

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10707

研究課題名(和文) 膵癌・膵前癌病変における神経軸索ガイダンス因子CRMP4の機能の解明

研究課題名(英文) Evaluation of the function of CRMP4 in pancreatic cancer and precursor lesions

研究代表者

藪下 泰宏 (Yabushita, Yasuhiro)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80614693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は予後不良な疾患であり、新規治療薬の開発が期待されている。近年、膵癌間質が癌の進展を多面的に促進させ、抗癌剤耐性にも関与している事が実証された。先行研究でCRMP4発現は膵癌における、強力な予後不良因子であり、肝転移とも相関を認めた。また膵炎モデルマウスにおいて、膵炎とCRMP4の関係や膵炎間質におけるCRMP4の発現が確認された。本研究において膵前癌病変モデルを作成することに成功した。またCRMP4発現と前癌病変の進行への関係を明らかにした。CRMP4の関与するシグナル伝達を阻害することが膵上皮内腫瘍性病変の発生と膵癌への発達を防ぐ治療戦略となる可能性があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は早期から周囲臓器への浸潤や遠隔転移を認める特徴がある。浸潤、転移を抑制する治療法が確立されたならば、既存の治療法との相乗効果が見込まれ、治療成績の向上が期待できる。膵癌におけるCRMP4の制御機構を解明することは、膵癌の新規治療薬を開発していく上で極めて重要である。本研究によりCRMP4ノックアウトマウスと、LSL-KrasG12DマウスとPdx1-Creマウスを掛け合わせて膵癌モデルマウスを作成することに成功した。CRMP4ノックアウトマウスを用いた膵癌発癌モデルの報告はなく、世界的に例のない独自の研究である。膵前癌病変、膵癌におけるCRMP4の役割を検証することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer has been an aggressive malignancy. Recently, stroma in tumor is reported to be associated with cancer-cell proliferation, apoptosis, differentiation, and invasion in several cancers. Previously, CRMP4 staining was highly correlated with poor differentiation and liver metastasis. In mouse model, previous study revealed that caerulein-induced pancreatitis augments the expression of CRMP4. In current study, we investigated the role of CRMP4 in pancreatic cancer precursor lesions in gene engineered mouse model. Our results suggested that CRMP4 is significantly associated with initiation and progression of pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科学、腫瘍学

キーワード：膵癌 膵前癌病変 がん微小環境 CRMP4 浸潤 発癌 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は予後不良な悪性腫瘍であり、本邦の膵癌罹患数は、男性では8番目に多く約15600人で男性全癌罹患数の約3.8%を占めている。女性では6番目に多く約13400人で女性全癌罹患数の4.6%を占めている(田中雅夫他,膵臓,2007)。初回診断時で既に手術不能であることが多く、5年生存率は5%以下とされている。切除が可能であったとしても、再発・転移の頻度は高く、悪性腫瘍の中でも特に難治とされている。また、癌細胞を取り巻く間質の存在ゆえ膵癌は極めて高い薬剤抵抗性を有する。膵癌では間質の増生(desmoplasia)が顕著である。間質は癌細胞との相互作用によって癌の進展(増殖、生存、浸潤、転移)を促進させていることが知られている(Bardeesy N et al.: Nature Rev. Cancer, 2, 897, 2002)。間質は癌の微小環境の重要な構成成分であり、癌治療の新たな標的として注目を集めている。

われわれは膵癌切除例の間質を網羅的検索から1498種類 up regulation: 522, down regulation: 976)の蛋白質を同定した。そのうち文献的に悪性疾患との関連が示唆される蛋白質 Collapsin response mediator protein4 (CRMP4)を候補蛋白質として選出した。CRMP4が膵癌細胞自体に強発現していることが確認された。この結果は癌細胞と間質細胞との相互作用を強く示唆する所見であり、膵癌間質の役割を解明していく上で非常に重要な研究成果であると考え、まず膵癌細胞におけるCRMP4の役割を解明することに焦点を絞る事とした。その結果、CRMP4が癌細胞の浸潤能、静脈浸潤、肝転移を促進して膵癌患者の予後を増悪させている。CRMP4は膵癌治療の重要な標的分子であることが明らかとなった(Hiroshima Y, Endo I et al.: Ann Surg Oncol, 2013) <図1>。

