

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09457

研究課題名(和文)膵臓癌の癌微小環境構成細胞の解明：転移制圧を目指して

研究課題名(英文) Analysis of cancer-associated cells in the microenvironment of pancreatic cancer : Aim to suppress metastasis

研究代表者

末次 淳 (Suetsugu, Atsushi)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30340079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：癌は、原発巣及び転移巣において微小環境を形成し、癌組織内は癌細胞のみでなく、周囲の癌関連細胞が重要な役割を果たしている。転移巣において、癌細胞周囲の癌関連線維芽細胞や腫瘍関連マクロファージの重要性が明らかにされた。今回、膵臓癌内のエクソソームが、マクロファージに入り込み、転移形成において重要な役割を果たしていることが確かめられた。また、脂肪肝において転移性肝癌が抑制され、癌関連線維芽細胞の減少と関連があることを証明した。癌形成及び転移時において、癌細胞と周囲の細胞間のコミュニケーションは必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界中において膵臓癌増加は現代社会において大きな問題であり、抗線維化・抗癌薬の確立は、今後の非常に重要な課題である。膵臓癌発生・転移の段階で抗線維化・発癌予防を開発することは、非常に魅力的である。つまり癌形成・転移において中心的役割を果たす癌関連線維芽細胞を解明することで、転移を制圧し臨床の場に新たな治療展開を提示する可能性を秘めていることがこの研究の特色と意義である。本研究において、膵臓癌細胞内のエクソソームの関与と癌関連線維芽細胞の重要性を証明し、これらを制圧することが転移抑制の可能性があり、今後の臨床的発展性が強く期待できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells form a tumor microenvironment in primary tumor and metastasis, and not only cancer cells but also cancer-associated cells play an important role in the tumor. In metastasis, the importance of cancer-associated fibroblasts and tumor-associated macrophages cells was clarified. In this study, tumor-derived exosomes were observed in bone marrow cells, especially in macrophages. In addition, liver metastasis was suppressed in a fatty liver model. It was proved to be associated with a decrease in cancer-associated fibroblasts. The communication between cancer cells and cancer-associated cells is necessary in cancer formation and metastasis.

研究分野：消化器内科

キーワード：膵臓癌 癌微小環境 癌関連線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、癌に対する化学療法・分子標的薬など様々な治療法が開発され、生存率が延長されているが満足できるものでない。癌は、原発巣及び転移巣において微小環境を形成し、その癌組織内は癌細胞のみでなく、周囲の癌関連細胞が重要な役割を果たしていることが報告されている。今まで、人由来大腸癌細胞の肝転移や膵癌組織をマウスに移植し、蛍光蛋白を用いて癌微小環境を形成する細胞をシングルレベルで画像化し、癌細胞周囲の癌関連細胞特に癌関連線維芽細胞や腫瘍関連マクロファージの重要性を証明した。癌形成及び転移時において、癌細胞と周囲の細胞間のコミュニケーションが大きな役割を果たしていると考えられる。また近年、細胞が分泌するエンドソーム由来の小胞顆粒であるエクソソームの中に、遺伝物質である non-coding RNA が発見され、細胞及び個体間においてメッセンジャーとしての役割を果たしていることが報告されている。近年、癌細胞が自らの miRNA をエクソソームに封入して分泌していることが明らかになり、癌細胞が自らの増殖及び転移において細胞内外の輸送システムを利用していると考えられ、実際乳がん細胞や大腸癌細胞において転移の際にエクソソームが転移巣を形成するとき、転移前に特に線維芽細胞内に入り込み、転移する環境を形成することを視覚的に証明してきた。

膵臓癌は、本邦で増加しつつに男性で癌死亡疾患の中で第4位となり、膵臓癌の研究は急務であると言える。膵臓癌は再発・転移しやすいことと関係し、特に膵臓癌はまだ小さい段階から膵臓の周囲に浸潤するため、再発率は非常に高くなる。つまり手術で病変をすべて切除できたように見えても、実は画像検査上とらえきれない癌細胞が残っていたり、既に他臓器に転移していたりすることが大半である。時間の経過とともに癌が成長して、再発や転移という形で発見されることになる。今回、膵癌細胞と癌周囲細胞の関わりを解明し、再発・転移をいかに押さえ込めるか膵臓癌モデルマウスを作成し解析する。実臨床では画像検査上とらえきれない癌細胞が残っていたり、既に他臓器に転移していたりすることが大半であるが、マウスを用いて手術で病変をすべて切除し蛍光顕微鏡を利用することでその部分は解決できる。また癌関連線維芽細胞が癌組織形成をしているため、これらの線維芽細胞に注目することは、癌関連線維芽細胞を制圧することで癌組織の縮小・消失・転移抑制を狙える可能性もあると考える。こうした背景の中、癌形成時の癌細胞及び癌関連線維芽細胞のエクソソームとの関連を解明することは重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目標は、 癌原発巣における癌細胞と癌微小環境構成細胞の役割について明らかにし、 癌転移時における癌細胞および癌構成にて中心的役割を担う癌関連線維芽細胞の性質を解明することであり、最終的には、 原発巣および転移性癌の癌細胞および癌形成周囲細胞の相互作用を解明し、有益な膵癌原発巣および転移における支持する癌関連線維化細胞を抑えることを目指すことにある。

