

令和元年6月18日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16535

研究課題名(和文)膵癌における血管外血小板凝集とMicroRNA21を介した進展の検討

研究課題名(英文)Examination of extravasated platelet aggregation and progression via MicroRNA 21 in pancreatic cancer

研究代表者

山口 貴久(Yamaguchi, Takahisa)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：50781142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌局所での、血管外血小板凝集と腫瘍の増殖進展に関する分子細胞学的な事象に関してはほとんど明らかとなっていない。本研究では、ヒト血小板の膵癌細胞に及ぼす影響を検討した。健康人より得られた血小板と膵癌細胞株の共培養にて膵癌細胞の浸潤能の増加を認め、また癌抑制遺伝子であるPTENの発現低下を認めた。さらに膵癌細胞への接着に関してはCD44 standard formを有し、上皮間葉転換を認める細胞株に有意に接着した。またCD44 standard formを発現誘導することにより血小板の接着増加を認め、膵癌細胞と血小板接着、凝集にはCD44 standard formが関与す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

膵癌は難治癌の一つとされ、治療成績向上は急務である。これまでの報告では血管内血小板による癌細胞のcloak形成、免疫寛容の報告は認めているが、癌局所での血管外血小板凝集と腫瘍の増殖進展に関する分子細胞学的な事象に関してはほとんど明らかとなっていなかった。本研究では血小板と膵癌の接着、凝集にはCD44 standard formが重要であることが示唆された。EMTを起こした膵癌細胞を取り囲むようにして存在する血小板は、癌局所において免疫逃避となり、血管内に侵入しやすい状態を形成する。すなわち、pre-metastatic nicheを形成し、浸潤、転移を促進していると推察される。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the molecular cytological events involved in extravasated platelet aggregation (EPA) and tumor progression in cancer microenvironment. In this study, we examined the effect of human platelets on pancreatic cancer cells. Co-culture of platelets obtained from healthy volunteers and pancreatic cancer cell lines showed an increase in invasion ability for pancreatic cancer cells, and also decreased in expression of PTEN, a tumor suppressor gene. Moreover, expression of CD44 standard form concerned to adhesion to pancreatic cancer cells for platelets. In addition, expression of the CD44 standard form increased the adhesion between platelets and pancreatic cancer cells, suggesting that CD44 standard form involved in pancreatic cancer cell and platelet adhesion.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 血管外血小板凝集 CD44 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治癌の一つとされ、本邦において肺癌、胃癌、大腸癌、に続いて癌死の第4位へと増加している癌であり治療成績向上は急務である。新たな治療戦略として癌の進展・転移を促進する癌微小環境への介入が重要と考えられる。これまでに癌微小環境における血小板が癌の進展・転移を促進する一因であることが報告されている。癌微小環境における血小板の役割として血管内に侵入した癌細胞は周囲に血小板を凝集(cloak)し、血流などの物理的ストレスや免疫担当細胞の攻撃から逃れ(免疫寛容)、また血小板が放出する様々な増殖因子(TGF- $\beta$ 、VEGF-A、PAI-1、PDGF)により癌の進展に関与しているとされる。また血管内血小板が癌細胞の上皮間葉転換を誘導し転移を促進しているとも推察されている。一方で原発巣での血小板の存在や役割に関してはほとんど報告がなく明らかとなっていない。核を有しない血小板は、組織検体ではその存在すらほとんど注目されないことがその一因と考えられる。申請者らはこれまでに、膵癌原発巣の切除標本にて腫瘍細胞先進部での血小板の凝集(CD42b)を確認し、これを血管外血小板凝集(Extravasated platelet aggregation: EPA)と称して報告してきた。EPAの起こるメカニズムや腫瘍進展作用に関しては分かっていないことが多い。