また、膵癌の発生機序に関する研究も行った。慢性炎症は広く悪性腫瘍の引き金と考えられている。疫学的にも膵炎は膵癌の重要な危険因子である。そこでわれわれはコレシストキニンアゴニストであるセルレインで膵炎を惹起したモデルマウスの実験系を確立した。In vivoの実験系において、膵炎がCRMP4の発現とリン酸化を増強していることを証明した(Sato S, Endo I et al.: J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2016)<図2>。炎症を契機とした、リンパ球浸潤にCRMP4の発現が関与している。炎症を背景とした膵癌発生にCRMP4の発現が大きく関与していることが示唆される。

Collapsin response mediator proteins (以下 CRMPs)は神経軸索ガイダンス因子 Semaphorine 3A(Sema3A)の下流分子として発見された(Goshima Y, et al.: Nature, 1995)。膵癌におけるCRMP4の役割は未だに解明されていない。神経細胞ではSema3Aが細胞表面の受容体であるNeuropilin 1(NP1)・Plexin A(PlexA)と結合すると、CRMPがPlexAの細胞質内ドメインに結合する。PlexAと結合したCRMPはCDK5やGSK3などを介してリン酸化され、微小管やアクチンの重合、脱重合を制御すると報告されている(Cole AR et al.: J Biol Chem, 2006, Nakamura F et al.: Nat Commun, 2014)。しかし、膵癌においてCRMP4のリン酸化機構や機能は明らかになっていない。

膵前癌病変は、pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)と呼ばれる膵管に発生する腫瘍性病変と考えられている(Hruban RH, et al.: Clin Cancer Res, 6, 2000)。異型度に応じてPanIN-1~3まで存在する。膵の癌化はPanIN-1から上皮内癌に相当するPanIN-3まで段階的に進行し、浸潤癌へ進展する。これまでに膵癌発生過程に関連する遺伝子が明らかになり、また遺伝子改変マウスの解析によって、遺伝子異常が膵癌発生・進展を促進する機序についても徐々に明らかになりつつある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌、膵前癌病変におけるCRMP4のリン酸化をはじめとした制御機構を解明することである。同時に癌細胞-間質細胞間の相互作用におけるCRMP4の役割を明らかにし、新規治療薬の可能性を追求することである。

(1) KrasG12D発現マウスによる膵前癌病変モデルマウスとCRMP4ノックアウトマウスとの交配で得られた、Kras変異CRMP4ノックアウトマウスを比較し膵前癌病変の発達過程を比較する。既に前癌病変の観察には成功している。例数を増やすことと詳細な検討を行う。(2) Kras変異とp53不活化を同時に起こした膵癌モデルマウスと、CRMP4ノックアウトマウスとの交配で得られたKras変異p53不活化CRMP4ノックアウトマウスを比較して遠隔転移(特に肝転移)周囲臓器への浸潤(神経浸潤を含む)を比較検討する。(3) 疾患モデルマウスのCRMP4ノックアウトとCRMP4野生型マウスから各々線維芽細胞初代培養を樹立し、これらの線維芽細胞や培養上清を膵癌細胞と共培養し、膵癌細胞の増殖能、浸潤能の変化を検証していく。

3. 研究の方法

(1) Pdx-CreマウスとLSL-KrasG12Dマウスを交配し、膵特異的にKras変異を起こしたKrasG12Dマウスを作成する。KrasG12D発現マウスによる膵前癌病変モデルマウスとCRMP4ノックアウトマウスとの交配で得られた、Kras変異CRMP4ノックアウトマウスを比較し膵前癌病

