、特に術後の血行性転移再発 (p=0.017) が有意に多いことが示された。さらに、ANX2 高発現 TNC 高発現群は術後の無再発生存および全生存期間が有意に短く、予後不良であることが分かった(左図)。

これらの研究結果から、膵癌における ANX2-TNC axis は癌進展機構に深く関わっており、今後の膵癌治療の有望な target であることが示唆された(右図)(Yoneura N, Takano S et al., Int J Mol Med 2018)。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Yokota T, Takano S, Yoshitomi H, Kagawa S, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Suzuki D, Sakai N, Nojima H, Mishima T, Nakadai E, Ohtsuka M. Successful treatment of a locally advanced unresectable pancreatic cancer patient with interstitial pneumonitis by conversion surgery following gemcitabine plus nab-paclitaxel chemotherapy: A case report. *Mol Clin Oncol.*、査読有、10 巻、2019、419-424、doi: 10.3892/mco.2019.1807.
- ② Nakada S, Kuboki S, Nojima H, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Takano S, Miyazaki M, Ohtsuka M. Roles of Pin1 as a Key Molecule for EMT Induction by Activation of STAT3 and NF- $\kappa$ B in Human Gallbladder Cancer. *Ann Surg Oncol.*、査読有、26 巻、2019、907-917、doi: 10.1245/s10434-018-07132-7.
- ③ Yoneura N, Takano S, Yoshitomi H, Nakata Y, Shimazaki R, Kagawa S, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Miyazaki M, Ohtsuka M. Expression of annexin II and stromal tenascin C promotes epithelial to mesenchymal transition and correlates with distant metastasis in pancreatic cancer.、*Int J Mol Med.*、査読有、42 巻、2018、821-830、doi: 10.3892/ijmm.2018.3652.
- ④ Okura R, Takano S, Yokota T, Yoshitomi H, Kagawa S, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Suzuki D, Sakai N, Nojima H, Mishima T, Miyazaki M, Ohtsuka M. Conversion surgery with gemcitabine plus nab-paclitaxel for locally advanced unresectable pancreatic cancer: A case report. *Mol Clin Oncol.*、査読有、9 巻、2018、389-393、doi: 10.3892/mco.2018.1688.
- ⑤ Nishino H, Takano S, Yoshitomi H, Suzuki K, Kagawa S, Shimazaki R, Shimizu H, Furukawa K, Miyazaki M, Ohtsuka M. Grainyhead-like 2 (GRHL2) regulates epithelial plasticity in pancreatic cancer progression.、*Cancer Med.*、査読有、6 巻、2017、2686-2696、doi: 10.1002/cam4.1212.
- ⑥ Suzuki K, Takano S, Yoshitomi H, Nishino H, Kagawa S, Shimizu H, Furukawa K, Miyazaki M, Ohtsuka M. Metadherin promotes metastasis by supporting putative cancer stem cell properties and epithelial plasticity in pancreatic cancer.、*Oncotarget.*、査読有、8 巻、2017、66098-66111、doi: 10.18632/oncotarget.19802.
- ⑦ Satoh M, Takano S, Sogawa K, Noda K, Yoshitomi H, Ishibashi M, Mogushi K, Takizawa H, Otsuka M, Shimizu H, Miyazaki M, Nomura F. Immune-complex level of cofilin-1 in sera is associated with cancer progression and poor prognosis in pancreatic cancer.、*Cancer Sci.*、査読有、108 巻、2017、795-803、doi: 10.1111/cas.13181.
- ⑧ Sogawa K, Takano S, Iida F, Satoh M, Tsuchida S, Kawashima Y, Yoshitomi H, Sanda A, Kodera Y, Takizawa H, Mikata R, Ohtsuka M, Shimizu H, Miyazaki M, Yokosuka O, Nomura F. Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein  $\alpha$ -chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags.、*Br J Cancer.*、査読有、115 巻、2016、949-956、doi: 10.1038/bjc.2016.295.

[学会発表] (計 2 件)

① Shigetsugu Takano, Shingo Kagawa, Naoko Yoneura, Hideyuki Yoshitomi, Fumio Nomura, Masayuki Ohtsuka., Annexin II plays diverse functions during pancreatic cancer progression., 第77回 日本癌学会学術総会、2018年

② 米浦直子、高野重紹、賀川真吾、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷吏、久保木知、鈴木大亮、酒井望、野島広之、大塚将之、Annexin II 発現による抗癌剤耐性、および癌-間質細胞間相互作用による浸潤転移機構の解明、日本がん転移学会、第26回 日本がん転移学会、2017年

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉富 秀幸

ローマ字氏名：(YOSHITOMI, Hideyuki)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：准教授

研究者番号：60375631

研究分担者氏名：佐藤 守

ローマ字氏名：(SATO, Mamoru)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任准教授

研究者番号：20401002

研究分担者氏名：賀川 真吾

ローマ字氏名：(KAGAWA, Shingo)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号：90507302

研究分担者氏名：宮崎 勝

ローマ字氏名：(MIYAZAKI, Masaru)

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：大学病院

職名：教授

研究者番号：70166156

研究分担者氏名：酒井 望

ローマ字氏名：(SAKAI, Nozomu)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号：70436385

※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。