

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10694

研究課題名(和文) 膵癌神経浸潤を中心とした癌微小環境における脂質合成・代謝機構の解析

研究課題名(英文) Lipidomic and metabolomic analysis of microenvironment in pancreatic cancer neural invasion

研究代表者

森田 剛文 (Morita, Yoshifumi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60464129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膵組織切除検体を用いた免疫組織化学染色では、Tenascin Cは主にがんの間質部に発現しており、周囲非がん部組織には発現を認めなかった。がん先進部では、Tenascin Cは膵内及び膵外神経の周囲線維性組織に発現していることがわかった。腫瘍先進部における神経周囲のTenascin Cの発現強度と臨床病理学的因子との関連を検証すると、Tenascin C高発現は、術後無再発生存の独立した予後不良因子であった。一方、膵がん神経細胞共培養モデルを用いた検証では、Tenascin Cが豊富な環境において、がん細胞の遊走能増強及び神経細胞の軸索伸長促進作用を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々は、細胞外マトリックス糖タンパク質Tenascin C (TNC)に着目し、膵がんの神経周囲浸潤における役割について検証した。膵がん神経周囲浸潤に対するTNCの役割を臨床病理学的及び分子生物学的に検証したものは過去になく、本研究は今後の詳細な膵がん神経周囲浸潤機構解明への大きな一歩になりうる。将来的にはTNCに関連する経路を治療ターゲットとした、膵癌の神経周囲浸潤抑制治療が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We examined immunohistochemical TNC expression in 78 resected PDAC specimens. The relationships between TNC expression and clinicopathological features were retrospectively analyzed. Interactions between cancer cells and nerves with TNC supplementation were investigated using an in vitro coculture model with PDAC cell line and DRG. Tenascin C expression was predominant in perineural sites at the invasive tumor front. High perineural TNC expression in 30 patients (38%) was associated with perineural invasion, pathological T stage  $\geq 3$ , and postoperative locoregional recurrence. High TNC expression was independently associated with postoperative, poor recurrence-free survival by multivariate analysis. In the in vitro coculture model, a TNC-rich matrix enhanced both PDAC cell colony extensions toward nerves and DRG axonal outgrowth toward cancer cell colonies, whereas TNC did not affect axonal outgrowth or cancer cell proliferation in separately cultured DRG and PDAC cells.

研究分野：消化器外科学 肝胆膵外科

キーワード：膵癌 神経浸潤 Tenascin C DRG EMT

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年における診断・治療技術の発展にも関わらず、膵癌は依然予後不良な疾患である。早期発見が難しいため切除率は30~40%程度と低く、また肉眼的に根治切除可能だった症例でもその平均生存期間は24ヶ月程度と報告されている(Ueno et al. Br J Cancer. 2009)。以前から、膵癌では高率に神経浸潤を認めることが報告されており、予後との関連が指摘されている(Liebig C et al. Cancer. 2009)。神経浸潤は、前立腺癌、頭頸部癌、胃癌、大腸癌や胆道癌などでも予後不良因子として報告されており、癌細胞の直接浸潤・リンパ管浸潤・血管浸潤につぐ第4の浸潤メカニズムとして、非常に注目されている(Amit M et al. Nat Rev Cancer. 2016)。神経浸潤にはnerve growth factor (NGF)などの各種成長因子やtropomyosin receptor kinase A (TRKA)などの受容体が関与していることが報告されているものの(Bapat AA et al. Nat Rev Cancer. 2011)、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。癌が進展(浸潤)していく過程では、癌細胞が様々な機能を獲得するだけでなく、周囲微小環境を自身にとって有利なものに変えていくことが必要とされている。神経浸潤においても、癌細胞と神経細胞の細胞間相互作用だけではなく、線維芽細胞なども含めた癌周囲微小環境の役割が重要視されている(Demir IE et al. Front Physiol. 2012)。

### 2. 研究の目的

膵癌に特徴的な神経周囲浸潤の分子メカニズムはいまだ不明な点が多い。今回我々は、細胞外マトリックス糖タンパク質 Tenascin C に着目し、浸潤性膵癌(PDAC)の神経周囲浸潤における役割について検証した。

