

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 峯岸 裕蔵

横浜市立大学大学院医学研究科
消化器・腫瘍外科学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学 教授 折館 伸彦

副査 横浜市立大学生命医科学研究科 生体機能医科学 教授 竹居 光太郎

副査 横浜市立大学大学附属病院 国際臨床肝疾患センター 准教授 斉藤 聡

博士の学位論文審査結果の要旨

CRMP4 Up-regulates M2 Macrophages and Myeloid-derived Suppressor Cells to Promote Pancreatic Cancer in Mice

(CRMP4はM2マクロファージとMDSCをup regulationしてマウスにおける膵癌進行を促進する)

1. 背景・目的

膵臓の前癌病変である膵上皮内腫瘍 (Pancreatic intraepithelial neoplasia; PanIN) は、組織学的に明確に定義された浸潤性膵管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma; PDAC) の前駆体である。ただし、PanINの進行の根底にある分子メカニズムは完全に解明されていない。第1報目の研究でHiroshima et al. (2013) は、ヒトPDACにおけるcollapsin response mediator protein (CRMP) 4の発現が予後不良と関連していたことを示した。第2報目の研究でSato et al. (2016) は、CRMP4の発現は膵炎モデルマウスでも増強されることを示した。第3報目の研究でYazawa et al. (2020) は、*LSL-KRAS^{G12D/+};Pdx1^{Cre/+}* (KC-*Crmp4^{wild}*) マウスの高グレードPanINの発生率は、KCマウスに*Crmp4*をノックアウトした*LSL-KRAS^{G12D/+};Pdx1^{Cre/+};Crmp4^{-/-}* (KC-*Crmp4^{-/-}*) マウスの発生率よりも高いこと、膵間質領域のCRMP4はKCマウスのPanINグレードと相関していることを示し、CRMP4の発現がPanINの発生または進行の根底にある可能性があることを示した。今回の研究では、PanIN部における遊走免疫細胞の発現をKC-*Crmp4^{wild}*マウスとKC-*Crmp4^{-/-}*マウスで比較した。さらに、マウス膵癌細胞であるPan02を皮下注して作製した皮下腫瘍を*Crmp4^{wild}*マウスと*Crmp4^{-/-}*マウスで比較した。

2. 対象及び方法

マウス実験の承認はプロトコールF-A-18-052「膵癌腫瘍免疫におけるCRMP4の役割」を申請し、横浜市立大学医学部の施設内動物管理使用委員会から取得した。

KC-*Crmp4^{wild}*マウスおよびKC-*Crmp4^{-/-}*マウスにコレシストキニンアナログであるセルレインの腹腔内注射を行い、PanIN病変を作製した。マウスの膵組織切片をhematoxylin and eosin (H-E) 染色し、PanINグレードを評価した。ヘルパーT細胞のマーカーであるCD4、細胞障害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) のマーカーであるCD8、B細胞のマーカーであるCD20、ナチュラルキラー細胞のマーカーである神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecule; NCAM) 1、制御性T細胞 (regulatory T cell; Treg) のマーカーであるFOXP3、M1マクロファージのマーカーであるCD68、M2マクロファージのマーカーである

CD163, 骨髄由来性抑制細胞 (myeloid derived suppressor cell; MDSC) のマーカーである CD11b に対する抗体を使用して免疫組織化学検査を行った. 続いて, *Crmp4^{wild}* マウスと *Crmp4^{-/-}* マウスにマウス膵癌細胞である Pan02 を皮下注移植して皮下腫瘍を作製し, 腫瘍径を 7 日毎に 63 日目まで計測した. さらに, その腫瘍に対し抗 Ki67 抗体と抗 CD163 抗体と抗 CD11b 抗体による免疫組織化学検査を行った.

3. 結果

高グレード PanIN に多い傾向は, 全体では CD163 高発現 ($P = 0.031$), CD11b 高発現 ($P = 0.027$) で有意差がみられた. KC-*Crmp4^{wild}* マウスのみでは, CD11b 高発現 ($P = 0.007$) で高グレード PanIN が多い傾向がみられた. KC-*Crmp4^{-/-}* マウスのみでは, 有意差がみられなかった.

Crmp4^{wild} マウスと *Crmp4^{-/-}* マウスに Pan02 を皮下注移植して作製した皮下腫瘍の腫瘍径を 7 日毎に 63 日目まで比較した実験では, *Crmp4^{wild}* マウスの方が *Crmp4^{-/-}* マウスより腫瘍径が大きい傾向がみられ, 皮下注移植後 7, 14, 21, 28 日目で $P < 0.01$, 皮下注移植後 35, 49 日目で $P < 0.05$ の有意差がみられた. 抗 Ki67 抗体による免疫組織化学検査で核陽性率を比較したところ, *Crmp4^{wild}* マウス (6.412 ± 5.25) が *Crmp4^{-/-}* マウス (4.997 ± 2.96) より高かったが, 有意差はみられなかった ($P = 0.490$). 高グレード PanIN で有意に高発現していた抗 CD163 抗体と抗 CD11b 抗体による免疫組織化学検査で陽性細胞率を比較したところ, 抗 CD163 抗体は *Crmp4^{wild}* マウス (4.058 ± 1.135) が *Crmp4^{-/-}* マウス (1.790 ± 1.170) より高く有意差がみられ ($P \leq 0.001$), 抗 CD11b 抗体でも *Crmp4^{wild}* マウス (0.615 ± 0.346) が *Crmp4^{-/-}* マウス (0.344 ± 0.241) より高く有意差がみられた ($P \leq 0.001$).

