

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17657

研究課題名(和文)血管新生のheterogeneityに着目した血行性臓器特異的転移形成の機序解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of hematogenous organ-specific metastasis formation focusing on the heterogeneity of angiogenesis mechanism of hematogenous organ-specific metastasis formation

研究代表者

中山 宏道(NAKAYAMA, Hiromichi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80866773

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):本研究の目的は、膵癌の主要な死因である血行性転移の機序を解明することである。当初は、血管新生のタイプを比較、検討する予定であったが、免疫染色によりマウス由来膵癌組織を観察したところ、CD31陽性細胞の分布がAcinar-to-ductal metaplasia様の形態を示す部分に偏っていることを発見した。ヒト膵癌切除組織を用いた免疫染色による解析では、ADM like lesionでは微小血管密度が高く、CD68、CD163、IL12Aの発現が有意に高かった。またADM like lesionでは、M2マクロファージが産生するMMP9を介して血管新生が促進されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の遠隔転移を制御する新規治療法の開発は膵癌患者の予後改善に直接的に寄与し、社会的要請度・貢献度・緊急性が高い。

本研究では、膵癌組織中のADM like lesionにおいて血管新生が促進しており、その要因として、IL12Aによって動員された骨髄由来マクロファージが腫瘍内で免疫抑制性機能を持つM2マクロファージへと変化し、マクロファージが産生するMMP9によって血管新生が促進している可能性が示された。

膵癌における主要な死因の一つである血行性転移のメカニズムにおける重要な知見であり、血管新生を標的とした膵癌患者の予後を改善する新規治療の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文):The purpose of this study was to elucidate the mechanism of hematogenous metastasis, a major cause of death in pancreatic cancer. We initially planned to compare and investigate angiogenesis types, but when we observed mouse-derived pancreatic tumor tissues by IHC, we found that the distribution of CD31-positive cells was biased toward areas showing an acinar-to-ductal metaplasia (ADM)-like lesion. Immunostaining analysis using resected human pancreatic tumor tissues revealed higher microvessel density and significantly higher expression of CD68, CD163, and IL12A in ADM-like lesions. Furthermore, MMP9 expression was found consistent with M2 macrophages in the tumor, and endothelial cells attached to the supernatant of M2 macrophages promoted angiogenesis. These results suggest that angiogenesis may be promoted via MMP9 produced by M2 macrophages in ADM like lesions.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血管新生 膵癌 血行性転移 ADM M2 マクロファージ MMP9 IL12A

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治癌のひとつであり、ここ数十年の治療の進歩にもかかわらず生存率の改善がみられていない。膵癌の予後が不良な原因のひとつに膵癌が早期に遠隔転移を起こすにも関わらず、それに対する有効な治療法がないことが挙げられる。そのため、膵癌の遠隔転移を制御する新規治療法の開発は膵癌患者の予後改善に直接的に寄与し、社会的要請度・貢献度・緊急性が高い。

膵癌の血行性転移は肝転移が最多であるが、それは膵癌を灌流する門脈血が最初に肝臓に流入することが主な原因とされている。一方、1889年に Paget は癌細胞(Seed)の転移形成において土壌(Soil)となる臓器の環境が癌細胞の生着に適していることが必要であること(Seed and Soil 説)を提唱した。我々の研究でも肝転移・肺転移マウスモデルにおいて特定の癌細胞が肝転移は形成するものの肺転移は形成しない形質を持つことを明らかにしており、これは Seed and Soil 説を支持するものであり、膵癌の転移臓器特異性は単に血行動態によるものではなく、転移先臓器の微小環境が影響していることが示唆される。自験例も含め膵癌術後の初発再発肺転移症例が初発再発肝転移症例と比較して有意に予後が良好である(Zheng B, et al. World J Surg, 2017,)という報告が散見されることから、肝転移と肺転移では何らかの分子生物学的な違いがあると考えられる。また、血行性転移には、6つのタイプがあり、その中でも最も高頻度なタイプである sprouting angiogenesis と血管内皮前駆細胞(Endothelial progenitor cells: EPCs)由来の vasculogenesis は膵癌でも報告がある。このように血管新生にはその heterogeneity が存在するが、それぞれのタイプごとの予後への影響や詳細なメカニズムに関しては不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌の主要な死因のひとつである血行性転移の機序を解明し、膵癌患者の予後を改善する新規治療法の開発をすすめることである。