### 3. 研究の方法

本研究は浜松医科大学臨床研究倫理委員会の承認を得て実施した(17-323)。

ヒト切除検体を用いた免疫組織化学染色:

術前化学療法を受けず、PDACと病理診断されたヒト膵組織切除検体(n = 78)に対して、抗マウス Tenascin C 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、その発現強度と臨床病理学的因子との関連を検証した。

動物・細胞株を用いた In vitro 膵がん 神経細胞共培養モデルの作成:

マウスを用いた研究は浜松医科大学動物実験委員会の承認を得て実施した(20160044)。

ヒト膵がん細胞株(PANC-1, MIA PaCa-2)と、新生児マウスから採取した後根神経節(Dorsal Root Ganglion: DRG)を用いた in vitro 膵がん 神経細胞共培養モデルを作成し、Tenascin C purified protein (ヒト神経膠芽腫由来)添加による膵がん細胞株やDRGの挙動変化を観察した。また、がん細胞における上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal-transition: EMT)のマーカー発現の変容を蛍光免疫組織化学染色にて観察した。

### 4. 研究成果

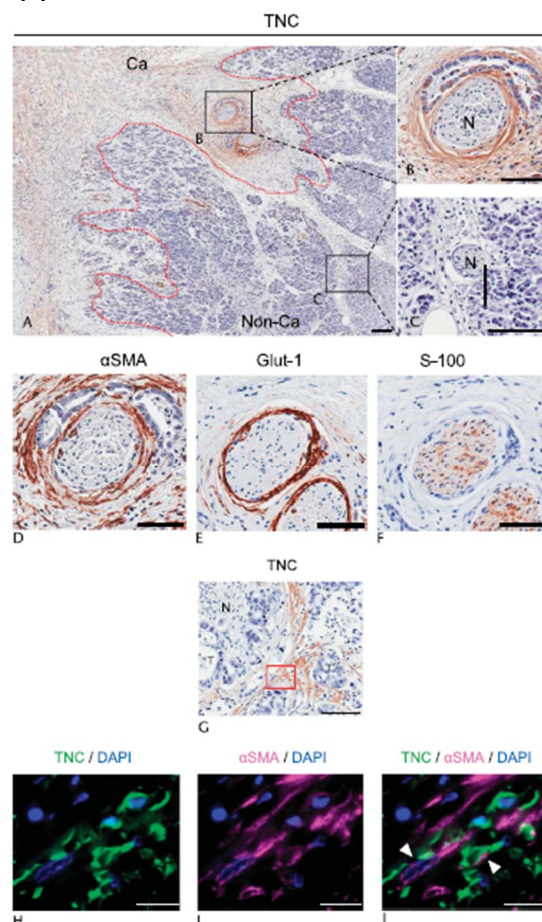
#### [結果]

ヒト膵組織切除検体を用いた免疫組織化学染色では、Tenascin C は主にがんの間質部に発現しており、周囲非がん部組織には発現を認めなかった。がん先進部では、Tenascin C は膵内及び膵外神経の周囲線維性組織にリング状に発現していることがわかった。この発現は、活性化線維芽細胞フィブロブラストのマーカーである平滑筋アクチン( $\alpha$ SMA)及び神経周膜マーカーである Glut1 の発現部位と類似していた(図1)。

腫瘍先進部における神経周囲の Tenascin C の発現強度を高(n = 48) / 低(n = 30)の2群に分類し、臨床病理学的因子との関連を検証すると、高発現群は神経周囲浸潤陽性(p = 0.001)、病理学的T因子 3 (p = 0.023)及び局所領域再発(p = 0.002)と有意な相関を認めた(Table2, Table3)。また、多変量解析において、Tenascin C 高発現は、術後無再発生存の独立した予後不良因子であった(p = 0.045)(図2)。

