

学位論文の要約

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)

September, 2022

(2022 年 09 月)

Yuzo Minegishi

峯岸 裕蔵

Gastroenterological Surgery

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 消化器・腫瘍外科学

(Doctoral Supervisor : Itaru Endo, Professor)

(指導教員 : 遠藤 格 教授)

学位論文の要約

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)

<https://ar.iiarjournals.org/content/42/2/791.long>

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。(表 1)

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。(図 1)

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 ($P \leq 0.001$) 。

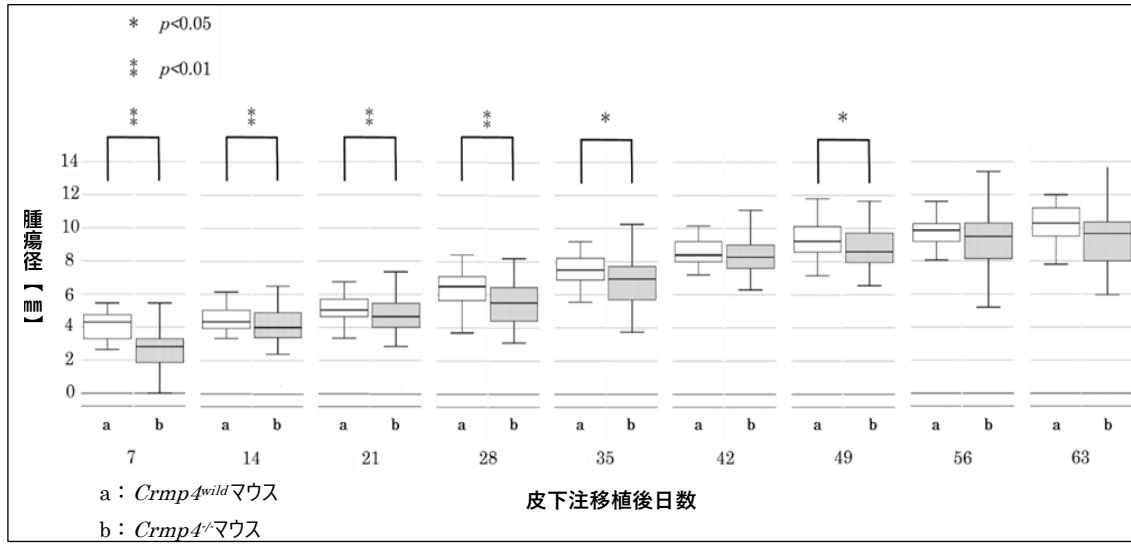
4. 考察

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。

(表1) PanIN 病変部における免疫遊走細胞の免疫組織化学検査の結果

変数		all PanIN		p 値	<i>Crmp4^{wild}</i> PanIN		p 値	<i>Crmp4^{-/-}</i> PanIN		p 値
		0-1 (n=12)	2-3 (n=18)		0-1 (n=5)	2-3 (n=14)		0-1 (n=7)	2-3 (n=4)	
		CD4 (helper T cell)	low	4	5	0.528	2	3	0.397	2
	high	8	13	3	11		5	2		
CD8 (CTL)	low	12	18	-	5	14	-	7	4	-
	high	0	0		0	0		0	0	
CD20 (B lymphocyte)	low	9	17	0.163	5	13	0.737	4	4	0.212
	high	3	1		0	1		3	0	
NCAM1 (natural killer cell)	low	5	11	0.296	2	7	0.556	3	4	0.106
	high	7	7		3	7		4	0	
FOXP3 (Treg)	low	12	17	0.600	5	13	0.737	7	4	-
	high	0	1		0	1		0	0	
CD68 (M1 macrophage)	low	12	13	0.060	5	9	0.172	7	4	-
	high	0	5		0	5		0	0	
CD163 (M2 macrophage)	low	12	12	0.031	5	9	0.172	7	3	0.364
	high	0	6		0	5		0	1	
CD11b (MDSC)	low	6	2	0.027	4	2	0.007	2	0	0.382
	high	6	16		1	12		5	4	

(図1) 移植後7日毎に測定した皮下腫瘍径の両群の比較



引用文献

Hiroshima, Y., Nakamura, F., Miyamoto, H., Mori, R., Taniguchi, K., Matsuyama, R., Akiyama, H., Tanaka, K., Ichikawa, Y., Kato, S., Kobayashi, N., Kubota, K., Nagashima, Y., Goshima, Y. and Endo, I. (2013), Collapsin response mediator protein 4 expression is associated with liver metastasis and poor survival in pancreatic cancer, *Ann Surg Oncol*, 20, S369–S378.

Sato, S., Nakamura, F., Hiroshima, Y., Nagashima, Y., Kato, I., Yamashita, N., Goshima, Y. and Endo, I. (2016), Caerulein-induced pancreatitis augments the expression and phosphorylation of collapsin response mediator protein 4, *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 23, 422–431.

Yazawa, K., Nakamura, F., Masukawa, D., Sato, S., Hiroshima, Y., Yabushita, Y., Mori, R., Matsuyama, R., Kato, I., Taniguchi, H., Goshima, Y. and Endo, I. (2020), Low Incidence of High-Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Lesions in a Crmp4 Gene-Deficient Mouse Model of Pancreatic Cancer, *Transl Oncol*, 13, 100746.

論文目録

I 主論文

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

Minegishi Y, Hiroshima Y, Yazawa K, Sato S, Yabushita Y, Homma Y, Matsuyama R, Kato I, Goshima Y and Endo I :

雑誌名 : Anticancer Research Vol.42, Page791-799, 2022

II 副論文

なし

III 参考文献

なし