

令和 3 年 5 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16366

研究課題名(和文)膵癌進展を促す骨髄由来細胞による癌細胞clonalityの選択機序解明とその制御

研究課題名(英文)Clarification and regulation of the involvement between BM-derived cells and pancreatic cancer clonality

研究代表者

岩本 千佳(Chika, Iwamoto)

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：10752842

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):膵癌の進展において、様々な遺伝子変異を獲得していく過程で、複数のクローンの選択に、癌微小環境構成要素である骨髄由来細胞の関与が考えられるが、その機序は未だ不明である。膵癌進展に関わる骨髄由来細胞の作用機序を解明するとともに、膵癌の各段階におけるheterogeneousな癌細胞の経時的なclonalityにも焦点をあて、膵癌進展メカニズムを解明した。同種骨髄移植モデルの膵組織では浸潤部にGFP陽性細胞集簇する傾向にあった。また、骨髄由来細胞が膵癌細胞の浸潤能と遊走能を促進した。さらに、膵癌の各段階における癌細胞の変異遺伝子を検討した結果、膵原発、肝転移、血液系に特異的な変異遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌細胞の刺激により骨髄由来細胞がCAFマーカーを発現することを新たに見出したことで、CAFのsubsetには様々な由来細胞が存在することが示唆された。由来細胞の同定は、膵癌微小環境におけるCAFの役割をより理解するためには必要不可欠であることから、本研究結果は学術的意義が高いと言える。また、転移形成において、臓器特異的な遺伝子変異が見られることが示唆された。臓器特異的転移形成の機序を解明することで、新たな治療法の開発に役立つと考えられる。これは、膵癌のみならず転移形成を生じる他の癌腫の治療にも応用できる可能性を秘めているため、社会的意義は大きいと言える。

研究成果の概要(英文): In pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), mesenchymal stem cells-derived tumor stroma seems to promote tumor development. However, involvement of bone marrow (BM)-derived cells on tumor progression and its mechanism remains unclear. We aimed to investigate an association between pancreatic cancer progression and BM-derived cells. In the pancreas of allogeneic models, GFP+BM-derived immune cells were accumulated at invasive front, and a few GFP+aSMA+ cells were detected. Some BM-derived cells interacted with pancreatic cancer cells (PCCs) expressed CAF markers. The heterogeneity of PCCs for PDAC development was investigated using whole exome sequencing. We identified the several organ-specific mutations.

研究分野：腫瘍免疫学、分子腫瘍学

キーワード：膵癌 浸潤

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本において膵癌は肺癌、胃癌、大腸癌、肝臓癌について死因第5位である。膵癌は5年生存率がわずか8%と最も予後不良な消化器癌である<sup>1</sup>。予後不良の原因として考えられるのは、原発巣が比較的小さな段階でも浸潤・転移を来しやすく、手術や放射線療法による局所療法による根治が望みにくく、また有効な化学療法が殆どなく癌自体の生物学的悪性度が高いことなどが挙げられる。現在、新たな治療法として期待を集めているのが癌免疫療法である。これは、腫瘍細胞特異的に発現している腫瘍関連抗原を標的とした治療法だが、癌細胞の heterogeneity による腫瘍関連抗原および HLA Class I の発現低下、癌微小環境における免疫抑制因子による抗腫瘍免疫の抑制などといった癌細胞の免疫逃避機構という問題点が存在する<sup>2,3,4</sup>。