一方、In vitro 膵がん 神経細胞共培養モデルを用いた検証では、Tenascin C が豊富な環境において、神経細胞方向へのがん細胞の遊走能増強及びがん細胞方向への神経細胞の軸索伸長促進作用を認めた(図3)。さらに、がん細胞の遊走先進部において、間葉系マーカーである Vimentin の発現上昇を認めた(図4)。

図1



**TABLE 2.** Univariate and Multivariate Analyses of Prognostic Factors Associated With Recurrence-Free Survival

Variables	n	5 y, %	Univariate		Multivariate	
			Hazard Ratio (95% CI)	P	Hazard Ratio (95% CI)	P
Age, y						
<69	38	26.7				
≥69	40	17.1	1.044 (0.608–1.795)	0.875		
Sex						
Male	37	24.6				
Female	41	21.6	1.193 (0.696–2.045)	0.522		
CA 19–9, U/mL						
<77	38	35.4				
≥77	40	11.2	1.983 (1.146–3.432)	0.01†	1.205 (0.649–2.235)	0.555
Location						
Body/tail	22	41.3				
Head	56	16.9	1.921 (0.987–3.737)	0.055		
UICC grade						
G1/G2	74	23.8				
G3	4	0	2.258 (1.324–3.852)	0.003	2.230 (1.203–4.136)	0.011
Lymphatic invasion						
Absent	49	30.3				
Present	29	9.6	2.335 (1.359–4.013)	0.002	1.612 (0.857–3.031)	0.138
PNI						
Absent	24	53.5				
Present	54	8.3	3.689 (1.837–7.408)	<0.001	3.532 (1.637–7.618)	0.001
UICC pT						
1,2	8	66.7				
3,4	70	17.8	5.172 (1.254–21.322)	0.023	2.292 (0.506–10.380)	0.282
UICC pN						
0	23	41.2				
1,2	55	14.3	2.825 (1.447–5.515)	0.002	1.001 (0.126–7.930)	0.999
UICC pStage						
≤IIA	22	43.1				
≥IIB	56	14.0	3.080 (1.538–6.168)	0.001	2.742 (0.322–23.338)	0.356
Curability						
R0	63	27.2				
R1	15	6.7	2.023 (1.098–3.729)	0.024	0.776 (0.361–1.665)	0.514
TNC expression						
Low	48	39.2				
High	30	0	2.432 (1.462–4.387)	0.001	2.202 (1.019–4.758)	0.045
αSMA expression						
Low	47	35.9				
High	31	4.8	1.889 (1.098–3.250)	0.022	0.829 (0.357–1.926)	0.663

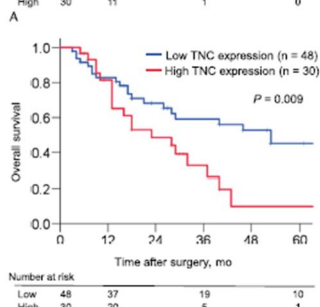
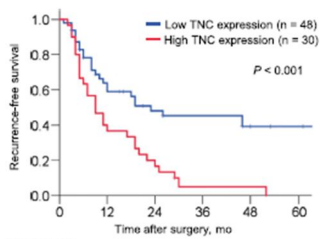
CI indicates confidence interval; G, histological grade; N, nodal status; p, pathological; R0, no residual tumor; R1, microscopic residual tumor; T, primary tumor; UICC, Union for International Cancer Control.

