

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06334

研究課題名(和文)膵腫瘍幹細胞マーカーの同定

研究課題名(英文)Identification of pancreatic tumor specific stem cell markers

研究代表者

丸野 貴久 (Maruno, Takahisa)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：40760567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵炎に特徴的な組織であるAcinar-to-ductal metaplasia(ADM)中のDcl1陽性細胞より膵腫瘍(PanIN・膵癌)が形成され、ADM中のDcl1陽性細胞が膵癌の始原細胞であることが明らかとなった。またPanIN、膵癌中のDcl1陽性細胞は腫瘍内で子孫細胞を提供しており、かつ正常膵では子孫細胞をほとんど供給しなかった。Dcl1は膵癌特異的幹細胞マーカーであることが明らかとなった。さらに膵癌中のDcl1陽性細胞を選択的にアブレーションすることで癌結節内に大きな空洞が形成され、癌幹細胞標的治療の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer and Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) were formed from Dcl1 positive cells in acinar-to ductal metaplasia (ADM), a tissue characteristic of pancreatitis, and Dcl1 positive cells in ADM were found to be pancreatic cancer progenitor cells. In addition, Dcl1 positive cells in pancreatic cancer and PanIN provided progeny cells in the tumor, although almost no progeny cells were supplied in normal pancreas. It became clear that Dcl1 was a pancreatic cancer-specific stem cell marker. Furthermore, by selectively ablating Dcl1 positive cells in pancreatic cancer, large cavities were formed in cancer nodules. The possibility of cancer stem cell target treatment was demonstrated.

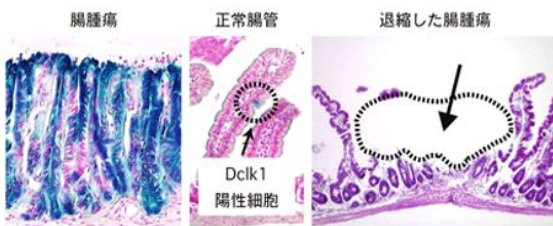
研究分野：消化器内科

キーワード：膵癌 癌幹細胞 Dcl1

1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究は近年急速な進展をみせており、正常組織幹細胞と同様に、癌組織にも癌幹細胞が存在することが明らかになってきた。そのため、「癌幹細胞を標的とする癌治療法」が注目を集めているものの、依然解決すべき課題は多い。そのひとつに、これまでに報告された癌幹細胞マーカーの多くは正常組織幹細胞にも発現している点がある。たとえば、Lgr5は大腸癌幹細胞のマーカーであると同時に、正常大腸組織幹細胞マーカーでもある(Nature, 457, 608-, 2009)。このようなマーカーを標的として癌治療を行うと、癌は退縮しても正常組織に大きな傷害が避けられない。そのため、正常組織幹細胞に発現せず、癌幹細胞特異的に発現するマーカーの同定が求められている。そのようなマーカーの候補として、たとえば胃癌におけるCD44バリエーションなど(Cancer Cell, 19, 387-, 2011)、少しずつ研究成果が挙がりつつあるものの、癌幹細胞特異的マーカーの同定と、癌幹細胞標的治療実現への道はまだ遠い。

そこで申請者らは癌幹細胞に特異的なマーカーを検討し、大腸癌幹細胞の特異的マーカーとして Doublecortin-like kinase 1 (Dclk1)を見いだした(Nat Genet, 45, 98-, 2013)。すなわち細胞系譜解析による実験で、Dclk1陽性細胞はApcMinマウス腸腫瘍においては子孫腫瘍細胞を供給していた(図1左)のに対し、正常腸管では子孫細胞を全く供給しなかった(図1中)。またDclk1陽性細胞にジフテリアトキシン・レセプターを発現させた上でジフテリアトキシンを投与してDclk1陽性細胞をアブレーションすると、腸腫瘍全体が退縮し、正常腸管粘膜にはほとんど傷害が見られなかった(図1右)。このように、Dclk1陽性細胞の選択的排除は、正常腸管を傷害せずに腫瘍のみを退縮させる、理想的な癌治療につながる可能性が示された。

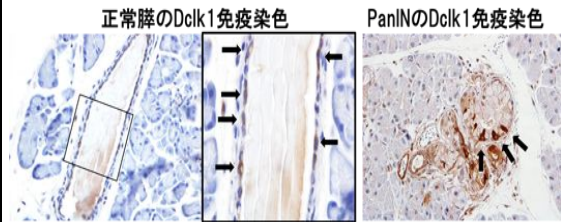


(図1) 腸腫瘍におけるDclk1陽性細胞の系譜解析とアブレーション。(左)タモキシフェン投与1週間後。腸腫瘍は子孫細胞であることを示すXgal陽性の細胞で占められている。(中)対照的に正常腸粘膜にはDclk1陽性親細胞を認めるのみで、Xgal陽性の子孫細胞は見られない。(右)Dclk1陽性親腫瘍細胞のみを排除して1週間後。腸腫瘍は退縮し、周囲の正常腸管粘膜には傷害が見られない。

