

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07943

研究課題名（和文）膵癌微小環境によるAcinar atrophyの新機序と局所浸潤での役割の解明

研究課題名（英文）Novel mechanism of acinar atrophy by pancreatic cancer microenvironment and its role in local invasion

研究代表者

嶋本 正弥（SHIMAMOTO, Masaya）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00457433

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膵癌微小環境を構成する細胞のheterogeneityに着目し、Acinar atrophyを誘導する責任細胞の同定とその機序を解明し、新たな膵癌局所浸潤の治療法の開発を目的とした。ヒト膵癌組織の腫瘍先進部では、ADM様変化が観察されTGF $\beta$ が陽性であり、これは、原発巣の大きさや予後不良と関連していること、また、遺伝子発現解析により、癌関連ADM、散発性ADM、慢性膵炎ADMの表現型の違いが明らかになった。これらの結果から、ADMを引き起こすメカニズムは組織の微小環境によって異なり、癌関連ADMとAcinar atrophyは膵癌細胞の膵臓実質浸潤に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌進展を抑制するには、癌間質を含めた膵癌微小環境におけるheterogeneityを理解する必要があり、本研究によって癌関連ADMとAcinar atrophyが膵癌細胞の膵臓実質浸潤に寄与していることが示唆された。これまでに膵癌周囲微小環境としての膵腺房細胞の萎縮を誘導する責任細胞や因子に着目した報告はなく、これらの結果は膵癌局所浸潤におけるAcinar atrophyの機序の解明につながるものであり、それらの制御法の開発が新たな膵癌局所浸潤の治療法の開発に結びつくものと期待される。

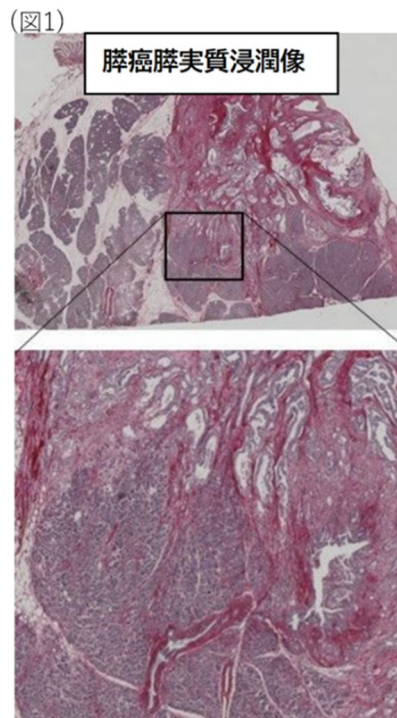
研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the heterogeneity of the pancreatic cancer microenvironment and aimed to identify the cells responsible for inducing Acinar atrophy and to elucidate the mechanism in order to develop a new treatment for local invasion of pancreatic cancer. In the invasive front of human pancreatic cancer tissues, Acinar-to-ductal metaplasia (ADM)-like changes expressed TGF $\beta$  were observed, and the expression of TGF $\beta$  was associated with poor prognosis. Gene expression analysis also revealed phenotypic differences among cancer-associated ADM, sporadic ADM, and chronic pancreatitis ADM. These results suggest that the mechanism causing ADM varies depending on the tissue microenvironment and that cancer-associated ADM and acinar atrophy contribute to the invasion of pancreatic cancer cells into the parenchyma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 局所浸潤 Acinar atrophy 癌微小環境 ADM

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌の5年生存率は7%と低く、あらゆる癌種の中でも最難治癌であり、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っていない。一方で癌間質相互作用による膵癌の悪性度増加に対して、膵星細胞あるいは膵星細胞が産生する細胞外基質を標的とした治療法の開発が進められてきた。しかし、内因性 KrasG12D 発現/p53 ノックアウトに Sonic hedgehog のノックアウトを組み合わせたマウスモデルにおいて発生する膵癌では、間質量が減少するものの血管密度が高くなること、低分化あるいは未分化癌が増加し有意に予後不良となることが報告され (Cancer Cell, 2014, Rhim)、膵癌進展を抑制するには単に腫瘍内の間質量を減らすだけでは不十分であり、間質や微小環境を構成する細胞、さらには膵癌周囲微小環境を構成する膵腺房細胞を含めた更なる膵癌局所浸潤機構の理解とその制御が不可欠であるとされた。以上から、臨床において真に有効な新規膵癌治療法の開発には、膵癌の病態を正確に再現した実験モデルの活用と、それに基づいた膵癌に特異的な癌微小環境を含めた更なる病態の理解が必要である。そこで本研究では、癌細胞、間質細胞の heterogeneity に着目し(図1)、膵癌の局所浸潤において



