

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830081

研究課題名(和文) 膵癌におけるSMAD4の発現と微小環境構築による癌進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Color-coded intravital imaging demonstrates a transforming growth factor B antagonist selectively targets stromal cells in a human pancreatic-cancer orthotopic mouse model

研究代表者

廣島 幸彦 (HIROSHIMA, Yukihiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60718021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Fluorescent-PDOXモデル(fPDOX)を用い、膵癌におけるTGF- $\beta$ 阻害薬のTMEへの効果を検討した。fPDOXにTGF- $\beta$ 阻害薬を投与し、生体内リアルタイムイメージングにより、TMEの変化と抗腫瘍効果を観察した。TGF- $\beta$ 阻害薬投与群では有意に膵癌間質の減少がみられた。腫瘍体積に関しては差を認めなかった。また、TGF- $\beta$ 阻害薬投与群ではTGF- $\beta$ 発現の低下がみられた。微小血管増生はTGF- $\beta$ 阻害薬投与群で有意に減少していた。TGF- $\beta$ 阻害薬とGemcitabineの併用は、Gemcitabine単剤投与群に比べて腫瘍増殖抑制効果が認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The present study describes the ability of color-coded intravital imaging to demonstrate the efficacy of a TGF- $\beta$  inhibitor to target stroma in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. The PDOX, which has a high TGF- $\beta$  expression level, was used in an orthotopic model in transgenic nude mice ubiquitously expressing red fluorescent protein (RFP). Fourteen mice were randomized into a control group (n = 7, vehicle, i.p., weekly, for 3 weeks) and a treated group (n = 7, SB431542 [TGF- $\beta$  receptor type I inhibitor] 0.3 mg, i.p., weekly, for 3 weeks). Stromal cells expressing RFP were observed weekly for 3 weeks by real-time color-coded intravital imaging. The RFP fluorescence area from the stromal cells was significantly decreased in the TGF- $\beta$ -inhibitor-treatment group compared to the control group. The present study demonstrated color-coded imaging in Fluorescent-PDOX mouse model can readily detect the selective anti-stromal-cell targeting of a TGF- $\beta$  inhibitor.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 微小環境 マウスモデル 蛍光イメージング SMAD4 TGF-

### 1. 研究開始当初の背景

癌の微小環境 (Tumor microenvironment; TME) には CAF (cancer associated fibroblast) や TAM (Tumor associated macrophage) と称される活性化された線維芽細胞やマクロファージなどが存在し、癌の進展を多面的に促進させている (Bardeesy N et al.: *Nature Rev.Cancer*, 2, 897, 2002)。特に膵癌では TME の増生 (desmoplasia) が顕著であり、TME の構造は癌細胞によって積極的に構築され、様々な側面から癌の進展 (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。また、Drug delivery の観点からも TME は重要な役割を担っており、TME を正常化することができれば、癌の進展を間接的に抑制するだけでなく、従来の抗癌剤を効率良く癌細胞に到達させることが可能となり、更なる効果が期待できる。実際、CAF や TAM 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 (Kalluri R et al.: *Nature Rev.Cancer*, 6, 392, 2006; Michele De Palma and Claire E. Lewis: *Cancer Cell*, 23, 277, 2013) ことが実証され、TME は癌治療の新たな標的として注目を集めている。

TME の増生に重要な働きをしているのが Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) である。TGF- $\beta$  は SMAD4 を介して上皮細胞の増殖を抑制している一方、膵癌組織において高発現し、TME を構築、膵癌の進展を促進させ、予後を増悪させている。 (Bardeesy N et al.: *Nature Rev.Cancer*, 2, 897, 2002; Friess H et al.: *Gastroenterology*, 105, 1846, 1993)。膵癌患者では約 55% で SMAD4 が欠失しており (S.A. Hahn et al.: *Science*, 271, 350, 1996)、SMAD4 の欠失は膵癌の転移と相関し、予後不良因子として報告されている (Iacobuzio-Donahue CA et al.: *J Clin Oncol*, 27, 1806, 2009)。これらの結果から、SMAD4 欠失膵癌では、TGF- $\beta$  による増殖抑制作用を回避していると同時に、ポジティブフィードバックにより TGF- $\beta$  の発現が上昇し、TME の増生を介して癌の進展を促進している可能性が示唆されているが、未だ膵癌における SMAD4 の欠失と TME の増生について明らかにした報告はなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、fluorescent-PDX モデルを用い、TME の変化をリアルタイムに生体内で観察することにより、膵癌における SMAD4 の欠失と TME 増生による癌進展のメカニズムを解明し、TME を標的とした新規治療薬の開発の可能性を追求することである。