変の発達過程を比較する。膵上皮内腫瘍性病変の間質発現した CRMP4 の局在を明らかにするために、膵臓連続切片、線維芽細胞/筋線維芽細胞の最も一般的なマーカーである SMA および T 細胞マーカーである CD3 抗体で染色した。HE 染色像を比較対象とした。SMA と CD3 との連続切片を用いた免疫組織学染色を用いて比較した。

4. 研究成果

(1) 肉眼的病理所見には、CRMP4 野生型マウスおよび CRMP4 ノックアウトともに硬い結節性病変を伴う腫脹した膵臓を認めた。野生型とノックアウトの間に明らかな外観の違いは認めなかった(図 1, A および B)。組織学的検討により、CRMP4 野生型および CRMP4 ノックアウトの膵臓組織に、ヒト PanIN と類似した病理学的病変を認めた(図 1, C および D)。特に、PanIN-2 病変は主に CRMP4 野生型マウスで観察された(図 1C, 表 1)。

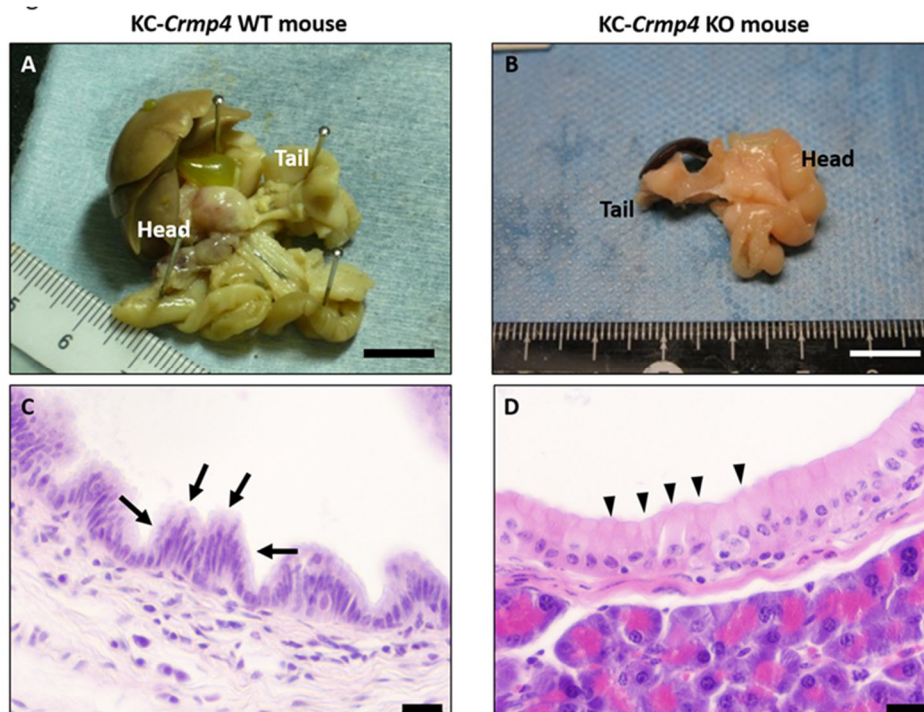


図 1. CRMP4 野生型と CRMP4 ノックアウト膵癌モデルマウスの比較
KC-*Crmp4* WT : CRMP4 野生型マウス、KC-*Crmp4* KO : CRMP4 ノックアウトマウス

表 1 は、両群における膵上皮内腫瘍性病変(Pancreatic intraepithelial neoplasia: PanIN) のグレードを示している。CRMP4 ノックアウトと比較して、CRMP4 野生型マウスでは、high-grade PanIN 病変(PanIN-2 および-3) がより頻繁に観察された(表 1、 χ^2 検定; $P = 0.044$)。Acinar-to-ductal metaplasia は、両方のグループで同様に観察された。観察期間は、CRMP4 野生型マウスで 139.2 ± 41.2 日、CRMP4 ノックアウトで 126.0 ± 23.1 日であった(Student's *t* 検定、 $P = 0.340$)。