病理組織像で観察される Cancer-associated Acinar atrophy が癌微小環境により誘導される機序の解明、および Cancer-associated Acinar atrophy が膵癌細胞の局所進展に与える影響を 3次元 in vitro モデルや in vivo モデルを用いて機能的に解析することで、従来の病理学的解析や癌細胞・間質細胞のみに焦点を当てた研究とは異なり、膵癌周囲微小環境を含めた新たな膵癌進展機構が解明できるのではないかと考え、本研究の構想に至った。

### 2. 研究の目的

膵癌の膵実質内への局所浸潤が強い領域では、間質浸潤とともに膵癌周囲の膵腺房細胞の萎縮 (Cancer-associated Acinar atrophy) が起きている。本研究では、膵癌微小環境を構成する細胞の heterogeneity に着目し、Acinar atrophy を誘導する責任細胞の同定とその機序を解明することで、新たな膵癌局所浸潤の治療法の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 治療耐性膵癌細胞株、膵癌 Spheroid 細胞、膵星細胞の樹立、膵腺房細胞の抽出・培養

膵星細胞と膵癌細胞、膵腺房細胞との共培養系における膵腺房細胞の萎縮・壊死などの形態変化や、それによる癌細胞の増殖・遊走・浸潤能の評価、微小環境に及ぼす影響を解析するために必要な 3D モデルや ex vivo モデル、in vivo モデルを作成するにあたり、まずはヒト膵癌組織および膵癌自然発癌マウスモデル (KPC, KPCL) を用いて膵癌細胞、膵星細胞、膵腺房細胞の樹立を行った。

#### ヒト及び KPC の膵癌浸潤部の病理組織的解析

Amylase, CK19, TGF $\beta$  の免疫染色を介して実際の膵癌浸潤部における ADM (Acinar-to-ductal metaplasia) 様な形態変化を観察し、腺房細胞の可塑性に関わる因子を選別し、同定した。

また、膵癌組織中の同因子の発現強度と予後との相関を検討した。

#### 膵癌浸潤部における ADM 様変化に寄与する因子の in vitro での評価

で同定した膵癌浸潤部での ADM 様変化に寄与すると考えられた因子を で樹立した腺房細胞に添加し、ADM 様変化が起きるかを検索し、その際に KRAS 変異の有無が与える影響について検討した。

#### 膵癌浸潤部における ADM 様変化に寄与する因子の in vivo での評価

で確認した因子を in vivo モデルを用いて検証した。KRAS 野生型と KRAS : G12D 変異のそれぞれのマウスに同所移植を行い、浸潤部における ADM 様変化および腫瘍量を比較し評価した。

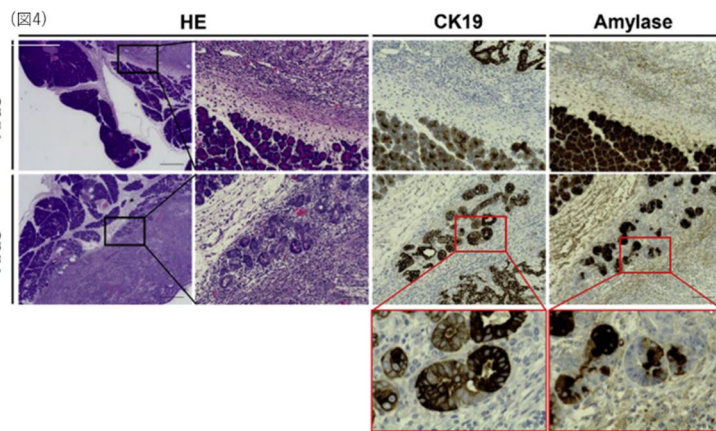
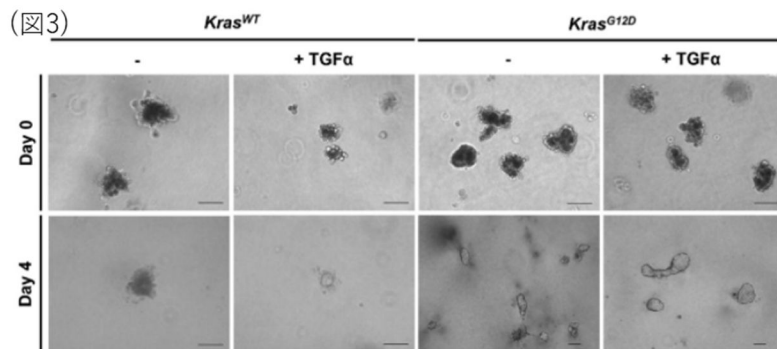
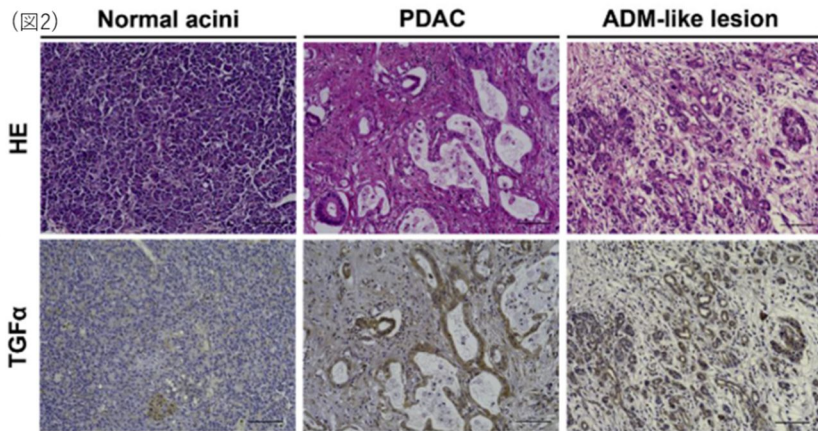
#### 異なった組織微小環境に由来する ADM の遺伝子発現解析