### 3. 研究の方法

#### 患者由来腫瘍片 (PDX) の樹立

SMAD4 の欠失膵癌患者から切除された腫瘍片を速やかに組織培養液に保存し、低温下に研

究所に輸送した。到着直後に腫瘍片を 5 mm 径の薄片に切り分け、即座にヌードマウスの皮下に移植し、樹立した。樹立された PDX はその後 RFP ヌードマウスの皮下で継代した。

#### Fluorescent-PDOX モデルの作成

継代された PDX を径 2 mm に細切し、前述の方法で速やかに RFP ヌードマウスの膵臓に同所性に移植し、Fluorescent-PDOX モデルを作成した。

#### Whole body imaging

OV-100 Small Animal Imaging System (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて各マウスモデルの明視野 (Bright field, BF) 観察および RFP それぞれの蛍光観察を行った。

#### Weekly intravital imaging

マウスモデルを治療前、Day 7, 14 および治療終了時 (Day 21) に Intravital imaging を施行下。それぞれの時点で十分な麻酔下に左側腹部に 5 mm 長の開腹を行い、膵臓および脾臓とともに腫瘍を創外に挙上した。腫瘍表面をメスでわずかに削ることで被膜を除去し、腫瘍内部の間質の観察が可能になる。止血を行った後、マウスを FV-1000 共焦点レーザー顕微鏡下に設置し、十分に消毒されたボードの上に腫瘍を固定した。観察を容易にするために、腫瘍の断面の上に消毒されたスライドガラスを乗せ、やや表面を圧迫した。観察は腫瘍内部がまんべんなく撮影範囲に入るように行い、RFP の発現領域をそれぞれ撮影する。RFP 発現領域/腫瘍組織存在領域を Stroma area ratio と定義した。撮影後、止血を再度確認し、6-0 ナイロン糸 (Ethilon, Ethicon, Inc. NJ, USA) で閉腹した。同方法によるマウスの術後死亡はみられず、計 4 回の Intravital imaging を問題なく完遂可能であった。

#### 治療プロトコール

##### (1) TGF- $\beta$ 阻害薬の治療効果

腫瘍径 7 mm 以上に発育した同モデル (n=14) を Control 群 (n = 7, 溶媒の腹腔内投与, 1 回/週, 3 週間) および治療群 (n = 7, SB431542 (TGF- $\beta$  阻害薬) 0.3 mg の腹腔内投与, 1 回/週, 3 週間) の 2 群にランダム化する。FV-1000 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用い、1 週間毎に Intravital imaging の手法により腫瘍内部の RFP 発現領域を撮影、定量する。Day 21 に腫瘍を切除し、凍結切片を用いて切除腫瘍の組織学的評価および蛍光領域定量を行った。

##### (2) TGF- $\beta$ 阻害薬と Gemcitabine との併用療法の抗腫瘍効果

腫瘍径 7 mm 以上に発育した同モデル (n=25) を Control 群 (n = 5 溶媒の腹腔内投与, 1 回/週, 3 週間)、TGF- $\beta$  阻害薬群 (n = 5, SB431542 0.3 mg の腹腔内投与, 1 回/週, 3 週間)、Gemcitabine 群 (n = 5, Gemcitabine 100mg/kg の腹腔内投与, 1 回/週, 3 週間)、併用療法群 A (n = 5, SB431542 0.3 mg の腹

腔内投与 + Gemcitabine 100mg/kg の腹腔内投与)、併用療法群 B(n=5, SB431542 0.3 mg の腹腔内投与+Gemcitabine 100mg/kg の静脈内投与)の 5 群にランダム化する。治療前, Day 7, 14, 21 に麻酔後小開腹をにおいて腫瘍径を測定する。Gemcitabine の抗腫瘍効果に対する TGF- 阻害薬の相加あるいは相乗効果を検討した。

### 凍結切片の組織学的評価

HE 染色は通常のプロトコールで行 30 分間インキュベートする。洗浄後、ヤギ血清で 10 分間ブロッキングし、一次抗体として抗 CD31 抗体 (Ab28364, ウサギ由来, Abcam, Cambridge, UK)、および抗 TGF- 1 抗体 (sc-146, ウサギ由来, Santa Cruz biotechnology, CA, USA)をそれぞれ 100 倍希釈して一晩 4 でインキュベートする。ビオチン標識抗ウサギ 2 次抗体 (Nichirei biosciences, Tokyo, Japan)で 10 分間インキュベート後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Nichirei biosciences, Tokyo, Japan)で 5 分間インキュベートし、DAB substrate kit (BD bioscience, NJ, USA)で 3-5 分間発色させる。最後に切片をヘマトキシリンで対比染色し BH-2 顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan)で観察および撮影する。Microvessel density を、同一切片における強拡大視野 3 視野分の CD31 陽性微小血管数の平均と定義した。

