

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10702

研究課題名(和文) 膵癌転移微小環境におけるexosome誘導性pre-niche形成機序解明と改変

研究課題名(英文) Elucidating the mechanisms of pre-metastatic niche formation by pancreatic cancer exosomes

研究代表者

三好 圭 (MIYOSHI, Kei)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70755272

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)：本研究の目的は膵癌肝転移を誘導するエクソソームの同定、及び膵癌肝転移に関する因子や転移先の微小環境改変メカニズムを明らかにすることである。膵癌患者から採取した膵液からエクソソームを抽出し、膵癌由来エクソソームに特異的なmiRNAの候補を同定した。また、肝転移マウスモデルを作成し、膵癌細胞のCD110高発現が肝転移、予後不良と関連していることを明らかにした。微小環境中の転移臓器指向性を有するエクソソームの候補や高い増殖・浸潤能を持つ膵星細胞の集団の解析は、臓器特異的な転移誘導機序の解明に役立つ可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は早期に転移を形成することで知られ、転移のメカニズム解明は治療法の確立にも必須である。本研究では膵癌由来エクソソームの同定、また肝転移形成のメカニズムに関して原発巣のみならず転移先の微小環境因子から明らかにすることで、癌微小環境制御という観点から既存の治療と異なるアプローチが期待できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify the exosomes that induce liver metastasis of pancreatic cancer, and to clarify the factors involved in liver metastasis of pancreatic cancer and the mechanism of microenvironment modification of the metastasis destination. Exosomes were extracted from pancreatic juice collected from pancreatic cancer patients, and candidates for miRNA specific to pancreatic cancer-derived exosomes were identified. In addition, we constructed a mouse model with liver metastasis and clarified that high CD110 expression in pancreatic cancer cells is associated with liver metastasis and poor prognosis. These data support that reprogramming the microenvironment in primary and metastatic niche might be a promising approach for new therapy of pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 エクソソーム 肝転移 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

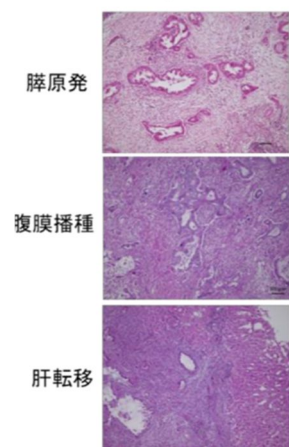
膵癌の5年生存率は5%と低く、新規膵癌治療法の確立は社会的急務である。高い浸潤・転移能と治療抵抗性が膵癌の難治性に寄与するが、従来の腫瘍細胞のみを対象とした研究からは革新的な治療法の開発に至らず、現在、癌微小環境を含めた研究・治療戦略を立案する視点が重要となっている。

膵癌の病理学的特徴として豊富な細胞外基質を伴う間質増生 (desmoplasia) があり、癌細胞からの刺激で活性化された膵星細胞 (pancreatic stellate cells: PSCs) によって形成される (Bachem, Gastroenterology, 2005)。desmoplasia は癌間質相互作用により膵癌細胞の局所浸潤能を高める (Bhowmick, Nature, 2004) が、desmoplasia と転移形成機序の関連性についての報告はほとんどない。一方、膵癌と同様に豊富な細胞外基質を伴う乳癌での検討で、原発巣間質シグナルで予め選択された特定の癌細胞クローンが、原発巣と類似した間質シグナルの特徴を持つ骨髄で生存しやすいという乳癌骨転移形成機序が明らかにされた (Zhang, Cell, 2013)。また、膵癌原発巣と転移巣の全エキソン解析から各標的臓器の転移巣のクローンと類似した遺伝子変異の特徴をもつクローンは原発巣にも存在することが明らかになっており (Yachida, Nature, 2010)、原発巣で進化を遂げて転移能を獲得した特定のサブクローンが標的遠隔臓器に転移することが示唆されている。このように、膵癌では転移癌細胞集団の選択に原発巣の癌微小環境が主体的に関与する可能性がある。

近年、癌転移に関する研究で、VEGFR1 陽性造血系骨髄前駆細胞が前転移ニッチ (pre-metastatic niche) にクラスターを形成することにより、癌細胞が転移する前に転移微小環境を整えるという概念が提唱された (Kaplan, Nature, 2005)。また、膵癌において、膵癌細胞由来エクソソームが、肝での pre-metastatic niche 形成を促進すること (Costa-Silva, Nat Cell Biol, 2015) や、癌細胞由来エクソソームがそこに含まれるインテグリンの発現パターンにより決定された特定の臓器の特定の細胞に取り込まれ、そこで pre-metastatic niche を形成することにより癌細胞の臓器特異的な転移を誘導すること (Hoshino, Nature, 2015) が報告されている。

exosome の内部には様々なタンパクや miRNA が含まれ、細胞間の情報伝達を担っている。癌微小環境内における間質細胞からのエクソソームに着目した報告はなく、その意義は明らかになっていない。そこで、本研究では膵癌周囲に存在する間質細胞が放出するエクソソームに着目し、間質細胞由来のエクソソームを介した癌細胞の臓器特異的な転移誘導機序が存在するのではないかと仮説を立てた。