#### 2. 研究の目的

本研究は難治性固形癌の一つとされる膵癌に対して、血管外血小板凝集(EPA)と膵癌細胞への取り込み、microRNA21を介した膵癌の増悪・進展を検討し明らかにすることを目的とした。また膵癌細胞株の形質とEPAの発生の相違から、膵癌細胞と血小板凝集のメカニズムを解明することも目的とした。

#### 3. 研究の方法

血小板の抽出と活性化血小板、休止血小板の作成

血小板と膵癌細胞株の共培養による血小板接着と取り込み

血小板と共培養における膵癌細胞株の浸潤能の変化

血小板と共培養を行った膵癌細胞株の形質変化

膵癌細胞株の発現蛋白(CD44 standard form, variant isoform等の確認)、EMTとの関連

BxPC-3のTGF- $\beta$ によるEMT誘導と血小板接着能の変化

Panc-1細胞株のCD44発現抑制と血小板凝集の関連

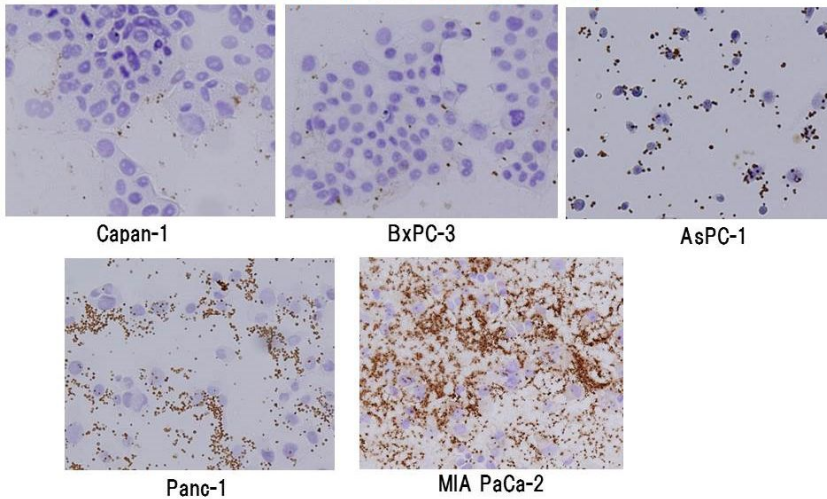
#### 4. 研究成果

血小板は末梢血採血を行い、遠心分離(200×g, 10min, RT)し多血小板血漿(PRP)より血小板を抽出する。PRPをさらに遠心分離(1000×g, 15min, RT)し乏血小板血漿(PPP)採取を行う。Citrate buffer、Tyrode-Hepes-2-bufferを用いてPPPを洗浄することにより休止血小板を得ることが出来た。

申請者らは膵癌細胞株panc-1と蛍光ラベリングPKHを施行した活性化血小板の共培養を行い、Panc-1内に血小板内に取り込まれることを確認した。一方で、接着性実験も行ったところ、Panc-1と血小板との共培養において多くの血小板接着を認めた。その他膵癌細胞株(Capan-1、BxPC-3、AsPC-1、MIA Paca-2)でも同様に検討したところAsPC-1、MIA Paca-2にて血小板の接着を認めた(Figure1)。

Fig1

## Anti p-selectin antibody



活性化血小板と共培養を行った後、血小板を除去し、8  $\mu$ m pore sizeのmatrigel chamberを使用しinvasion assayを行った。血小板と共培養したPanc-1とcontrol（非共培養）で比較したところ、共培養群で有意な浸潤能の増加を認めていた（ $P < 0.01$ ）。

Panc-1と血小板を共培養の後にPTENをwestern blotにて測定したところ、その抑制が確認された。PTENは様々な悪性腫瘍においてDNAの変異を認める癌抑制遺伝子であり、PI3K/AKTシグナル伝達経路に対して負の制御をかけることで、癌の促進を抑制している。血小板との共培養にてPTENが抑制することにより腫瘍進展を促進していることが考えられた。しかしながら当初予定した血小板由来のmicroRNA21による変化であるとの証明は困難であった。以降の検討では腫瘍の性質と血小板接着のメカニズム解明を目的に検討を行った。