### 4. 研究成果

#### TGF- 阻害薬治療効果

コントロール群に対し、TGF- 阻害薬群では Day 7 から Day 21 にかけて有意に腫瘍間質の減少がみられた (図 1, 図 2C)。腫瘍体積および体重変化に関しては両群に有意差を認めなかった (図 2A, B)。

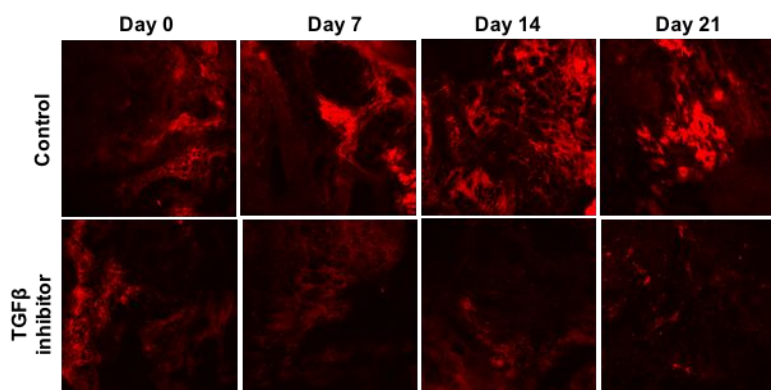


図 1 TGF- 阻害薬による腫瘍間質への効果

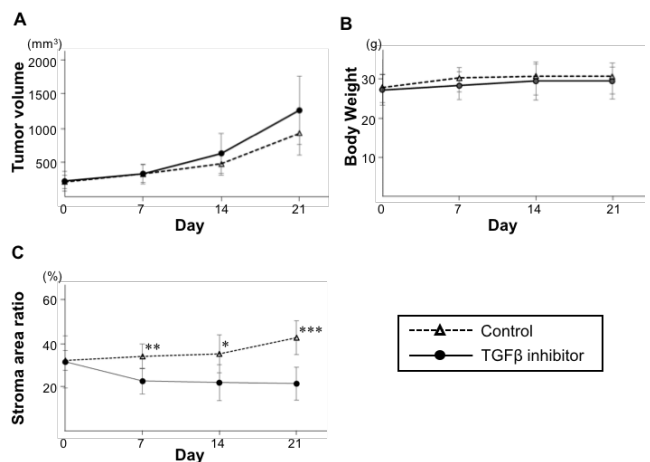


図 2 TGF- 阻害薬による腫瘍マウスモデルへの影響

#### 腫瘍切除標本の TGF- 発現強度および Microvessel density

コントロール群では TGF- の発現が特に腫瘍間質領域に高度に認められたが、TGF- 阻害薬投与群では発現の低下がみられた (図 3)。抗 CD31 抗体で染色した微小血管増生は TGF- 阻害薬投与群で有意に減少していた (図 3、図 4)。

