

**【要約】**

Metadherin promotes metastasis  
by supporting putative cancer stem cell properties and epithelial plasticity  
in pancreatic cancer

(メタドヘリンは癌幹細胞性質の獲得と上皮系細胞への転換により膵癌の転移形成を促進する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：大塚将之教授)

鈴木 謙介

## 【背景】

膵癌は最も予後不良な癌の一つであり、外科的切除が唯一の根治的治療である。しかし、診断時に既に遠隔転移を有し切除不能となる症例も多く、根治切除を施行しても、早期に転移再発する症例も少なくない。Rhim らは、膵癌発癌遺伝子改変マウスモデルにおいて、膵に前癌病変である PanIN が発生した段階で、既に、膵由来の上皮細胞が血中、さらには肝臓にまで及んでいることを示しており、膵癌はその発癌早期から既に微小転移を来している可能性が示唆された。遠隔転移の制御が悪性腫瘍の予後改善に有効であることは自明であるが、特に膵癌においては、発癌早期から存在しうる微小遠隔転移の制御が重要となると考えられる。また、近年では癌幹細胞仮説や上皮間葉移行 Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) の概念に基づく癌の浸潤、転移機構の解明が進んでおり、微小遠隔転移が臨床的に問題となる転移巣を形成するには、癌幹細胞性質 (stemness) や、遠隔臓器での間葉上皮移行 (MET) による再上皮化をきたす可塑性 (epithelial plasticity) が必要であるとの報告がなされ、注目を集めている。そこで、乳癌等様々な癌種で転移を促進し、癌幹細胞の活性化に関わると最近報告されている Metadherin (MTDH) という分子に着目し、MTDH を介した膵癌転移機構を解明し、膵癌転移治療の標的分子としての可能性を検討した。

## 【方法】

当科にて 2006 年から 2015 年までに根治切除術が施行された 134 例の浸潤性膵管癌標本の免疫組織染色 (IHC) にて、MTDH 発現と臨床病理学的因子及び予後との関連の解析を行った。ついで、human および mouse の膵癌細胞株を用いて in vitro での MTDH の膵癌転移における機能解析を行い、さらに膵癌モデルおよび膵癌肝転移モデルマウスを作成し、in vivo での MTDH と肝転移形成能との関連を検討した。

## 【結 果】

(免疫染色) IHC での MTDH 発現を scoring し、高発現群 (n=59) と低発現群 (n=75) の 2 群に分けると、血行性転移は高発現群で有意に多く ( $p=0.02$ )、予後も高発現群で有意に不良であった ( $p=0.006$ )。また、全生存期間に対する単変量、多変量解析において MTDH は独立した予後規定因子となった。

(MTDH 機能解析 in vitro, in vivo) 正常膵管細胞および 6 つの human の膵癌細胞株の MTDH 発現の多寡を検討すると、正常膵管細胞、原発膵癌細胞株に比べて、転移膵癌細胞株の方が MTDH の遺伝子およびタンパク発現が高い傾向にあり、MTDH が膵癌において転移に関わる可能性が示唆された。続いて、他の癌種での MTDH に関する解析を参考に、膵癌における MTDH と癌幹細胞性質 (stemness) との関係について検討を行った。MTDH 特異的な 2 種類の siRNA を用い、human および mouse の原発膵癌細胞株 (PANC-1、KPC1) および 膵癌肝転移細胞株 (CFPAC-1、KPC1Liv) の MTDH 発現を knockdown すると、肝転移細胞株においては human、mouse ともに有意な sphere 形成能の低下、CD133 陽性細胞数減少を認め、MTDH と stemness と関連が示唆されたが、原発膵癌細胞株においては有意な結果は得られなかったことから、MTDH は膵癌において、特に転移形成で stemness 維持に関与すると考えられた。次に、MTDH 特異的な 2 種類の shRNA にて MTDH を permanent に knockdown した mouse の膵癌細胞株 (KPCY) を作成し、さらなる検討を行った。まず、anoikis assay にて、細胞が細胞外基質から遊離された際に誘導される apoptosis (anoikis) と MTDH との関連を in vitro において評価したところ、MTDH の knockdown に伴い、膵癌細胞の anoikis 抵抗性が低下することが判明した。癌の転移成立の過程において必要な anoikis 抵抗性の維持にも MTDH が関与していることが確認された。

続いて in vivo での MTDH の機能解析を行った。まず、KPCY 細胞を nude mouse

の膵尾部被膜下に注入する膵癌モデルマウスを作製した。このモデルマウスにおいて、MTDH の knockdown により膵原発腫瘍容積および肝転移発生数が有意に抑制された。しかし、原発巣腫瘍容積縮小に伴い肝転移発生数が減少している可能性もあるため、同細胞を nude mouse の門脈に直接注入する膵癌肝転移モデルマウスを作製したところ、このモデルでも、MTDH knockdown に伴い有意に肝転移発生数が減少した。すなわち、MTDH は膵癌転移における浸潤の過程ではなく、転移臓器先での転移巣形成に関与している可能性が示唆された。さらにこのマウスモデル肝転移巣の蛍光免疫染色を行うと、上皮系マーカーである E-cadherin と MTDH が共発現していたため、膵癌細胞の遠隔臓器での上皮系への形質転換に MTDH が関与している可能性が示唆された。そこで、前述の KPC1Liv 細胞に対し TGF- $\beta$  を 4 時間暴露することで、膵癌細胞に上皮間葉移行 (EMT) およびそれに引き続く間葉上皮移行 (MET) を誘導すると、まず、過去の乳癌での報告と同様に、EMT を誘導する分子として知られる Twist1 の発現低下が膵癌においても MET の誘導に必要であることが判明し、さらに MTDH knockdown に伴い、この Twist1 の発現低下が阻害され、その結果、MET 誘導が阻害された。すなわち MTDH は膵癌において Twist1 発現を抑制することで、転移形成に必要な MET 誘導に関与する可能性が考えられた。

#### 【考察】

癌の進展における MTDH の機能については様々な癌種で検討されており、MTDH と stemness、EMT との関連が数多く報告されている。本検討では、膵癌においてもやはり MTDH と stemness が関連することが示唆されたが、特に膵癌転移細胞株でその傾向が強く認められたことは、MTDH が転移先の臓器における膵癌細胞の stemness に関わると考えられた。また、他の癌種の検討では MTDH は EMT の誘導に関わるとの報告がなされているが、本検討においては、MTDH は Twist1 の発現

抑制に伴う MET の誘導に関わる可能性が示唆され、一見相反する結果となった。しかし、近年では癌の転移の成立には上皮系、間葉系どちらの形態にも移行しやすい可塑性、特に上皮系形態へ移行しやすいこと、すなわち epithelial plasticity が重要とされている。そもそも浸潤能の高い癌である膵癌においては、特に転移先臓器における epithelial plasticity に強く関与し、増殖能を高め、膵癌転移を促進している可能性がある。本検討における、MTDH の anoikis 抵抗性に関する実験および in vivo から得られた結果もこの可能性を支持していた。

#### 【結論】

MTDH は浸潤性膵癌細胞の MET の誘導、stemness 獲得に重要な因子であり、膵癌の転移巣形成に関わる可能性が示唆された。MTDH を軸に更なる解析を行うことで、膵癌転移に対する epithelial plasticity に着目した新たな治療へ発展する可能性がある。