Grade of PanIN	KC- <i>Crmp4</i> WT (n = 19)	KC- <i>Crmp4</i> KO (n = 11)
Normal or 1	5 (26.3%)	7 (63.6%)
2 or 3	14 (73.7%)	4 (36.4%)

表 1. CRMP4 野生型と CRMP4 ノックアウト膵癌モデルマウスの膵上皮内腫瘍性病変の進行度

PanIN の間質領域には CRMP4 陽性の紡錘形細胞が観察された(図 2)。CRMP4 の染色パターンは、SMA の染色パターンと類似していたが、CD3 の染色パターンとは類似していなかった。

PanIN-2

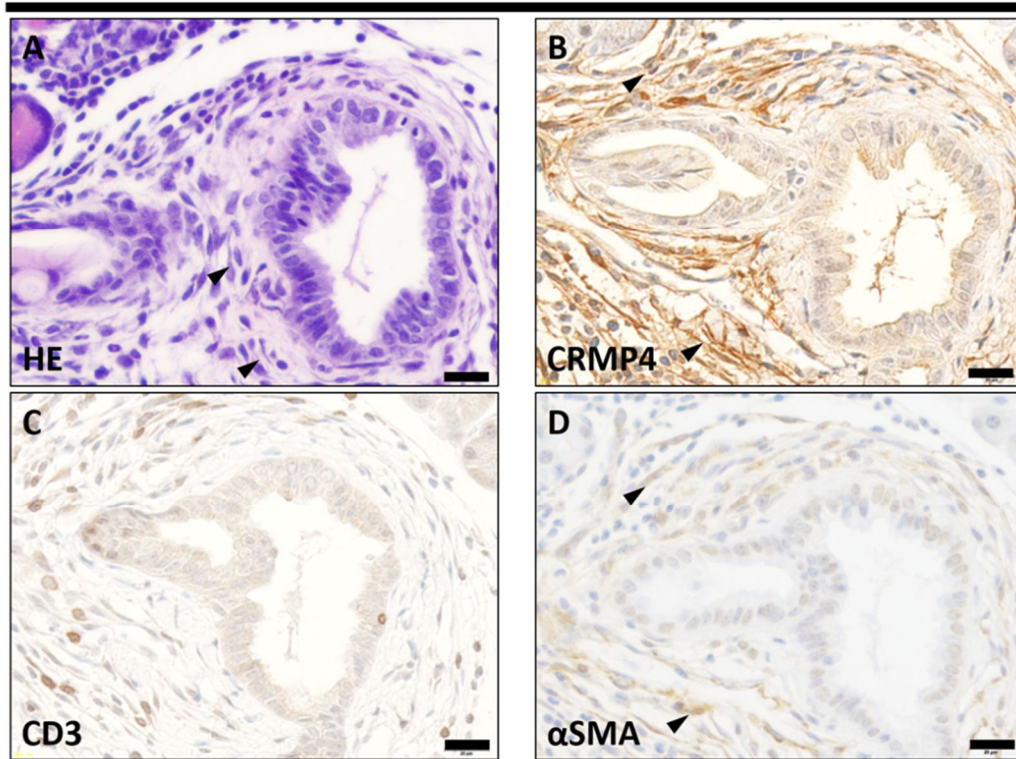


図2. CRMP4 野生型膵癌モデルマウスの膵上皮内腫瘍性病変と間質領域

定量的共局在解析を行ったところ、CRMP4 と SMA または CRMP4 と CD3 の共局在の割合は、それぞれ $39.0 \pm 1.95\%$ 、 $13.7 \pm 0.98\%$ であった ($n = 3$, $P = 0.003$, 図3, AおよびB)。