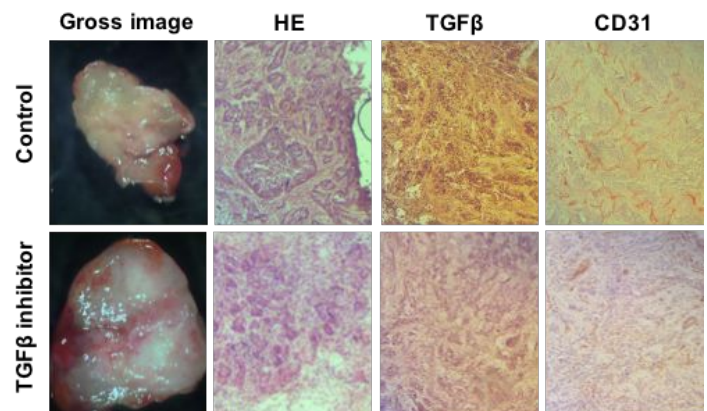


図 3 TGF- 発現と Microvessel density

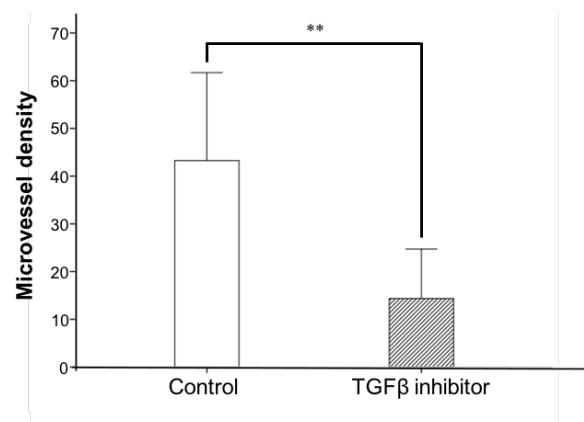


図 4 TGF- 阻害薬と Microvessel density

### TGF- 阻害薬と Gemcitabine の併用効果

TGF- 阻害薬と Gemcitabine 腹腔内投与併用あるいは Gemcitabine 静脈内投与併用群は、Gemcitabine 単剤投与群に比べて腫瘍増殖抑制効果が認められなかった(図5)。併用療法群では、TGF- 阻害薬が腫瘍間質の増生を制御することにより、Gemcitabine の drug delivery を改善し、更なる抗腫瘍効果を期待したが、本検討では、Gemcitabine 単剤投与群と差を認めなかった。TGF- 阻害薬が微小血管の増生も同時に抑制し、Gemcitabine の drug delivery が改善されなかったことが原因と推察された。

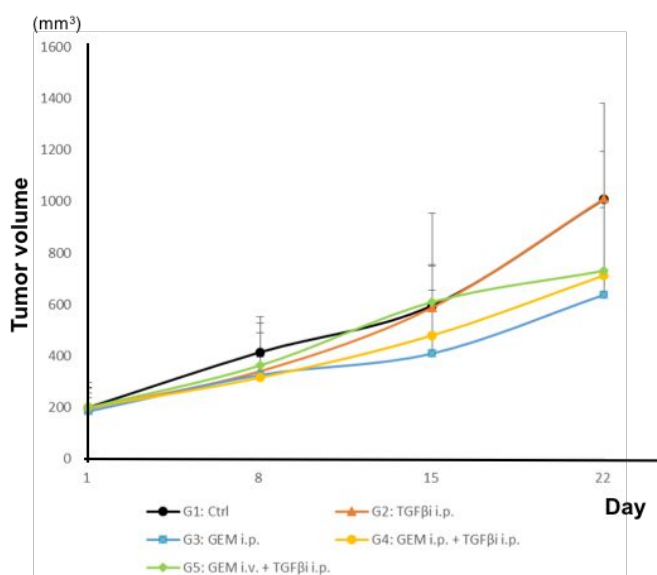


図5 TGF- 阻害薬と Gemcitabine の併用効果

これらの結果から、Fluorescent-PDOX モデルを用いることで、膵癌間質を生体内でリアルタイムに観察することが可能であった。TGF- 阻害薬は膵癌間質の増生を有意に減少させたが、微小血管の増生も同時に抑制し、Gemcitabine の drug delivery が改善されなかった可能性が示唆された。

#### 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7件)

Recombinant methioninase effectively targets a Ewing's sarcoma in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude-mouse model.

Murakami T, Li S, Han Q, Tan Y, Kiyuna T, Igarashi K, Kawaguchi K, Hwang HK, Miyake K, Singh AS, Nelson SD, Dry SM, Li Y, Hiroshima Y, Lwin TM, DeLong JC, Chishima T, Tanaka K, Bouvet M, Endo I, Eilber FC, Hoffman RM. Oncotarget. 2017 Mar 1.

doi: 10.18632/oncotarget.15823. [Epub ahead of print] 査読有

Color-coded intravital imaging demonstrates a transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) antagonist selectively targets stromal cells in a human pancreatic-cancer orthotopic mouse model.

Murakami T, Hiroshima Y, Miyake K, Hwang HK, Kiyuna T, DeLong JC, Lwin TM, Matsuyama R, Mori R, Kumamoto T, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM. Cell Cycle. 2017 Apr 25:1-7.

doi: 10.1080/15384101.2017.1315489. 査読有

Effective fluorescence-guided surgery of liver metastasis using a fluorescent anti-CEA antibody. Hiroshima Y, Lwin TM, Murakami T, Mawy AA, Kuniya T, Chishima T, Endo I, Clary BM, Hoffman RM, Bouvet M.