### 2. 研究の目的

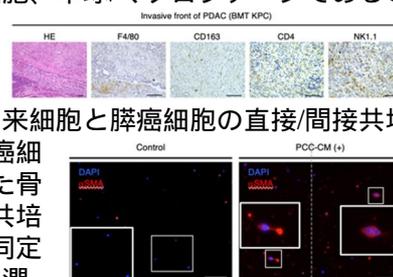
膵癌の進展においても、他の癌腫と同様に、様々な遺伝子変異を獲得していく過程で、複数のクローンからなる heterogeneity が存在するが、特定の癌細胞クローンの生存・選択に癌微小環境の構成要素と考えられる骨髄由来細胞がどのように関与しているかは未だ不明である。本研究では、癌微小環境に着目した骨髄由来細胞と膵癌細胞との相互作用の機序解明に加え、原発巣や転移巣における heterogeneous な膵癌細胞の経時的な clonality 解明にも焦点をあて、膵癌進展メカニズムを解明する。さらに、膵癌微小環境の制御や、癌細胞の clonality を決定づけている増殖・浸潤や転移形成に特異的に関与する因子を標的とした新規治療法の開発を行う。

### 3. 研究の方法

膵癌自然発症マウスの KC/KPC マウスに、GFP で標識された骨髄細胞を移植し、同種骨髄移植モデルを作製した。レシピエントマウスにおける骨髄細胞の生着・分布・phenotype を FCM 解析や免疫組織染色にて評価した。膵癌細胞の遊走・浸潤・増殖能における骨髄由来細胞の関与を評価した。また、前癌病変から浸潤・転移に至るまでの各段階の遺伝子変異蓄積を検討するため、各段階におけるゲノム DNA を採取し、エクソームシーケンスによる解析を行った。

### 4. 研究成果

レシピエントマウスの末梢血、骨髄、膵臓、肝臓のいずれの組織にもドナー由来の GFP 陽性骨髄細胞の生着が認められ、GFP 陽性細胞は、T 細胞、NK 細胞、単球/マクロファージであることが分かった。レシピエントマウスの膵臓において免疫組織染色を行ったところ、GFP 陽性細胞や単球系細胞、 $\alpha$ SMA 陽性細胞が腺房-導管異形成 (ADM) や PanIN 周辺、また invasive front に集簇する傾向にあることを見出した。骨髄由来細胞と膵癌細胞の直接/間接共培養を行い、膵癌細胞の浸潤能、遊走能を検討したところ、膵癌細胞の浸潤能と遊走能が促進された。また、膵癌細胞で刺激した骨髄由来細胞は CAF 特異的なマーカーを発現した。癌細胞と共培養した骨髄由来細胞から産生されるサイトカインを 13 種類同定し、そのうち IL10 を含む 5 種類のサイトカインが癌細胞の浸潤・遊走に深く関わっていることを明らかにした。次に、膵癌の各段階における癌微小環境や癌細胞の heterogeneity について検討するため、まず前癌病変から浸潤・転移に至るまでの各段階の遺伝子変異蓄積を検討した。KPC マウスを原発巣なし、原発巣あり/転移巣なし、原発巣あり/転移巣ありの 3 群に分け、経時的な末梢血と各組織(原発巣と転移巣)の FFPE よりゲノム DNA を抽出し、エクソームシーケンスを行った。膵癌細胞や fibroblast、免疫細胞に関連のある遺伝子を含む 409 個の癌抑制遺伝子と癌遺伝子について病態進展に伴う遺伝子変異の蓄積・変動を解析した。その結果、膵原発特異的な変異遺伝子が 6 遺伝子、肝転移特異的な変異遺伝子が 4 遺伝子、末梢血や血性腹水などの血液系に特異的な変異遺伝子が 4 遺伝子同定された。これにより、転移臓器特異的に変異遺伝子が異なる可能性が示唆された。今後は、骨髄由来細胞と膵癌微小環境を構成する CAF subtype との関連を検討するとともに、膵癌進展の各段階にて蓄積する変異遺伝子を標的とした早期診断や治療法へ応用可能かヒト膵癌組織でも検討を行う。



### 引用文献

1 R.L. Siegel, K.D. Miller, and A. Jemal. Cancer statistics, 2018, CA. Cancer J. Clin. 2018, 68(1)7-30.

2 Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, and Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel

member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992, 11(11)3887-3895.

