

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462063

研究課題名(和文) 膵癌肝転移における微小環境誘導メカニズムの解明とそのリモデリングによる制御

研究課題名(英文) Management of pancreatic cancer liver metastasis through investigating the mechanism of formation and remodeling its microenvironment.

研究代表者

藤田 逸人 (FUJITA, Hayato)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40611281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膵癌の肝転移形成において促進的に作用する特定の間質細胞集団およびその責任分子を同定して癌間質リモデリングによる新たな膵癌遠隔転移制御治療法を開発する事である。まず、膵癌高肝転移株の網羅的遺伝子解析を行い、miR-5100の発現が高肝転移株で有意に低下していることを明らかにした。その標的遺伝子であるPODXLの発現と肝転移の頻度、予後には有意な相関がみられることや、膵癌細胞のPODXLをノックダウンすることで膵癌の進展が抑制されることを明らかにした。また、膵癌微小肝転移・肺転移マウスモデルを観察し、肝転移巣で有意に α -SMA陽性の間質細胞が多く誘導されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a new therapeutic strategy targeting the specific cell population and its molecular mechanism.

Microarray analysis revealed the lower miR-5100 expression in the highly metastatic pancreatic cancer cell, and we found the fact that the expression of PODXL, a target gene of miR-5100, correlates with the patients' survival and the frequency of liver metastasis. PODXL knock down in the pancreatic cancer cell decreased its aggressive phenotype, suggesting that PODXL is a potential therapeutic target to inhibit liver metastasis.

Further, observation of the liver and lung metastasis mouse model revealed the fact that liver metastases contains significantly more α -SMA positive stromal cells than lung metastases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 肝転移 間質リモデリング

1. 研究開始当初の背景

膵癌は間質細胞が多くを占めるDesmoplasiaを病理学的特徴とする。近年、癌細胞と間質の細胞が相互に作用しその悪性度を増す癌間質相互作用が報告されている。膵癌原発巣においては膵間質に存在する活性化した α -SMA陽性の膵星細胞(hPSCs)が癌細胞との癌間質相互作用により膵癌の進展を促進することが明らかとなっており。一方、膵癌肝転移巣の間質においても多くの α -SMA陽性の線維芽細胞を含め多様な間質細胞がみられ、原発巣と同様に膵癌の進展を促進する可能性が考えられるが、現在まで検討されておらずその役割は不明である。

2. 研究の目的

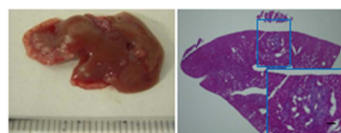
膵癌の肝転移に対して促進的に作用する特定の間質細胞集団およびその責任分子を同定し、それらを応用した新規膵癌治療法を開発し、癌間質のリモデリングにより膵癌の遠隔転移を制御し得る画期的な治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵癌細胞株をヌードマウスに同所移植してその肝転移巣を摘出し、5-7週間後にこの肝転移巣から癌細胞を樹立するという手技を5回繰り返すことで樹立した膵癌高肝転移株の網羅的遺伝子解析を行い、親株と比較することで肝転移に関わる遺伝子を明らかにする。
 (2) 上記(1)で発現の違いがみられた遺伝子に着目し、抑制実験を行うことで、目的の遺伝子が膵癌肝転移に与える影響を解析する。
 (3) 膵癌自然発生マウスである KPC (LSL-Kras G12D/+ ; LSL-Trp53 R172H/+ ; Pdx-1-Cre)マウスから outgrowth 法で膵癌細胞を樹立し、レンチウイルスを用いて膵癌細胞にGFPを導入する。この膵癌細胞をマウスに脾注・静注することでそれぞれ肝転移・肺転移モデルを作成する。マウスを早期に解剖することで微小転移巣の間質細胞を組織学的に評価する。