癌関連 ADM、慢性膵炎関連 ADM、正常膵孤発性 ADM といった各領域をレーザーマイクロダイセクションによって分取し、N カウンターを用いた網羅的発現解析を行い、それぞれの遺伝子発現プロファイルの差違を比較、検討した。



#### 4. 研究成果

まず、膵癌患者における術前化学療法投与例及び非投与例の手術検体より膵癌細胞、膵星細胞の樹立を多数行った。また、膵癌自然発生マウス (KPC、KPCL) より膵腺房細胞を抽出し三次元培養による腺房細胞の可塑性モデルを構築した。ヒト及び KPC の膵癌病理組織的解析では、膵癌実質浸潤部において間質浸潤や Acinar atrophy にともない ADM (Acinar-to-ductal metaplasia) 様な形態変化が起きていることに着目し、腺房細胞の可塑性と癌局所浸潤との関連について解析を進めた。その結果、膵癌および浸潤先進部の ADM 様変化において TGF $\alpha$  が有意に発現していることがわかった (図2)。そこで、実際のヒト膵癌組織を用いて TGF $\alpha$  の発現量を免疫組織化学染色によって評価し、その発現量に基づいて全生存率を検討したところ、TGF $\alpha$  高発現群が有意に予後不良であった。そこで、*in vitro* において膵癌細胞株の TGF $\alpha$  の発現量を RT-PCR で評価したところ、いずれも CAF よりも高値であった。また、migration / invasion assay では、TGF $\alpha$  を添加することで遊走能・浸潤能いずれも亢進した。また、膵腺房細胞に