ヒト膵原発・転移組織での desmoplasia



### 2. 研究の目的

膵癌原発巣の間質において転移能を獲得する特定の細胞集団を同定する。また、膵癌微小環境由来のエクソソームが転移巣の微小環境変化に与える影響を解明する。

### 3. 研究の方法

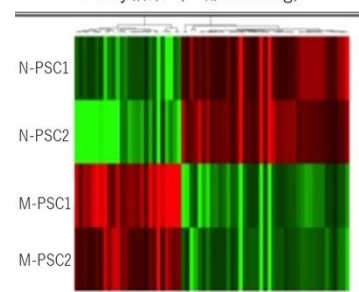
活性化膵星細胞と不活性化膵星細胞の遺伝子発現解析を行い、膵星細胞活性化に関する遺伝子を検討する。また、膵癌患者の膵液中よりエクソソームを抽出し、その機能解析、特に癌間質相互作用や転移先の微小環境誘導能に関する検討を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 活性化膵星細胞群の表面抗原の同定

ヒト膵癌切除組織より樹立した膵星細胞にビタミンAの活性代謝産物であるオールトランス型レチノイン酸 (ATRA) を添加して脂肪滴染色やタンパク発現変化から不活化膵星細胞の樹立を確認した。樹立した不活化膵星細胞と、活性化膵星細胞のマイクロアレイ解析を行い、活性化膵星細胞に比べて不活化膵星細胞では CD38, CD14, CD40 などの表面抗原が高発現していることを確認した。活性化膵星細胞は癌細胞と相互作用して腫瘍浸潤や転移を促進するとの報告があり、特定された表面抗原は他臓器転移への抑制に関与している可能性が示唆された。

Array結果 (一部masking)



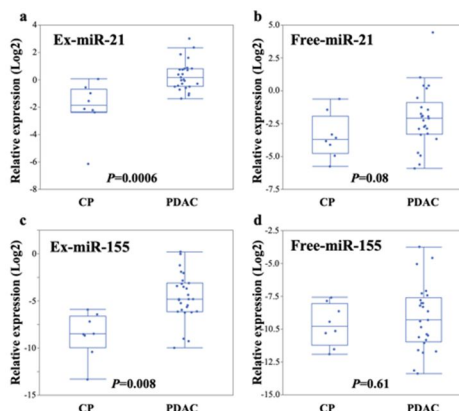
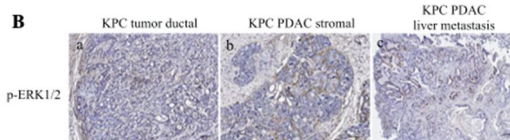
#### (2) 膵星細胞活性化に関わる経路の検討

膵癌原発巣に存在する膵星細胞の活性化が癌間質相互作用を通して膵癌の悪性化に寄与していることはよく知られている。今回は特に転移に関わる膵星細胞の活性化因子を検討するため、膵癌高転移細胞株を作成し、プロテインアレイで発現差のあるタンパクを検討したところ、正常膵癌細胞に比べて ERK1/2 の発現が有意に上昇していた。ERK1/2 は自然発癌マウス、ヒト膵癌組織中においても膵癌細胞並びに癌間質中に発現の上昇が認められた。(次頁上図)膵星細胞を ERK

阻害剤で処理すると IL-6 や MMP-2, MMP-3 などの発現が低下し、 膵星細胞の癌細胞浸潤促進作用も抑制された。

### (3) 膵癌組織由来エクソソームの抽出とその機能解析

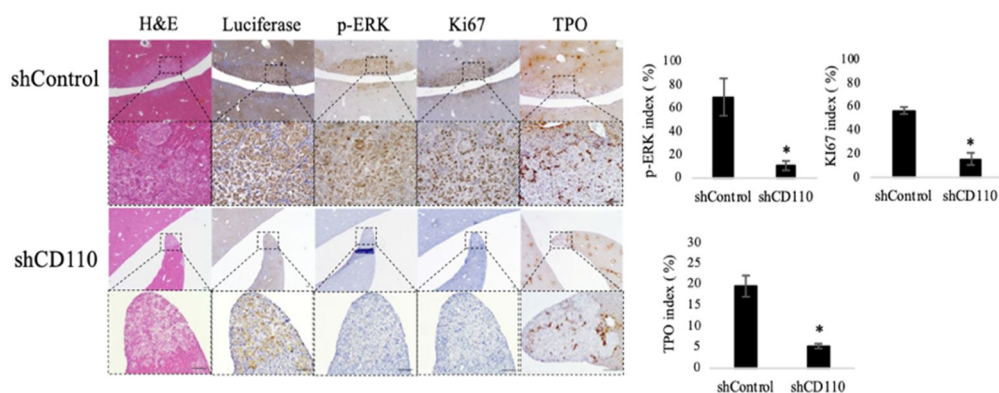
ERCP 下に採取した膵液から超遠心法を用いてエクソソームの抽出を試みた。これを電子顕微鏡下に観察し、小胞の存在と、エクソソーム特異的な CD63 や CD81, TSG101 の発現を確認した。次に膵液中のエクソソームに含まれる microRNA(ex-miR) についてマイクロアレイで網羅的解析を行い、慢性膵炎に比べて膵癌から抽出したエクソソーム中に miR21, miR155 が高発現していた。(右図) 検出されたエクソソームの由来細胞については癌細胞、間質細胞のいずれかは現時点で明らかではないものの、膵癌組織由来のエクソソームから特異的に分泌されるエクソソームの候補を挙げる事ができた。