4. 研究成果

(1) ヒト膵癌細胞株である SUIT-2 をヌードマウスに同所移植し、4-7週間後に肝転移巣から癌細胞を樹立する手技を5回繰り返し、高肝転移株を作成した。樹立した高肝転移株 (MS) が親株と比較し



	autopsy after injection	numbers of metastasis
SUIT-2	5-7W	1/10
MS	5-7W	7/10

図1: 高肝転移株 (MS)は親株 (SUIT-2)と比較して高い転移能を有していた。

て高い転移能を有することを確認した(図1)。

樹立した高肝転移株と親株の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析を行い、高肝転移株で miR-5100 の発現が低下していることを発見した。miR-5100 の配列を元に、miR-5100 の標的遺伝子の候補を探索し、その中から他癌種で予後との関連が報告されている Podocalyxin (PODXL)に着目した。PODXL は腎系球体の足細胞で発現する蛋白として発見され、骨髄由来前駆細胞や血管内皮細胞に発現することや癌細胞においては細胞間接着を阻害することが報告されている。当科の膵癌切除症例での検討では、PODXL 高発現群は肝転移の頻度が高く、有意に予後不良であった(図2)。

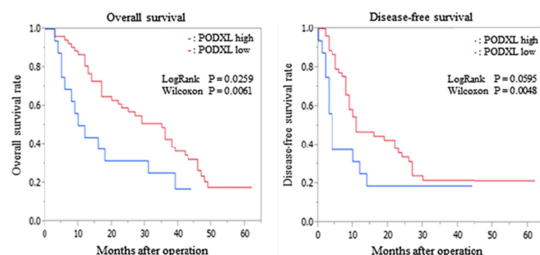


図2: PODXL高発現群は有意に予後不良であった。

(2) 膵癌細胞における miR-5100 および PODXL の機能を解析した。PODXL の 3' UTR には miR-5100 と相補的配列が存在し、miR-5100 mimic を SUIT-2 に導入すると用量依存的に PODXL の発現が低下することを確認した(図3)。次に RNA 干渉を用いて SUIT-2 の PODXL をノックダウンし、PODXL の機能を解析した。PODXL をノックダウンした SUIT-2 では明らかな形態的变化はみられなかったが(図4)、有意に遊走・浸潤能が低下した(図5)。このことから、膵癌の進展において PODXL が促進的に働くことが示唆された。

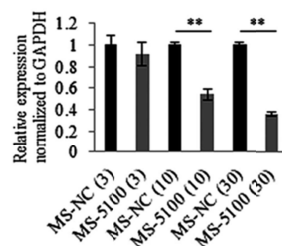


図3: miR-5100mimicを導入により用量依存的にPODXLの発現は低下した。

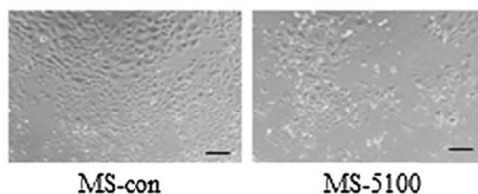


図4: miR-5100mimic導入による形態的变化はみられなかった。

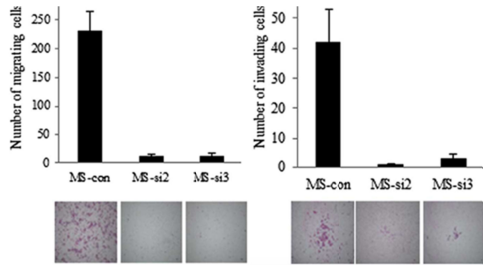
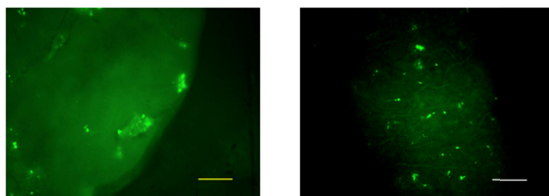