膵癌は、あらゆる癌のなかでも最も予後の悪いもののひとつである。申請者らは、膵においても、正常膵管細胞や、膵癌・膵癌の前駆病変(Pancreatic intraepithelial

neoplasia; PanIN)で散在性にDclk1の発現が見られることを見いだした(図2)

(図2) 正常膵とPanINのDclk1免疫染色。

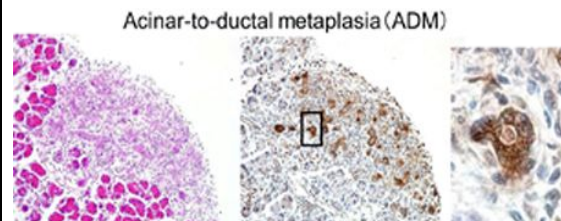


(左)膵管細胞の一部(左・中)とPanINの一部(右)でDclk1が発現している。

しかし、これまでに幹細胞研究のゴールドスタンダードである「生体内での細胞系譜解析」によって膵におけるDclk1陽性細胞の意義を示した報告はなく、Dclk1陽性細胞が膵においても腸と同様に腫瘍幹細胞特異的マーカーかどうかは明らかではなかった。

さらに申請者らは、膵癌の由来(=始原細胞)に関しても興味深い予備的な知見を得た。膵癌は膵管細胞マーカーが陽性であり、従来は膵管に由来すると考えられてきた。しかし、近年の研究により、膵癌は腺房細胞に由来する可能性が示唆され、膵癌の発生・進展過程の新たな手法による解析が待ち望まれている。このような中、申請者らはDclk1がPanINの前駆病変と考えられているAcinar-to-ductal metaplasia(ADM)において多数発現していることを見いだした(図3)

(図3) ADMとDclk1免疫染色。(左)H.E.



像。(中・右)Dclk1免疫染色。ADMの殆どにDclk1が発現している。

慢性膵炎は膵癌の重要なリスクファクターとして知られているが、ADMは膵炎環境下で腺房細胞が脱分化して膵管細胞の性質を併せ持つようになったものである。ADM中にDclk1の発現が見られたことから、申請者らは、PanIN、膵癌はDclk1陽性ADM細胞に由来するのではないかと仮定し、細胞系譜解析の手法を用いて、マウス生体膵でDclk1陽性細胞の意義を検証しようと考えた。

2. 研究の目的

膵癌における「癌幹細胞標的治療」の開発を目指して、Dclk1の膵発癌・進展過程における意義を、細胞系譜および遺伝子発現プロファイルの解析を通じて検証し、膵癌の「癌幹細胞」および「始原細胞」の成り立ちを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

膵癌の発生・進展過程を細胞系譜解析の手法を用いて生体内で可視化し、その過程における Dcl1k1 陽性細胞の遺伝子発現を網羅的に比較する。そのために以下の検討を行う。

(1) 膵正常組織における Dcl1k1 陽性細胞の系譜解析を行い、Dcl1k1 陽性細胞が正常膵組織幹細胞であるかを検証する。

(2) 膵炎に特徴的な組織である Acinar-to-ductal metaplasia (以下 ADM) に存在する Dcl1k1 陽性細胞から膵前癌病変である Pancreatic intraepithelial neoplasia (以下 PanIN) および膵癌が形成されるかを検証する。

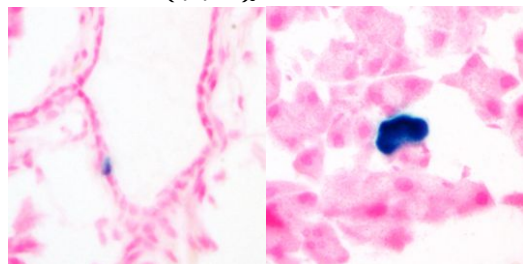
(3) PanIN および膵癌における Dcl1k1 陽性細胞の系譜解析を行い、PanIN・膵癌において Dcl1k1 陽性細胞が腫瘍幹細胞であるかを検証する。

(4) ADM 中の Dcl1k1 陽性細胞の遺伝子発現プロファイリングを行い、ADM に腫瘍発生しうる根拠をさぐる。

これらの解析を通じて、膵癌の成立過程を明らかにし、膵癌幹細胞を標的とする新規治療開発へ向けた基礎的知見を得る。

4. 研究成果

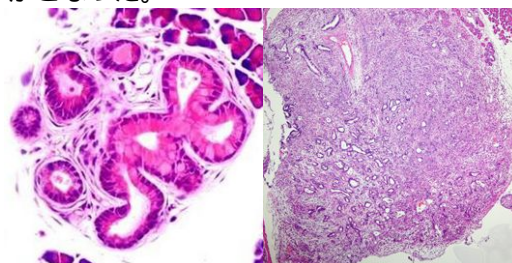
(1) Dcl1k1^{creERT2}; Rosa26^{LSL-LacZ} マウスを用いて生理的条件および膵炎下での Dcl1k1 陽性細胞の系譜解析を行ったところ、tamoxifen 投与後 4 週間後においても、Dcl1k1 陽性細胞の子孫であることを示す LacZ 陽性細胞は膵内にほとんど認められなかった。すなわち Dcl1k1 陽性細胞は膵においてほとんど子孫細胞を供給せず、正常組織幹細胞ではないことが明らかとなった(図 4)。