3. 研究の方法

当初は血管新生の heterogeneity に着目して、その中でも最も高頻度で膵癌においてもすでに報告がある、sprouting angiogenesis と vasculogenesis の2つの血管新生の特性を比較・検討することで、血管新生の詳細なメカニズムやタイプごとの予後への影響を解明しようと考えた。

まず、vasculogenesis による血管新生においては、骨髄由来の血管内皮前駆細胞が CD31+血管内皮細胞へと分化するという特性があり、発生機序の異なる2つの血管新生を区別するため、膵癌自然発癌モデル(LSL-KrasG12D/+;LSL-Trp53R172H/+;Pdx-Cre: KPC)マウスに、GFP 陽性骨髄細胞を移植した、同種骨髄移植 KPC モデルを用いて比較、検討を行うこととした。

1. Sprouting angiogenesis と vasculogenesis を区別するための、同種骨髄移植 KPC モデルの作成
2. 血管新生のタイプによる局所浸潤や転移臓器の違いを検討

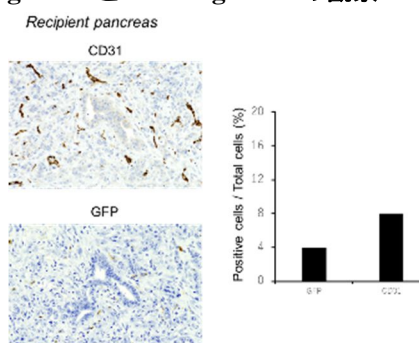
上記実験計画を立てて実験を開始した。当初は、血管新生のタイプごとの特性を比較する予定であったが、実際にマウスの腫瘍を CD31 の免疫染色を用いて観察したところ、血管新生のマーカーである CD31 と骨髄由来細胞(GFP 陽性)の分布が、腫瘍内の Acinar-to-ductal metaplasia (ADM) 様の形態を示す部分に偏っていることを発見した。我々は、この ADM like lesion が線維形成性変化と局所膵実質への癌細胞の浸潤を促進し、さらに、単球系細胞をリクルートする IL12A が ADM like lesion でより高く発現することを以前に報告している(Kibe et al, Cancer Letter, 2019)。そこで、膵癌における血管新生に、この ADM like lesion が骨髄由来血球細胞を介して関わっているのではないかとこの新たな仮説を考え、下記の実験計画を新たに考案した。

1. ヒト膵癌切除標本を用いた CD31+血管内皮細胞の空間的解析
2. ADM like lesion における骨髄由来血球細胞の解析
3. 血管新生と骨髄由来血球細胞の関連の評価

4. 研究成果

1. 同種骨髄移植 KPC モデルを用いた Sprouting angiogenesis と vasculogenesis の観察

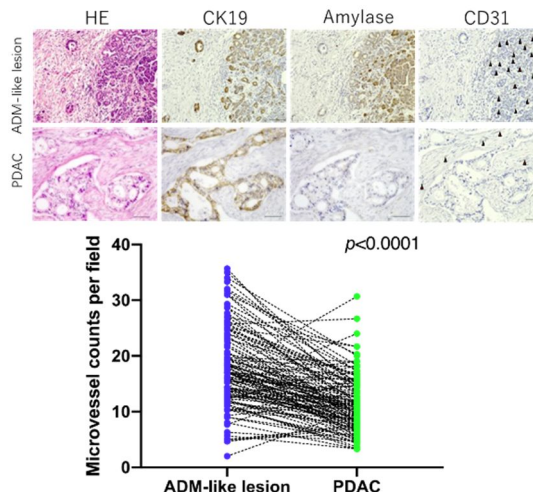
発生機序の違う sprouting angiogenesis と vasculogenesis の2種類に着目して、後者が骨髄由来血管内皮前駆細胞によって仲介されていることに注目し、同種骨髄移植 KPC マウスを用いて両者識別する検討を行った。免疫染色で腫瘍内の CD31 陽性細胞、GFP 陽性細胞を観察したところ、GFP 陽性細胞は全体の4%ほどで、CD31 陽性細胞は全体の10%ほどであり、骨髄由来の vasculogenesis よりも sprouting angiogenesis による血管新生の方が高頻度であることが示唆された(右図)。さらに、免疫染色による詳細な検討を行ったとこ



る、血管新生のマーカーである CD31 と骨髄由来細胞(GFP 陽性)の分布が、腫瘍内の Acinar-to-ductal metaplasia (ADM)様の形態を示す部分に偏っていることを発見した。そこで、膵癌における血管新生に、この ADM like lesion が骨髄由来血球細胞を介して関わっているのではないかと、いう新たな仮説を考えた。