3 Nishimura H and Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol.* 2001, 22(5)265-268.

4 Iwai Y, Terawaki S, and Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol.* 2005, 17(2)133-144.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 13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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ando Yohei, Ohuchida Kenoki, Otsubo Yoshiki, Kibe Shin, Takesue Shin, Abe Toshiya, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	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 Jinnouchi Fumiaki, Yamauchi Takuji, Yurino Ayano, Nunomura Takuya, Nakano Michitaka, Iwamoto Chika, Obara Teppei, Miyawaki Kohta, Kikushige Yoshikane, Kato Koji, Maeda Takahiro, Miyamoto Toshihiro, Baba Eishi, Akashi Koichi, Takenaka Katsuto	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishment of a human SIRPA knock-in xenograft mouse model to study human hematopoietic and cancer stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019002194	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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yan Zilong, Ohuchida Kenoki, Fei Shuang, Zheng Biao, Guan Weiyu, Feng Haimin, Kibe Shin, Ando Yohei, Koikawa Kazuhiro, Abe Toshiya, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Mizumoto Kazuhiro, Hashizume Makoto, Nakamura Masafumi	4. 巻 38
2. 論文標題 Inhibition of ERK1/2 in cancer-associated pancreatic stellate cells suppresses cancer?stromal interaction and metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-019-1226-8	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 Kugler M, Goto Y, Tamura Y, Kawamura N, Kobayashi H, Yokota T, Iwamoto C, Ohuchida K, Hashizume M, Shimizu A, Hontani H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Robust 3D image reconstruction of pancreatic cancer tumors from histopathological images with different stains and its quantitative performance evaluation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Comput Assist Radiol Surg	6. 最初と最後の頁 2047-2055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11548-019-02019-8	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 Ishikawa Masahiro, Okamoto Chisato, Shinoda Kazuma, Komagata Hideki, Iwamoto Chika, Ohuchida Kenoki, Hashizume Makoto, Shimizu Akinobu, Kobayashi Naoki	4. 巻 10
2. 論文標題 Detection of pancreatic tumor cell nuclei via a hyperspectral analysis of pathological slides based on stain spectra	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 4568-4568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.10.004568	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 C Iwamoto, K Ohuchida, M Okumura, Y Usumoto, J Kishimoto, M Murata, N Ikeda, M Hashizume	4. 巻 32
2. 論文標題 Postmortem interval estimation using the animal model of postmortem gas volume changes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 66-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2017.12.010	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 K Koikawa, K Ohuchida, Y Ando, S Kibe, H Nakayama, S Takesue, S Endo, T Abe, T Okumura, C Iwamoto, T Moriyama, K Nakata, Y Miyasaka, T Ohtsuka, E Nagai, K Mizumoto, M Hashizume, M Nakamura.	4. 巻 425
2. 論文標題 Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 65-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.03.03	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 T Okumura, K Ohuchida, S Kibe, C Iwamoto, Y Ando, S Takesue, H Nakayama, T Abe, S Endo, K Koikawa, M Sada, K Horioka, N Mochidome, M Arita, T Moriyama, K Nakata, Y Miyasaka, T Ohtsuka, K Mizumoto, Y Oda, M Hashizume, M Nakamura.	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 2019年
3. 雑誌名 International Journal of 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 S Kibe, K Ohuchida, Y Ando, S Takesue, H Nakayama, T Abe, S Endo, K Koikawa, T Okumura, C Iwamoto, K Shindo, T Moriyama, K Nakata, Y Miyasaka, M Shimamoto, T Ohtsuka, K Mizumoto, Y Oda, M Nakamura.	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 Letters	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 -
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 A Sagara, K Nakata, T Yamashita, W Guan, P Zhong, S Matsumoto, S Endo, C Iwamoto, K Shindo, N Ikenaga, T Moriyama, K Ohuchida, K Mizumoto, M Nakamura.	4. 巻 -
2. 論文標題 New High-Throughput Screening Detects Compounds That Suppress the Pancreatic Stellate Cell Activation and Attenuate the Growth of Pancreatic Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件)