図5：PODXLノックダウンにより高肝転移株（MS）の遊走・浸潤能は減弱した。

(3) 膵癌自然発生マウスである KPC (LSL-Kras G12D/+ ; LSL-Trp53 R172H/+; Pdx-1 -Cre) マウスから outgrowth 法で膵癌細胞を樹立し、レンチウイルスを用いて膵癌細胞に GFP を導入した。この膵癌細胞をマウスに脾注・静注することでそれぞれ肝転移・肺転移モデルを作成した。このモデルでは摘出した臓器を蛍光顕微鏡で観察することで、早期の微小な転移巣であっても GFP 陽性の転移巣が形成されていることが確認できた (図6)。

膵癌細胞投与後 1-5 日で解剖を行い、肝転移巣、肺転移巣をそれぞれ組織学的に評価を行った結果、肝転移巣では全ての微小転移巣に α -SMA 陽性細胞が誘導されていたが、肺転移巣では α -SMA 陰性の転移巣もみられた。また、病巣に占める α -SMA 陽性の領域を比較すると有意に微小肝転移巣で広範囲にみられた (図7)。



微小肝転移巣 微小肺転移巣
図6：GFP陽性の微小転移巣 (Scale bar: 200 μ m)

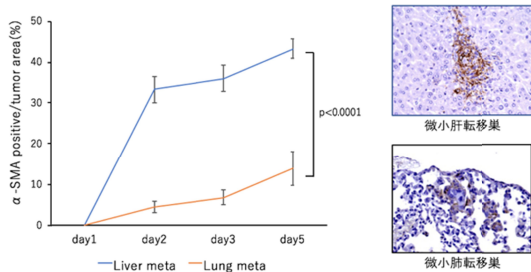


図7：病巣に占める α -SMA 陽性領域の経時的変化

さらに、肝・肺転移巣の観察を続けると、肝転移巣は肉眼的転移を形成するのに対し、肺転移は 10 日目以降消失した (図8)。このことから、転移巣の形成における癌細胞のセレクション機構には膵癌細胞側の要因だけでなく、間質側の要因が影響している可能性が

示唆された。

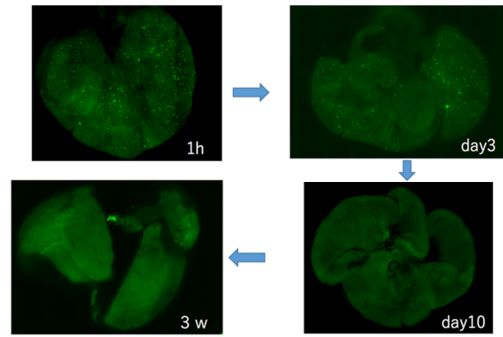


図8：肺転移巣の経時的変化

また、当科での膵癌切除症例を初発肝転移・肺転移症例に分けて検討を行った結果、有意に初発肺転移症例の方が予後良好であった (図9)。これらの結果から、膵癌の肝転移と肺転移は形成機序が異なる可能性が示唆された。

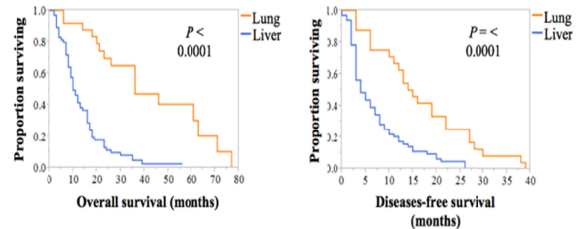


図9：初発肺転移症例は初発肝転移症例より有意に予後良好であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Yoshida M, Miyasaka Y, Ohuchida K, Okumura T, Zheng B, Torata N, Fujita H, Nabae T, Manabe T, Shimamoto M, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M., Calpain inhibitor calpeptin suppresses pancreatic cancer by disrupting cancer-stromal interactions in a mouse xenograft model., *Cancer Sci.*, 査読有, 107(10), 2016, 1443-1452, DOI: 10.1111/cas.13024

Chijiwa Y, Moriyama T, Ohuchida K, Nabae T, Ohtsuka T, Miyasaka Y, Fujita H, Maeyama R, Manabe T, Abe A, Mizuuchi Y, Oda Y, Mizumoto K, Nakamura M, *Int J Oncol*, 査読有, 48(4), 2016, 1688-1700, DOI:10.3892/ijo.2016.3389.