### (4) 膵癌肝転移関連因子の検討

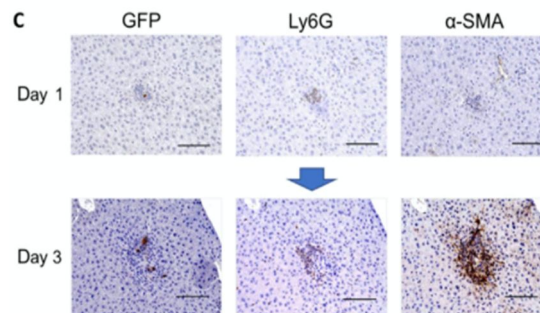
ヒトの膵癌切除標本を用いた病理学的検討において、膵癌細胞の CD110 発現と肝転移の増加、予後不良との関連を明らかにした。膵癌細胞を脾注した肝転移モデルマウスを用いた実験では、膵癌細胞に発現した CD110 が肝細胞に発現した CD110 のリガンド、thrombopoietin (TPO) を介して膵癌細胞の血管外遊出と増殖を促進し、肝転移形成に関与していること、さらにその作用には ERK1/2-MYC シグナル経路が関与していることを明らかにした。

以上より癌細胞・間質細胞の高転移能に関わる因子を複数の実験から明らかにした。



### (5) 転移先微小環境変化に関する検討

最後に、肝転移が成立する前に転移先微小環境中における変化について、微小環境中に豊富に存在している免疫細胞、特に好中球の転移誘導における役割に着目して検討を行った。膵癌細胞を脾注した肝転移モデルマウスを用いた実験では、脾注肝転移モデルでは癌細胞注入後 1 日目から微小転移巣に好中球の集簇がみられたのに続いて、2 日目以降に  $\alpha$ -SMA 陽性の CAFs が認められ、好中球が遠隔臓器に癌関連線維芽細胞の誘導を促進し、肝転移形成を促進している可能性が示唆された。



以上、本研究では癌細胞及び微小環境中の肝転移関連因子、及び癌由来エクソソームの抽出とその特徴について明らかにした。微小環境由来エクソソームの解析、及び転移先の微小環境改変メカニズムに関しては今後引き続き解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Takesue S, Ohuchida K, Shinkawa T, Otsubo Y, Matsumoto S, Sagara A, Yonenaga A, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Toma H, Tominaga Y, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M	4. 巻 56
2. 論文標題 Neutrophil extracellular traps promote liver micrometastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma via the activation of cancer-associated fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 596-605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4951	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 Yan Z, Ohuchida K, Zheng B, Okumura T, Takesue S, Nakayama H, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M	4. 巻 145
2. 論文標題 CD110 promotes pancreatic cancer progression and its expression is correlated with poor prognosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cancer Res Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 1147-1164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-019-02860-z	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 Nakamura S, Sadakari Y, Ohtsuka T, Okayama T, Nakashima Y, Gotoh Y, Saeki K, Mori Y, Nakata K, Miyasaka Y, Onishi H, Oda Y, Goggins M, Nakamura M	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Pancreatic Juice Exosomal MicroRNAs as Biomarkers for Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07269-z	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Guan W, Nakata K, Ohuchida K, Sagara A, Endo S, Ando Y, Yan Z, Matsumoto S, Shinkawa T, Ohtsubo Y, Iwamoto C, Moriyama T, Ikenaga N, Shindo K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2. 発表標題 A Novel Target That Required for Autophagy, Associated With Activation of Pancreatic Stellate Cells, Promotes Pancreatic Cancer Progression
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武居晋、大内田研宙、松本奏吉、新川智彦、大坪慶輝、相良亜希子、米永晃子、関維雨、馮海旻、安藤陽平、岐部晋、木庭遼、中山宏道、 齋子龍、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、永井俊太郎、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ(NET)が肝癌肝転移巣における癌関連線維芽細胞の誘導に与える影響の検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019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	江上 拓哉  (EGAMI Takuya)  (40507787)	九州大学・医学研究院・共同研究員   (17102)	
研究分担者	宮坂 義浩  (MIYASAKA Yoshihiro)  (40507795)	九州大学・医学研究院・共同研究員   (17102)	
研究分担者	大内田 研宙  (OHUCHIDA Kenoki)  (20452708)	九州大学・大学病院・講師   (17102)	