共培養にて血小板凝集を認めたAsPC-1、Panc-1、MIA PaCa-2はVimentinの高発現、E-cadherin低発現を認めており、上皮間葉転換(EMT)の状態であった。またCD44standard formの高発現、CD44 variant isoformの低発現を認めていた。一方でCapan-1やBxPC-3はEMTマーカーの発現を認めず、CD44standard form低発現を認めており（Figure2）、血小板接着にCD44 standard formの重要性が示唆された。

CD44standard form 低発現のBxPC-3をTGF- $\beta$  に約28日間曝露することによりCD44standard formの発現誘導、vimentinの発現を認めEMTが誘導されていることを確認した。これら細胞と血小板を共培養することにより血小板接着はTGF- $\beta$  に曝露されたBxPC-3にて優位に接着能が増加した（Figure3）。

CD44standard form 高発現のPanc-1細胞にCD44siRNAにてCD44 knock downを行うことにより、CD44standard formを抑制した。また、血小板との共培養にて血小板の接着性の減少を認めた（Figure4）。

Fig2

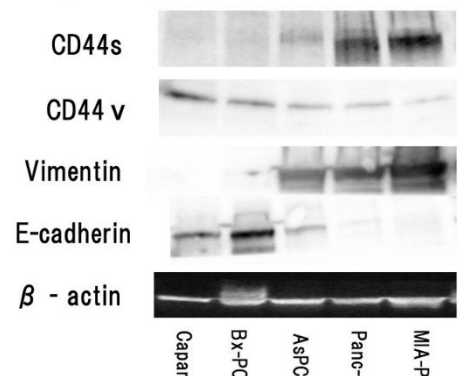
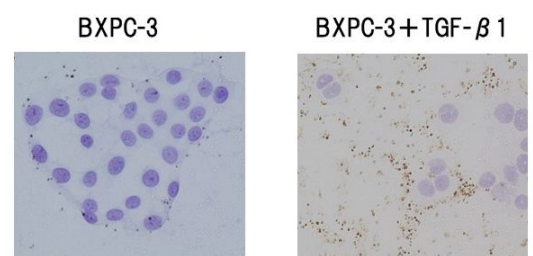
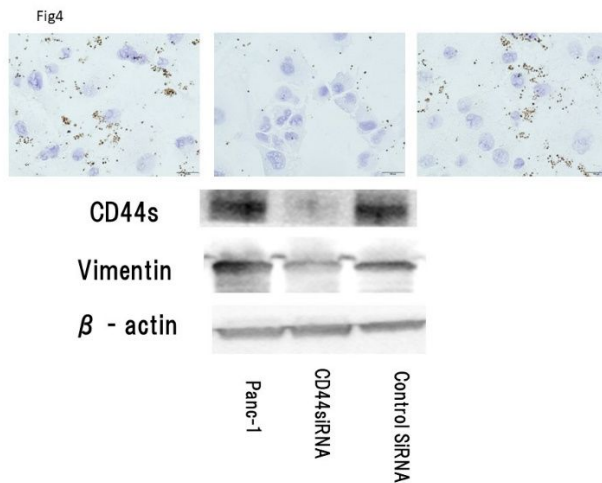


Fig3





## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

第73回 日本消化器外科学会 2018 膵癌におけるCD44 isoform発現と血小板凝集の関連に関する検討 発表者 山口 貴久

第40回 癌免疫外科研究会 2019 TGF- $\beta$ により上皮間葉転換を起こしたCD44発現膵癌細胞は、選択的スプライシング酵素(ESRP-1)とZEB-1転写因子を介して活性化血小板との接着性を亢進させ自然免疫応答を回避する 発表者 山口 貴久

〔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〕

6 . 研究組織 (1)研究代表者 山口 貴久 (Yamaguchi Takahisa) 金沢大学・附属病院・医員 研究者番号:50781142

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。