(図 4) 正常膵における Dcl1k1 陽性細胞の系譜解析。Tamoxifen 投与後 28 日の膵幹細胞(左)と腺房細胞(右)。子孫細胞の供給が殆どみられない。

(2) Dcl1k1^{creERT2}; Kras^{LSL-G12D} マウスを用いて、Dcl1k1 陽性細胞から前癌病変 PanIN が形成されるかを解析した。Tamoxifen を投与して、生理的条件下で存在する Dcl1k1 陽性細胞に Kras 変異を導入しても PanIN はほとんど形成されなかった。しかし、caeruklein を予め投与して膵炎を起こしたのち tamoxifen を投与し、膵炎に特徴的にみられる Acinar-to-ductal metaplasia (ADM) に Kras 変異を導入すると PanIN が形成された(図 5 左)。ADM に存在する Dcl1k1 陽性細胞から PanIN が形成されたと考えられた。また Dcl1k1^{creERT2}; Kras^{LSL-G12D}; Trp53^{fllox/fllox} マウスを用いて Dcl1k1 陽性細胞

からの膵癌の発生を解析したところ、同様に膵炎を予め起こしてから tamoxifen を投与することで膵癌が形成された(図 5 右)。ADM 中の Dcl1k1 陽性細胞から膵癌が形成されたと考えられた。すなわち ADM における Dcl1k1 陽性細胞が PanIN・膵癌の起源であることが明らかとなった。



(図 5) ADM から形成された PanIN (左) と膵癌 (右) の H.E. 染色。

(3) Dcl1k1^{creERT2}; Pdx1-FLP; Kras^{FSF-G12D}; Rosa26^{mTmG} マウスを用いて、形成された PanIN の中で Dcl1k1 陽性細胞の系譜解析を行ったところ、Tomato 発現細胞で構成されていた PanIN が EGFP 発現細胞に置き換わっていた。すなわち PanIN 中の Dcl1k1 陽性細胞は子孫 PanIN 細胞を供給していることが判明し、PanIN 中の Dcl1k1 陽性細胞は PanIN の幹細胞であることが明らかとなった。

また Dcl1k1^{creERT2}; Pdx1-FLP; Kras^{FSF-G12D}; Rosa26^{mTmG}; Trp53^{frt/frt} マウスを用いて、形成された膵癌の中での Dcl1k1 陽性細胞の系譜解析を行ったところ、Tomato 発現細胞で構成されていた膵癌が EGFP 発現細胞に置き換わっていた。すなわち膵癌中の Dcl1k1 陽性細胞は子孫膵癌細胞を供給していることが判明し、膵癌中の Dcl1k1 陽性細胞は膵癌の幹細胞であることが明らかとなった。

さらに Dcl1k1^{creERT2}; Pdx1-FLP; Kras^{FSF-G12D}; Rosa26^{IDTR}; Trp53^{frt/+} マウスを用いて、膵癌において Dcl1k1 陽性細胞の選択的アブレーションを行ったところ、アブレーション後 14 日で膵癌結節内に大きな空洞が形成されていた。この結果は膵癌幹細胞標的治療の可能性が示唆するものであった。

(4) 膵癌の起源細胞である ADM 中の Dcl1k1 陽性細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した。膵炎を起こし ADM を形成したマウスの膵管細胞、(ADM になっていない)腺房細胞と ADM をレーザーマイクロダイセクションの手法を用いて組織を採取し、RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。すると Kras 変異が導入されていない膵炎の段階で、ADM においてすでに Kras の発現が亢進していた。ADM にさらに Kras 変異が加わることで Kras 活性が閾値を超え、腫瘍が発生してくることが示唆された。

以上の結果より、ADM 中の Dcl1k1 陽性細胞は膵癌の始原細胞であること、また Dcl1k1 は

膵癌特異的幹細胞マーカーであることが示された。また Dclk1 陽性細胞のアブレーション実験の結果から、膵癌幹細胞標的治療の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 0 件)
投稿準備中

〔学会発表〕(計 2 件)

妹尾浩、丸野貴久、津田喬之、福田晃久
Hierarchy in mouse digestive organ tumors
第 39 回日本分子生物学会年会
2016 年 11 月 1 日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

妹尾浩、丸野貴久、後藤規弘、福田晃久
消化器腫瘍における腫瘍幹細胞標的治療
第 75 回日本癌学会総会
2016 年 10 月 6 日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸野貴久 (MARUNO Takahisa)

京都大学大学院医学研究科・特定助教

研究者番号：4 0 7 6 0 5 6 7

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

()