3. 研究の方法

(1) RFP: red fluorescent protein を強制発現させた癌細胞を GFP: green fluorescent protein -Tg マウスの皮下に注射し皮下腫瘍を作成し、腫瘍形成後皮下腫瘍を採取し、細胞を分散させて培養する。培養細胞を回収しヌードマウスの脾臓内に移植し、癌転移モデルを作成する。移植後14日目にマウスを解剖し、移植部と転移巣にできた腫瘍細胞の観察をする。さらに、これらの腫瘍塊の組織培養を行い、転移腫瘍巣を構成する細胞の解析を行う。

(2) 癌細胞由来のエクソソームを可視化・追跡するために RFP を導入したヒト膵癌細胞株に GFP で標識した CD63 を遺伝子導入した細胞株 (Mia-PaCa-2-RFP/GFP-Exo) を樹立する。マウスの脾臓に Mia-PaCa-2-RFP/GFP-Exo を移植し膵癌転移マウスモデルを作成する。4週間後にマウスを解剖し、脾臓、肝臓、肺、骨髄を採取し、各臓器を実体顕微鏡にて観察しさらに組織培養を行ったのち細胞・組織内における癌細胞由来のエクソソームの局在・分布を解析する。

4. 研究成果

(1) 腫瘍内は、腫瘍細胞や血球系細胞や線維芽細胞などの間質細胞に加え、GFP と RFP の両方を同時に発現する細胞が観察された。マウスの脾臓に移植したところ、肝臓および骨髄への転移と

腹水貯留が認められた。これらの転移腫瘍塊内には、GFP 由来の間質細胞と、GFP と RFP 共陽性の細胞が認められた。また肝臓の癌転移が認められない部位の一部に GFP の間質細胞のみが集積した部位が観察され、この部位の細胞を培養したところ培養初期は間質細胞のみが存在したが、15 日目以降に腫瘍細胞の出現と増殖を認めた。

(2) Mia-PaCa-2-RFP/GFP-Exo を BALB-c/nu-nu マウスに脾注し、4 週間後に解剖したところ脾臓における腫瘍形成と多発肝転移を確認したが、肺や骨髄には明らかな癌転移を認めなかった。同マウスの各種臓器の組織・細胞培養を行い、エクソソームの局在と癌細胞との関連を観察したところ、転移性腫瘍を認めた肝臓では、転移前の脾臓の腫瘍と同様に転移した癌細胞と肝臓内のクッパー細胞内に癌細胞由来のエクソソームが発現・含有されていることが確認された。また、腫瘍形成を認めなかった肺においても、一部のマクロファージ内に癌細胞由来のエクソソームが含有されていることが確認された。さらに骨髄においても、癌細胞は認めないものの癌細胞由来のエクソソームが多数の骨髄細胞内に含有されている様子が観察され、特にマクロファージ内においてより dominant に取り込まれていることが明らかになった。

本研究で、癌転移巣では原発由来のマクロファージ、血管内皮細胞、線維芽細胞などの間質細胞が認められ、特に癌関連線維芽細胞が転移先で niche を形成することによって癌細胞の転移能を制御している可能性が考えられた。また、転移巣の細胞の一部には GFP と RFP の両方の蛍光タンパクを発現する細胞が観察され、このような細胞が癌細胞と間質細胞の細胞融合によって生じるとともに、癌の増殖能や転移能の制御に関与している可能性が示唆された。

また、癌の転移過程における癌細胞由来のエクソソームの拡がりを同時かつ異所性（多臓器）に可視化することで、全身の細胞における同エクソソームの発現・含有状態を系統的に解析できた。今回、マウス膵癌肝転移モデルにおいて、癌細胞由来のエクソソームが転移先の腫瘍細胞内に発現・含有されているだけでなく、癌微小環境に存在し免疫細胞として癌周囲細胞を形成するクッパー細胞内に多数存在していることを証明した。さらに、癌細胞由来のエクソソームが、肉眼的には転移を認めない肺内や骨髄内のマクロファージに移行し含有されていることも明らかにした。癌細胞由来のエクソソームが前転移 niche を形成する上で、特に癌周囲細胞の構成因子の一つであるクッパー細胞やマクロファージを標的細胞としている可能性を強く示唆するものである。