Horioka K, Ohuchida K, Sada M, Zheng B, Moriyama T, Fujita H, Manabe T, Ohtsuka T, Shimamoto M, Miyazaki T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Suppression of CD51 in pancreatic stellate cells inhibits

tumor growth by reducing stroma and altering tumor-stromal interaction in pancreatic cancer., Int J Oncol, 査読有, 48(4), 2016,1499-1508, DOI:10.3892/ijo.2016.3374.

Zheng B, Ohuchida K, Chijiwa Y, Zhao M, Mizuuchi Y, Cui L, Horioka K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Tanaka M., CD146 attenuation in cancer-associated fibroblasts promotes pancreatic cancer progression, Mol Carcinog, 査読有, 55(11), 2016,1560-1572, DOI : 10.1002/mc.22409.

Zheng B, Ohuchida K, Cui L, Zhao M, Shindo K, Fujiwara K, Manabe T, Torata N, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Zheng B, Ohuchida K, Cui L, Zhao M, Shindo K, Fujiwara K, Manabe T, Torata N, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M, Int J Oncol, 査読有, 47(2), 2015, 490-498, DOI: 10.3892/ijo.2015.3022.

〔学会発表〕(計 6 件)

吉田真樹、大内田研宙、千々岩芳朗、奥村隆志、田中友晴、佐田政史、堀岡宏平、藤原謙次、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、高畑俊一、小田義直、水元一博、中村雅史、癌と間質を同時に標的とするカルパイン阻害薬カルペプチンの膵癌に対する治療効果の検討, 第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年 4 月 14 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

佐田政史、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、堀岡宏平、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、小田義直、中村雅史、低酸素下膵星細胞による癌間質マトリックス・リモデリングは膵癌浸潤能を増強する, 第 116 回日本外科学会, 2016 年 4 月 14 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

堀岡宏平、大内田研宙、佐田政史、鄭彪、千々岩芳朗、吉田真樹、奥村隆志、遠藤翔、阿部俊也、肥川和寛、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、小田義直、中村雅史、膵癌における CD51 発現は予後と相関する, 第 116 回日本外科学会, 2016 年 4 月 14 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

肥川和寛、大内田研宙、佐田政史、武居晋、中山宏道、阿部俊也、遠藤翔、奥村隆志、吉田真樹、千々岩芳朗、堀岡宏平、森山大樹、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、大内田理一、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、膵星細胞は基質リモデリングにより、leading cell として膵

癌浸潤を先導する, 第 116 回日本外科学会, 2016 年 4 月 14 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

吉田真樹、大内田研宙、千々岩芳朗、奥村隆志、田中友晴、佐田政史、堀岡宏平、藤原謙次、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、高畑俊一、小田義直、水元一博、田中雅夫、calpain 阻害剤である calpain による膵癌細胞及び膵星細胞への抑制効果の検討, 第 115 回日本外科学会, 2015 年 4 月 16 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

遠藤翔、仲田興平、大内田研宙、阿部俊也、肥川和寛、堀岡宏平、水内祐介、小田義直、水元一博、田中雅夫、オートファジーが膵癌の癌間質相互作用に与える影響の検討, 第 46 回日本膵臓学会大会, 2015 年 6 月 19 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 逸人(FUJITA, Hayato)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号: 40611281

(2) 研究分担者

前山 良(MAEYAMA, Ryo)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号: 10611668
(2014 年度)

田中 雅夫(TANAKA, Masao)

九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：30163570
(2014年度)

江上 拓哉 (EGAMI, Takuya)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：40507787

真鍋 達也 (MANABE, Tatsuya)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：60546464
(2014年度)

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()