**TABLE 3.** Correlations Between TNC Expression in Perineural Sites With Recurrence Pattern

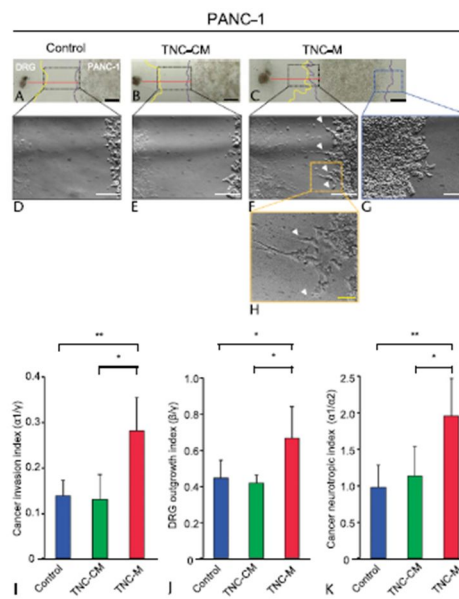
Recurrence Pattern	TNC Expression		P
	Low (n = 29)	High (n = 37)	
Locoregional	10	29	0.002
Distant (LN, liver, lung, bone)	12	4	
Peritoneal	7	4	

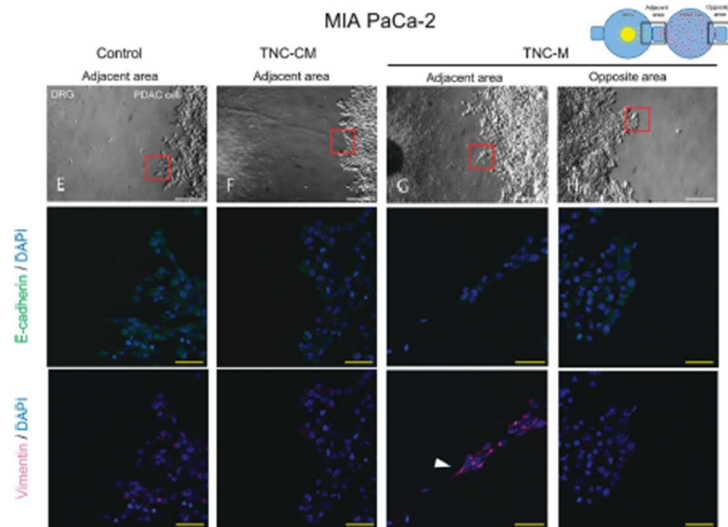
Numbers include overlapping cases.

2



3





[ 考察 ]

ヒト膵組織切除検体における免疫組織学的染色で、Tenascin C 発現と SMA 陽性細胞の発現部位が類似していたことは、がん細胞によって活性化された神経周膜細胞や膵星細胞 (Pancreatic stellate cell) などの間質系細胞が、周囲に Tenascin C を分泌し、がん細胞 神経細胞間の相互作用を増強することで神経周囲浸潤を促進させる、という機構を示唆した。

In vitro 膵がん 神経細胞共培養モデルを用いた機能解析では、Tenascin C 添加によるがん細胞 神経細胞間の双方向親和性の増強が証明された。また、神経方向へ遊走するがん先進部に Vimentin 発現上昇を認めたことから、がんの神経周囲浸潤には、がん細胞の EMT が関与している可能性が示唆された。

膵がん神経周囲浸潤に対する Tenascin C の役割を臨床病理学的及び分子生物学的に検証したものは過去に無く、本研究は今後の詳細な膵がん神経周囲浸潤機構解明への大きな一歩になりうる。

[ 結論 ]

PDAC の神経周囲浸潤における Tenascin C の役割について検証した。将来的には Tenascin C に関連する経路を治療ターゲットとした、PDAC の神経周囲浸潤抑制治療が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Satoru Furuhashi, Takanori Sakaguchi, Tomohiro Murakami, Mayu Fukushima, Yoshifumi Morita, Koji Ikegami, Hirotoishi Kikuchi, Mitsutoshi Setou, Hiroya Takeuchi	4. 巻 49
2. 論文標題 Tenascin C in the Tumor-Nerve Microenvironment Enhances Perineural Invasion and Correlates With Locoregional Recurrence in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 424-454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000001506	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古橋 暁
2. 発表標題 膵癌神経周囲のテネシンC強発現は、局所再発での予後不良因子になる
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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	坂口 孝宣 (Sakaguchi Takanori) (70313955)	浜松医科大学・医学部・准教授  (13802)	
研究分担者	平出 貴乗 (Hiraide Takanori) (70780386)	浜松医科大学・医学部・特任助教  (13802)	