

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590745
 研究課題名（和文）膵癌幹細胞を特異的に骨髄由来細胞の性質を利用して攻撃する治療法の開発
 研究課題名（英文）Development of pancreatic cancer stem cell targeted therapy using cells derived from bone marrow.
 研究代表者
 佐藤 賢一（SATO KENNICHI）
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：10282055

研究成果の概要：

我々は膵癌幹細胞を標的とした骨髄由来細胞による遺伝子治療を行うことを最終目的に、膵癌幹細胞の同定と、骨髄由来細胞をその特異的攻撃細胞として遺伝子を発現させるために基礎検討を行った。最近、上皮間葉形質転換(EMT)が誘導されている癌細胞と癌幹細胞の性質が類似していると報告されたことから、我々は膵癌の EMT を誘導する BMP4 の下流の標的遺伝子である MSX2 と S100P に着目して研究を行った。その結果、これらの分子を発現する癌細胞が膵癌幹細胞を多く含む可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵癌、幹細胞、骨髄由来細胞

1. 研究開始当初の背景

膵癌は最も予後の悪い消化器癌であり、5年生存率は手術例を含め 10%以下である。予後が悪い理由として、膵癌発見時には既に周囲の門脈、腹腔動脈や上腸間膜動脈といった重要な血管に浸潤している局所進行の状態や、門脈を介した血行転移により肝臓に転移巣が認められ根治手術が不能の事が多い点が挙げられる。また、膵の手術は他の消化器

癌と比べ侵襲が高いために、膵に小さな病変を認めたとしてもすぐに手術を行うことは躊躇される。そのうえ、膵臓は頭部を十二指腸、前面を胃、尾部を脾臓に囲まれているため、その病変を可視下で捉えることは不可能である。超音波内視鏡下で膵の吸引生検が行われるようになってきているが、播種の問題から全例に施行はためられるのが実情である。そのため、腫瘤の存在を確認したとし

でも悪性と確診できずに経過をみているうちに転移巣が出現する例なども少なくない。胃や大腸のようにスクリーニング的に症状のない癌をとらえるのは非常に困難であり、さらに病変をとらえたとしてもそれを確定診断へと導く modality が少ないといった現実がある。一方、膵癌の大多数例が含まれる根治不能例に関する治療に関しても、化学療法や化学放射線療法にて臨床的に1年前後の延命にとどまることが多く、2年以上の長期予後を示す例は極めて稀である。Gemcitabine の登場によって、それ以前とは比較にならない程予後延長がもたらされている感はあるものの、実際的には以前に比べ数ヶ月の予後改善しか成しえていない。また、長期間の投与により Gemcitabine 耐性が生じて、効果が消失してくるという問題もある。すなわち、今後膵癌患者の予後を延長させるためには新しい治療法の開発が必要である。

2. 研究の目的

膵癌幹細胞を標的とした骨髄由来細胞による遺伝子治療を行うことを最終目的に、膵癌幹細胞の同定と骨髄由来細胞をその特異的攻撃細胞として遺伝子を発現させるために基礎検討を行う。

3. 研究の方法

(1)膵癌幹細胞の同定

EMT が誘導されている細胞が癌幹細胞の性質を有するとの報告から、我々は EMT に関連する分子を同定し、その機能を解析した。

BMP4 投与によって膵癌細胞 Panc-1 において EMT を誘導し、同時に発現変化のあった分子を microarray にて同定した。同定した分子の中から MSX2 と S100P に着目し、それらの膵癌における機能を解析するために、遺伝子導入による強制発現系あるいは RNAi による発現抑制系の膵癌細胞株を作成し、解析した。

(2)骨髄由来細胞が癌あるいは癌周囲に動員されるか否かの検討

放射線照射後の雌マウスに雄 GFP 発現グリーンマウス（大阪大学 岡部教授より供与）から、骨髄移植を行った。移植骨髄細胞

の定着を確認したのち、化学物質 DMBA をマウス腭に注入し、経時的に腭を摘出し膵発癌過程を観察した。

4. 研究成果

(1)BMP4 によって発現誘導された MSX2 がそれ自身で EMT を誘導することが可能か否か検討した。最初に各種膵癌細胞株における MSX2 発現レベルを比較し相対的に発現レベルが低い膵癌細胞株 BxPC3 において MSX2 強制発現株 B7 および B21 を樹立した。さらに、強制発現系での機能解析の特異性を確認するため、MSX2 発現の高い Panc-1 への siRNA 導入による発現抑制細胞株を用いて検討した (si201, si215)。解析した。MSX2 強制発現細胞 B7, B21 では、コントロールの親株 BxPC3 と B-3EV (EV) にくらべ細胞接着が疎らで、細胞形態も細長く線維芽細胞様に変化を示した (図1)。

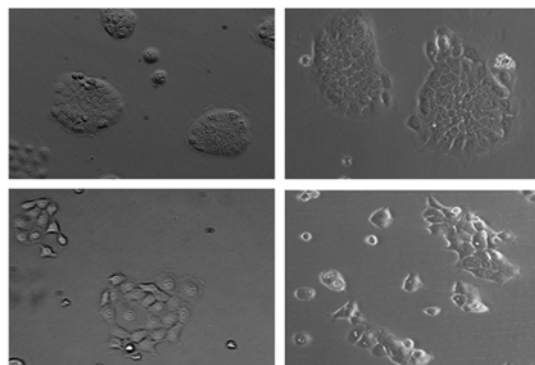


図1. 上段左 BxPC3, 右 B-3EV
下段左 B21, 右 B7

一方、発現抑制系の si201, si215 では、コントロールの親株である Panc-1 あるいは EV の細胞接着が疎らで形態も紡錐形であるのに対し、細胞接着が密で敷石状の細胞形態を示した。