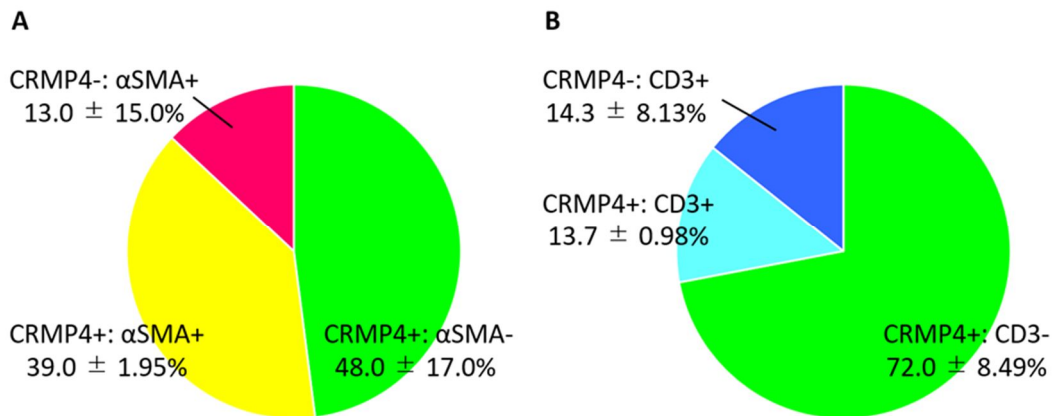


図3. 間質領域における CRMP4 と SMA または CD3 の共局在の評価

これらの結果から、CRMP4 が膵前癌病変モデルマウスにおいて疾患発症に関与していることが明らかになった。間質における CRMP4 発現が膵前癌病変に関与が示唆された。

(2) (3)Kras 変異と p53 不活化を同時に起こした膵癌モデルマウスと、CRMP4 ノックアウトマウスとの交配で得られた Kras 変異 p53 不活化 CRMP4 ノックアウトマウスは作成段階である。条件を整えて比較検討を行う。研究期間内解析は結果を得られなかった。

<引用文献>

Yazawa K, Nakamura F, Masukawa D, Sato S, Hiroshima Y, Yabushita Y, Mori R, Matsuyama R, Kato I, Taniguchi H, Goshima Y, Endo I. Low incidence of high grade pancreatic intraepithelial neoplasia lesions in a Crmp4-gene deficient mouse model of pancreatic cancer. *Translational Oncology*. 2020, Vol. 13, No. 3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Keiichi Yazawa, Fumio Nakamura, Daiki Masukawa, Sho Sato, Yukihiko Hiroshima, Yasuhiro Yabushita, Ryutaro Mori, Ryusei Matsuyama, Ikuma Kato, Hideki Taniguchi, Yoshio Goshima, and Itaru Endo	4. 巻 13
2. 論文標題 Low incidence of high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia lesions in a Crmp4 gene deficient mouse model of pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational oncology	6. 最初と最後の頁 1と9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2020.100746	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 Yasuhiro Yabushita, Ryutaro Mori, Koichi Taniguchi, Ryusei Matsuyama, Takafumi Kumamoto, Kentaro Sakamaki, Kensuke Kubota, Itaru Endo	4. 巻 37
2. 論文標題 Combined analyses of hENT1, TS, and DPD predict outcomes of borderline-resectable pancreatic cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 2465と2476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.11587.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Keiichi Yazawa
2. 発表標題 CRMP4 promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia lesions in gene engineered mouse models
3. 学会等名 30th Annual Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 矢澤 慶一
2. 発表標題 CRMP4は膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)の進行を促進させる
3. 学会等名 第23回日本外科病理学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 矢澤慶一
2. 発表標題 CRMP4は膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)の進行を促進させる
3. 学会等名 第118回日本外科学会 学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢澤慶一
2. 発表標題 CRMP4は膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)の進行を促進させる
3. 学会等名 第74回日本消化器外科外科学会総会
4. 発表年 2019年～2020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	遠藤 格 (Endo Itaru) (60211091)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	
研究分担者	廣島 幸彦 (Hiroshima Yukihiro) (60718021)	横浜市立大学・医学研究科・客員講師 (22701)	
研究協力者	矢澤 慶一 (Yazawa Keiichi)	横浜市立大学 (22701)	消化器・腫瘍外科学