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 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回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

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

1 . 発表者名 K Shindo, K Ohuchida, H.R. Roth, H Oda, C Iwamoto, M Oda, T Ohtsuka, K Mori, M Hashizume, M Nakamura.
2 . 発表標題 Micro-CT in the Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-embedded Blocks of Resected Pancreatic Lesions.
3 . 学会等名 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 A Sagara, K Nakata, T Yamashita, W Guan, S Matsumoto, S Date, Y Ohtsubo, T Shinkawa, R Kimura, A Fujii, Y Ando, C Iwamoto, Y Watanabe, K Shindo, N Ikenaga, T Moriyama, K Ohuchida, T Ohtsuka, K Mizumoto, M Nakamura.
2 . 発表標題 Repositioning of Duloxetine as a New Drug for Targeting Pancreatic Cancer Microenvironment.
3 . 学会等名 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 C Iwamoto, K Ohuchida, T Okumura, K Koikawa, S Takesue, H Nakayama, S Endo, S Kibe, Y Ando, K Shindo, K Nakata, K Miyawaki, M Murata, K Akashi, M Nakamura, M Hashizume.
2 . 発表標題 BM-derived Cells Differentiated into Multilineage Hematopoietic Cells Regulate Invasion and Proliferation of Pancreatic Cancer.
3 . 学会等名 Pancreas 2018 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 C Iwamoto, K Ohuchida, T Okumura, K Koikawa, S Takesue, H Nakayama, S Endo, S Kibe, Y Ando, K Miyawaki, M Murata, K Akashi, M Nakamura, M Hashizume.
2 . 発表標題 BM-derived cells recruited to the pancreas constitute the tumor microenvironment and promote invasion of pancreatic cancer.
3 . 学会等名 Digestive Disease Week ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 岩本千佳, 大内田研宙, 武居晋, 肥川和寛, 奥村隆志, 遠藤翔, 仲田興平, 宮脇恒太, 村田正治, 江藤正俊, 赤司浩一, 中村雅史, 橋爪誠.
2. 発表標題 膵臓に誘導される骨髄由来細胞が癌微小環境を構成し膵癌浸潤を制御する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 C Iwamoto, K Ohuchida, M Hashizume.
2. 発表標題 Accumulation and integration of various medical images derived from KPC mice and resected human pancreases.
3. 学会等名 5th International Symposium on the Project “Multidisciplinary Computational Anatomy” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K Shindo, K Ohuchida, C Iwamoto, HR. Roth, M Oda, K Mori, N Ikeda, M Hashizume.
2. 発表標題 Development of the novel prediction models using 3D-CT reconstructed images.
3. 学会等名 5th International Symposium on the Project “Multidisciplinary Computational Anatomy” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本千佳, 大内田研宙, 新川智彦, 大坪慶志輝, 奥田翔, 進藤幸治, 赤司浩一, 大塚隆生, 江藤正俊, 中村雅史.
2. 発表標題 膵癌微小環境下で骨髄造血幹細胞はCAF様の形態・機能を獲得し、膵癌の局所浸潤を誘導する
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 C Iwanoto, K Ohuchida, T Shinkawa, Y Ohtsubo, K Shindo, T Moriyama, K Nakata, T Ohtsuka, M Nakamura.
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 the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩本千佳, 大内田研宙, 橋爪誠	4. 発行年 2019年
2. 出版社 学術新報社	5. 総ページ数 207
3. 書名 「膵癌組織の病理像とMR像のデジタル画像統合と膵腫瘍微細構造解析」MEDICAL IMAGING TECHNOLOGY	

〔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
研究協力者	大内田 研宙 (Ohuchida Kenoki)		
研究協力者	國崎 祐哉 (Kunisaki Yuya)		
研究協力者	進藤 幸治 (Shindo Koji)		

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
---------	---------