4. 考察

全体的に高グレード PanIN に多い傾向として CD163 高発現と CD11b 高発現で有意差がみられた. KC-*Crmp4^{wild}* マウスのみでは, 高グレード PanIN に多い傾向として CD11b 高発現で有意差がみられた. しかし, KC-*Crmp4^{-/-}* マウスは高グレード PanIN でも CD11b の高発現はみられなかった. これより, CRMP4 が MDSC を up regulation して PanIN 進行を促進していることが考えられた. 膵癌細胞皮下注移植の実験では, *Crmp4^{wild}* マウスの方が皮下腫瘍の成長が早い傾向がみられ, *Crmp4^{wild}* マウスの腫瘍に CD163 と CD11b が有意に高発現していた. これより, CRMP4 が M2 マクロファージと MDSC を up regulation して膵癌細胞増殖を促進していることが考えられた.

審査にあたり、以上の論文内容の説明がなされた後、以下の質疑応答が行われた。

まず、竹居副査より次の質問がなされた。

- 1) MDSC や M2 マクロファージの細胞内に CRMP4 が発現していると考えているのか、CRMP4 は細胞内分子と認識しているが、細胞外の間質に分泌されているということなのか。
- 2) 体重は皮下注前から有意差が出ており、皮下注後ではなく増加率で評価すべきだったのではないか
- 3) Ki67 で有意差が出てないが腫瘍径で有意差が出たのをどう考えているのか。
- 4) *Crmp4* をノックダウンした Pan02 細胞を移植した場合の検証も必要だったのではないのか。

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) MDSC や M2 マクロファージが細胞内に直接発現しているとは考えておらず、前研究で矢澤 Dr. が示したように間質の腓星細胞に発現していると考えている。免疫担当細胞のマーカーと CRMP4 がどうマージしているかなどの検証が足りなかったと考えられる。
- 2) 多くの類似研究で皮下注前後の体重を報告していたので記載したが、増加率で評価すべきだったと考えられる。
- 3) 前研究の廣島 Dr. が *in vitro* で示したように、増殖能ではなく浸潤能に関与して有意差が出たと考えられる。
- 4) 今後、その検証を行うことを検討する。

次に、齊藤副査より次の質問がなされた。

- 1) この研究において、どのパートを担っているのか。
- 2) 今後、膵癌における *Crmp4* ノックアウトの上乗せ効果を、どのように評価しようと考えているのか？

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) PanIN 検体の作製までは前研究で矢澤 Dr. が行ったが、その免疫染色は自分が行った。膵癌異所性移植モデルの実験は、すべて自分が行った。
- 2) 膵癌に効果が示されている Gemcitabine 療法を KPC マウスと KPC-*Crmp4*^{-/-}マウスに行い比較する実験を計画している。抗 CRMP4 抗体を治療薬とした検証を考慮したが、高額なポリクローナル抗体しか市販されていない。今後、オルガノイドを用いて *Crmp4* をノックアウトする検証も考えている。

次に、折館主査より以下の質問がなされた

- 1) PanIN 0 と 1 はどのぐらいの割合だったのか. PanIN2, 3 と判定されたマウスは PanIN1 の部位もあるのではないのか. その 1 匹の中で免疫担当細胞の違いを調べた場合, どのような結果が予測されるか?
- 2) PanIN の実験も皮下注移植の実験と同様に ImageJ を使用して評価すべきだったのではないのか.
- 3) Pan02 細胞に CRMP4 が発現しているのかを検証したのか.
- 4) CRMP4 が癌細胞と間質のどちらで発現しているのが大事だと考えているのか.

この質問に対して以下のように回答が行われた.

- 1) PanIN0 のマウスはおらず, 1A と 1B が半分ずつみられた. 1 匹内で最も PanIN grade の高い部位での評価しかしていないが, そういった検証も必要だったと考えられる.
- 2) そうすべきであったと考えられる.
- 3) 検証していない. すべきであったと考えられる.
- 4) マウス PanIN 検体を CRMP4 で免疫染色した結果, PanIN の間質領域に中心に発現しており, 間質における CRMP4 の発現が重要と考えている.

以上のように各質問に対して, 適切な回答がなされた. 本研究によって, CRMP4 阻害が膵癌の治療薬になる可能性が示唆され, 当該分野の今後の研究に寄与するものと考えられた. 申請者は質疑応答に対して的確に返答し, 本課題について十分な理解を持って研究を遂行したことを証明した. 以上より本研究は博士(医学)の学位論文に値するものと判断した.