マウス膵癌肝転移モデルを用いて、癌細胞由来のエクソソームが転移先の癌周囲細胞だけでなく、非転移先や骨髄内のマクロファージをはじめとする免疫細胞に発現・含有されることを蛍光タンパク質で標識する技術を用いて、同一体内モデルで可視化した。ダイナミックな体内動態を経た癌細胞由来のエクソソームが、癌転移において果たす役割を解析する上で有用である。癌細胞由来のエクソソームの動態・分布・機能に関する研究を推進することで、癌の転移・浸潤メカニズムの解明、さらには診断や創薬の研究に応用されていくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Suetsugu A, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Hoffman RM.	4. 巻 38
2. 論文標題 Visualizing the tumor microenvironment by color-coded imaging in orthotopic mouse models of cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 1847-1857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura M, Suetsugu A, Hasegawa K, Satake T, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Hoffman RM.	4. 巻 38
2. 論文標題 Color-coded imaging distinguishes cancer cells, stromal cells, and recombinant cancer-stromal cells in the tumor microenvironment during metastasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4417-4423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12743.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Satake T, Suetsugu A, Nakamura M, Hasegawa K, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Hoffman RM.	4. 巻 38
2. 論文標題 Differential organ-targeting and cellular characteristics of metastatic human pancreatic cancer cell lines in mouse models.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 1927-1935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12430	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Satake T, Suetsugu A, Nakamura M, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Hoffman RM.	4. 巻 38
2. 論文標題 Color-coded imaging of the circulating tumor cell microenvironment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 5635-5638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12898.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Imai K, Takai K, Watanabe S, Hanai T, Suetsugu A, Shiraki M, Shimizu M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Sarcopenia impairs prognosis of patients with hepatocellular carcinoma: The role of liver functional reserve and tumor-related factors in loss of skeletal muscle volume.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 pii: E1054.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu9101054.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hanai T, Shiraki M, Watanabe S, Kochi T, Imai K, Suetsugu A, Takai K, Moriwaki H, Shimizu M.	4. 巻 47
2. 論文標題 Sarcopenia predicts minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 1359-1367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.12873.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa K, Suetsugu A, Nakamura M, Matsumoto T, Aoki H, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Hoffman RM.	4. 巻 37
2. 論文標題 Imaging the role of multinucleate pancreatic cancer cells and cancer-associated fibroblasts in peritoneal metastasis in mouse models.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 3435-3440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura M, Suetsugu A, Hasegawa K, Matsumoto T, Aoki H, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Hoffman RM.	4. 巻 118
2. 論文標題 Genetic recombination between stromal and cancer cells results in highly malignant cells identified by color-coded imaging in a mouse lymphoma model.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 4216-4221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.26068.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura M, Suetsugu A, Hasegawa K, Matsumoto T, Aoki H, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Hoffman RM.	4. 巻 37
2. 論文標題 Choline-deficient-diet-induced fatty liver is a metastasis-resistant microenvironment.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 3429-3434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawaguchi K, Murakami T, Suetsugu A, Kiyuna T, Igarashi K, Hiroshima Y, Zhao M, Zhang Y, Bouvet M, Clary BM, Unno M, Hoffman RM.	4. 巻 8
2. 論文標題 High-efficacy targeting of colon-cancer liver metastasis with salmonella typhimurium A1-R via intra-portal-vein injection in orthotopic nude-mouse models.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 19065-19073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.12227.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuura K, Suetsugu A, 他44名 Japanese Genome-Wide Association Study Group for Viral Hepatitis.	4. 巻 152
2. 論文標題 Genome-wide association study identifies TLL1 variant associated with development of hepatocellular carcinoma after eradication of hepatitis C virus infection.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1383-1394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2017.01.041.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 末次 淳 Robert M. Hoffman 清水雅仁
2. 発表標題 原発巣及び転移巣における癌微小環境の意義
3. 学会等名 第39回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Suetsugu A, Matsumoto T, Hasegawa K, Nakamura M, Takahiro Kunisada, Shimizu M, Shigetoyo Saji, Moriwaki H, Michael Bouvet, Robert M. Hoffman.
2 . 発表標題 Heterokaryon formation and nuclear fusion of hybridizing cancer cells visualized in real time by color-coded imaging
3 . 学会等名 109th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Nakamura M , Suetsugu A, Satake T, Hasegawa K, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Robert M. Hoffman.
2 . 発表標題 Metastasis-resistant fatty liver induced by a choline-deficient-diet
3 . 学会等名 109th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Nakamura M , Suetsugu A, Shimizu M.
2 . 発表標題 Fatty liver induced by a choline-deficient-diet suppress liver-metastasis.
3 . 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hasegawa K, Suetsugu A, Nakamura M, Matsumoto T, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Bouvet M, HoffmanRM.
2 . 発表標題 Fluorescence-guided surgery in the tumor microenvironment in a syngeneic mouse model of EL-4 lymphoma.
3 . 学会等名 108th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakamura M, Suetsugu A, Hasegawa K, Matsumoto T, Aoki H, Kunisada T, Shimizu M, HoffmanRM
2. 発表標題 Fusion of cancer and stromal cells imaged by color-coded imaging of metastasis.
3. 学会等名 108th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hoffman RM, Suetsugu A, Kiyuna T, Yano S, Bouvet M.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 10
3. 書名 Molecular and Translational Medicine	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	青木 仁美 (Aoki Hitomi) (10550361)	岐阜大学・大学院医学系研究科・講師 (13701)	