J Surg Oncol. 2016 Dec;114(8):951-958.

doi: 10.1002/jso.24462. Epub 2016 Oct 3. 査読有

Patient-derived mouse models of cancer need to be orthotopic in order to evaluate targeted anti-metastatic therapy.

Hiroshima Y, Maawy A, Zhang Y, Zhang N, Murakami T, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM.

Oncotarget. 2016 Nov 1;7(44):71696-71702. doi: 10.18632/oncotarget.12322. 査読有

Fluorescence-guided surgery, but not bright-light surgery, prevents local recurrence in a pancreatic cancer patient derived orthotopic xenograft (PDOX) model resistant to neoadjuvant chemotherapy (NAC). Hiroshima Y, Tanaka K et al.(13人中1番目) Pancreatology. 2015 May-Jun;15(3):295-301. 査読有

Photoimmunotherapy Inhibits Tumor Recurrence After Surgical Resection on a Pancreatic Cancer Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Nude Mouse Model. Hiroshima Y, Tanaka K et al.(12人中1番目) Ann Surg Oncol. 2015 Apr 17. [Epub ahead of print] 査読有

Efficacy of tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R in combination with anti-angiogenesis therapy on a pancreatic cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) and cell line mouse models. Hiroshima Y, Tanaka K et al.(18人中1番目) Oncotarget. 2014 Dec 15;5(23):12346-57. 査読有

[学会発表](計8件)

Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) inhibitor modulates cancer stroma in a pancreatic cancer orthotopic mouse model

Takashi Murakami, Yukihiko Hiroshima, Kentaro

Miyake, Tasuku Kiyuna, Ho Kyoung Hwang, Kei Kawaguchi, Jonathan C. DeLong, Thinzler M. Lwin, Kentaro Igarashi, Ryusei Matsuyama, Ryutaro Mori, Takafumi Kumamoto, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman.  
*AACR Annual Meeting, April 1-5, 2017, Washington, D.C., USA.*

Tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R promotes CD8+ T cell infiltration in pancreatic cancer in an orthotopic syngeneic mouse model  
Takashi Murakami, Yukihiko Hiroshima, Yong Zhang, Ming Zhao, Tasuku Kiyuna, Ryusei Matsuyama, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman.  
*AACR Annual Meeting, April 16-20, 2016, New Orleans, Louisiana, USA.*

Imaging formation of the tumor microenvironment in orthotopic liver tumors in red fluorescent protein (RFP) transgenic nude mice  
Atsushi Suetsugu, Yukihiko Hiroshima, Takuro Matsumoto, Kosuke Hasegawa, Miki Nakamura, Masahito Shimizu, Shigetoyo Saji, Hisataka Moriwaki, Michael Bouvet, Robert M. Hoffman.  
*AACR Annual Meeting, April 16-20, 2016, New Orleans, Louisiana, USA.*

Tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R efficacy on colon cancer liver metastasis alone and in combination with fluorescence-guided surgery  
Takashi Murakami, Yukihiko Hiroshima, Yong Zhang, Ming Zhao, Ryusei Matsuyama, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman.  
*AACR Annual Meeting, April 16-20, 2016, New Orleans, Louisiana, USA.*

Fluorescence-guided surgery with an anti-CA19-9-conjugated fluorophore in combination with neoadjuvant chemotherapy inhibits metastatic recurrence in a pancreatic cancer patient derived orthotopic xenograft (PDOX) nude mouse model.  
Hiroshima Y, Tanaka K et al.(12人中1番目)  
*AACR annual meeting, April, 2015, Philadelphia, USA.*

Efficacy of photo-immunotherapy in combination with surgical resection on a pancreatic cancer patient derived orthotopic xenograft (PDOX).  
Hiroshima Y, Tanaka K et al.(12人中1番目)  
*AACR annual meeting, April, 2015, Philadelphia, USA.*

膵癌ヒト腫瘍移植片 (PDX) を用いた蛍光ガイド下手術と術前化学療法併用の有用性の検討。  
廣島幸彦、田中邦哉 他、(12人中1番目)。  
日本消化器外科学会、2015年7月、浜松。

膵癌ヒト腫瘍移植片 (PDX) を用いた術中 photoimmunotherapy の有用性の検討。  
廣島幸彦、田中邦哉 他、(12人中1番目)。  
日本肝胆膵外科学会、要望演題、2015年6月、東京。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.ycusurg2.jp/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
廣島 幸彦 (HIROSHIMA, Yukihiko)  
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号 : 60718021

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者