Acinar-to-ductal change

TGF $\alpha$  を添加すると ADM が誘導され、管腔構造を形成した。この変化は *Kras* : G12D 変異の有無で異なっており、*Kras* : G12D 変異を有している腺房細胞において有意に ADM が誘導された (図3)。次に、これら変化を *in vivo* モデルにおいて評価した。*Kras* 野生型のマウスと膵管上皮に *Kras* : G12D 変異を有するマウスにそれぞれ膵癌細胞を同所移植し、腫瘍先進部および腫瘍形成能を評価した。膵腺房細胞に *Kras* 変異を有するマウスモデルにおいて、先進部に ADM 様変化を有意に多く認め、さらに腫瘍量も有意に多かった (図4)。これらより、腺房細胞の可塑性によって膵癌周囲の間質誘導及び膵癌局所進展が増強されることを見出した。また、癌関連 ADM、慢性膵炎関連 ADM、正常膵孤発性 ADM といった各領域をレーザーマイクロダイセクションによって分取し、N カウンターを用いた網羅的発現解析を行い、それぞれの遺伝子発現プロファイルの差を比較、検討した。すると、異なった組織微小環境に由来する ADM の遺伝子発現解析では、癌関連 ADM、慢性膵炎関連 ADM、正常膵孤発性 ADM において異なった遺伝子発現プロファイルを示すことを明らかにした。以上より、これらの結果は膵癌局所浸潤における Acinar atrophy の機序の解明につながるものであり、制御法の開発が新たな膵癌局所浸潤の治療法の開発につながると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Iwamoto Chika, Ohuchida Kenoki, Shinkawa Tomohiko, Okuda Sho, Otsubo Yoshiki, Okumura Takashi, Sagara Akiko, Koikawa Kazuhiro, Ando Yohei, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Moriyama Taiki, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Eto Masatoshi, Akashi Koichi, Nakamura Masafumi	4. 巻 512
2. 論文標題 Bone marrow-derived macrophages converted into cancer-associated fibroblast-like cells promote pancreatic cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 15～27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.04.013	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 Feng Haimin, Moriyama Taiki, Ohuchida Kenoki, Sheng Nan, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Shirahane Kengo, Ikenaga Naoki, Nagai Shuntaro, Nakata Kohei, Mizumoto Kazuhiro, Nakamura Masafumi	4. 巻 40
2. 論文標題 N-acetyl cysteine induces quiescent-like pancreatic stellate cells from an active state and attenuates cancer-stroma interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-021-01939-1	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 Yohei Ando, Kenoki Ohuchida, Yoshiki Otsubo, Shin Kibe, Shin Takesue, Toshiya Abe, Chika Iwamoto, Koji Shindo, Taiki Moriyama, Kohei Nakata, Yoshihiro Miyasaka, Takao Ohtsuka, Yoshinoda Oda, Masafumi Nakamura	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis in pancreatic cancer promotes cancer cell migration and invasion by release of CXCL5	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0228015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0228015	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 Kibe S, Ohuchida K, Ando Y, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Shimamoto M, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M.	4. 巻 444
2. 論文標題 Cancer-associated acinar-to-ductal metaplasia within the invasive front of pancreatic cancer contributes to local invasion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Lett	6. 最初と最後の頁 70-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.12.005	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 Okumura T, Ohuchida K, Kibe S, Iwamoto C, Ando Y, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Koikawa K, Sada M, Horioka K, Mochidome N, Arita M, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M	4. 巻 144
2. 論文標題 Adipose tissue-derived stromal cells are sources of cancer-associated fibroblasts and enhance tumor progression by dense collagen matrix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Cancer	6. 最初と最後の頁 1401-1413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31775	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Iwamoto C, Ohuchida K, Shinkawa T, Otsubo Y, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Ohtsuka T, Nakamura M
2. 発表標題 Human macrophages-derived CAF-like cells lead the invasion of pancreatic cancer
3. 学会等名 14th World Congress of International Hepeto-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Iwamoto C, Ohuchida K, Ando Y, Shinkawa T, Ohtsubo Y, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyawaki K, Ohtsuka T, Akashi K, Eto M, Nakamura M
2. 発表標題 BM-Derived Cells Destruct Basement Membrane and Induce Local Invasion of Pancreatic Cancer
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ando K, Ohuchida K, Otsubo Y, Sagara A, Kibe S, Takesue S, Nakayama M, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2. 発表標題 Necroptosis in Pancreatic Cancer Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Release of CXCL5
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本千佳、大内田研宙、安藤陽平、新川智彦、大坪慶志輝、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、宮脇恒太、赤司浩一、江藤正俊、中村雅史
2. 発表標題 膵癌微小環境を構築する骨髄由来細胞が膵癌浸潤を先導する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤陽平、大内田研宙、岐部晋、武居晋、中山宏道、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 膵癌細胞への異なった細胞死誘導による遊走・浸潤能への影響の比較
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本千佳、大内田研宙、武居晋、進藤幸治、宮脇恒太、赤司浩一、橋爪誠、江藤正俊、中村雅史
2. 発表標題 膵臓に誘導され膵癌微小環境を構成する骨髄由来細胞が膵癌浸潤を制御する
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Kibe, K. Ohuchida, Y. Ando, S. Takesue, M. Nakayama, T. Abe, S. Endo, K. Koikawa, T. Okumura, C. Iwamoto, K. Shindo, T. Moriyama, K. Nakata, S. Nagai, Y. Miyasaka, M. Shimamoto, T. Ohtsuka, K. Mizumoto, M. Nakamura.
2. 発表標題 ADM are Classified Three Distinct Phenotypical Profiles Depending on its Different Microenvironment
3. 学会等名 American Pancreatic Association Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 巖子龍、大内田研宙、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、永井俊太郎、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 CD110の阻害は、マウスの膵癌肝転移を抑制する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
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	岩本 千佳  (IWAMOTO Chika)  (10752842)	九州大学・大学病院・特任助教    (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鬼丸 学  (ONIMARU Manabu)  (80529876)	九州大学・医学研究院・共同研究員    (17102)	
研究分担者	水元 一博  (MIZUMOTO Kazuhiro)  (90253418)	九州大学・大学病院・准教授    (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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関