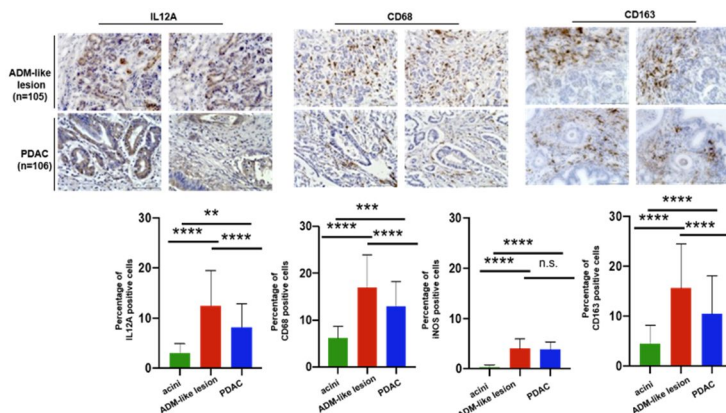
2. ヒト膵癌切除標本を用いた CD31+血管内皮細胞の空間的解析

ヒト膵癌切除組織 131 例を用いて、CD31、Amylase、CK19、CD68、iNOS、CD163、IL12A、MMP9 の免疫組織染色を行ない、血管内皮細胞の分布の解析を行った。すると、ADM like lesion では PDAC 部分と比較して有意に CD31 陽性細胞が集積し、微小血管密度(MVD)が高いことが明らかになった(右図)。また、膵癌患者 131 人の MVD と予後の関連を解析したところ、ADM like lesion と、PDAC 部のいずれにおいても MVD が高い膵癌患者では、有意に予後不良であった。



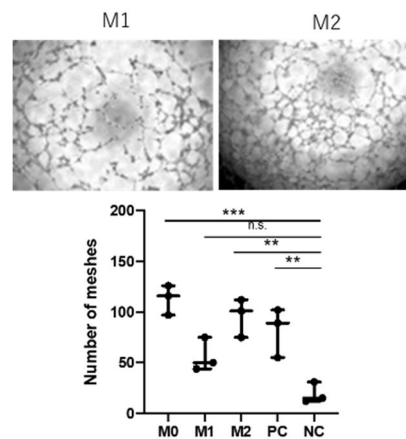
3. ADM like lesion と骨髄由来血球細胞の関連

我々は、以前に単球系細胞をリクルートする IL12A が ADM like lesion でより高く発現することを報告しており、骨髄由来細胞であるマクロファージが ADM like lesion における血管新生促進に関わっているのではないかと考えた。そこで、まず ADM like lesion におけるマクロファージの局在を解析するため、ヒト膵癌切除標本を用いて CD68 と CD163、iNOS、IL12A を染色し、M1 と M2 型を含む TAM と IL12A の発現を検討したところ、PDAC 部と比較して ADM like lesion では CD68(マクロファージマーカー)、CD163(M2 マクロファージマーカー)、IL12A の発現が有意に高かった。



4. 血管新生とマクロファージの関係

続いて、血管新生と腫瘍内浸潤マクロファージの関係を明らかにするため、以前に血管新生の促進に関わることが報告されている MMP9 に着目した。ヒト膵癌組織の多重免疫染色の結果、ADM like lesion において M2 マクロファージに一致して MMP9 が発現していた。さらに、ヒト単球細胞株である THP-1 を M1, M2 マクロファージに分化させ、MMP の発現を比較したところ、M2 マクロファージで有意に MMP の発現が上昇していた。また、内皮細胞にマクロファージの上清を添加させて tube formation assay により血管新生を評価したところ、M2 マクロファージの上清を添加した場合に、有意に血管新生が促進された。



これらの結果から、膵癌における ADM like lesion において、腫瘍内に浸潤した M2 マクロファージが産生する MMP9 を介して血管新生が促進されている可能性が示唆された。

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 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岩本千佳、大内田研宙、新川智彦、相良亜希子、奥田翔、小山虹輝、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、森山大樹、中村雅史
2. 発表標題 造血幹細胞由来CAF subsetが腫瘍内heterogeneityを高度化する
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

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 Shinkawa T, Ohuchida K, Iwamoto C, Shindo K, Nakata K, Ohtsuka T, Nakamura M
2. 発表標題 Subtype classification of pancreatic ductal adenocarcinoma based on microenvironmental niche factors dependency and chemotherapy resistance
3. 学会等名 14th World Congress of International Hepeto-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 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
研究協力者	新川 智彦 (SHINKAWA Tomohiko)		

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