上述の形態変化が MSX2 発現による膵癌細胞における EMT 誘導によるものかを確認するために、E-cadherin と β -catenin の発現量と局在を蛍光免疫染色とウェスタンブロットを行った E-cadherin は MSX2 の発現の弱い B-3EV と MSX2 発現抑制 Panc-1 では強い細胞膜発現が認められるのに対して、MSX2 発現の強い B7, B21, EV では細胞膜

での発現が減少していた。同様に、 β -catenin の発現は、MSX2 発現の弱い B-3EV と MSX2 発現抑制 Panc-1 では強い細胞膜発現が認められるのに対して、MSX2 発現の強い B7、B21、EV では細胞質や核へと発現の局在が変化していた。E-cadherin の発現量変化と β -catenin の局在変化はウェスタンブロットにても確認し、蛍光免疫染色の結果を支持するものであった。これらの、形態変化や分子マーカーの変化は MSX2 の発現によって膀胱癌細胞が EMT の状態に導かれることを示しているものと考えられた。

MSX2 強制発現により B7、B21 ではプロモドオキシウリジン取り込みの上昇が認められ（10%血清添加培地、72 時間）、MSX2 が細胞増殖能を亢進させていることが示された。続いて MSX2 の発現が細胞遊走能に与える影響を評価するため、スクラッチアッセイ、two-chamber migration assay を行った。B7 と B21 の両細胞株において、細胞間隙への細胞数と下室へ移動する細胞数の増加がそれぞれ認められた。一方、si201 と si215 はコントロールに比べ、細胞間隙に移動する細胞、下室に移動する細胞の減少が認められた。

更なる生物学的な悪性度を評価するため、ソフトアガーアッセイにて各細胞における足場非依存性増殖能を評価した。B7 においてコントロール細胞株と比較して明らかな足場非依存性増殖能の亢進が認められた。以上の結果より、MSX2 の発現増加は細胞遊走能と足場非依存性の増殖能を亢進させる効果があるものと考えられた。

MSX2 強制発現により著明な細胞遊走能の亢進と足場非依存性の増殖能の亢進が認められた B7 と、コントロール細胞株として B-3EV を用い、前述の方法にてヌードマウス皮下移植モデルで *in vivo* における生物学的悪性度の評価を行った。図 2 に示すように B7 移植マウスにおいて著明な腫瘍径の増大が認められた。

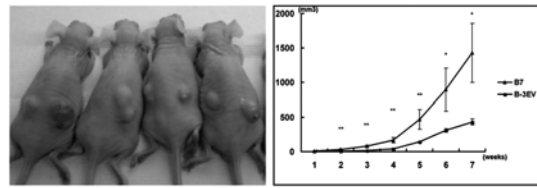


図 2 左はヌードマウスの右背に B7 を左背にコントロール細胞を皮下移植後 7 週後の状態。右は増殖曲線を示す。

さらに、MSX2 の浸潤、転移能を評価するため、MSX2 強制発現細胞と発現抑制細胞をヌードマウスの臍に移植した。MSX2 発現の高い膀胱癌細胞株 B7、EV (Panc-1) では、発現の低い B-3EV、MSX2si に比べて有意に肝転移、腹膜播種の頻度が高かった。また、MSX2 の発現が高い B7、EV の組織像は細胞接着が疎で癌細胞の分化度が低く、MSX2 発現が低い B-3EV、MSX2si では、細胞接着が密で分化の高い細胞も散在していた。すなわち、MSX2 の発現亢進によって膀胱癌細胞の EMT が誘導され肝転移、腹膜播種が引き起こされる可能性が示唆された。すなわち、MSX2 はそれ自身で膀胱癌細胞の EMT を誘導し、膀胱癌の転移機能に関与している可能性が示唆された。

S100P の BMP4 による誘導機序を検討するため、Smad4 発現抑制 Panc-1 を用いた。その結果、Smad4 ノックダウンにより S100P の誘導は阻害され、定型的な Smad シグナル伝達経路が重要であると考えられた。さらに、S100P ノックダウン細胞を作成し、BMP 誘導 EMT における S100P の機能を検討すると、siRNA による S100P ノックダウンにより、BMP4 による Panc-1 の細胞遊走能の亢進が抑制されることが確認された。これらのことから、S100P は膀胱癌細胞株において Smad4 依存的に BMP で誘導され、BMP による EMT に寄与することが明らかとなった。

以上より、MSX2 と S100P は膀胱癌細胞の EMT に関与する分子であり、それらが発現する細胞群に癌幹細胞が含まれている可能性が示唆された。

(2), DMBA 注入後、マウス膵には過形成病変が出現し、時間経過とともに癌病変が出現した。過形成や癌病変周囲には GFP を発現する間質細胞が認められ、骨髄由来細胞が癌化細胞周囲に動員されている可能性が示唆された。どのような間質細胞が骨髄細胞由来であるのかは、今後蛍光二重染色などにより同定が必要と考えられた。

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 6 件)

①Hamada, S, Satoh K; Hirota M, Fujibuchi W, Kanno A; Umino J; Ito H; Satoh A; Kikuta K; Kume, K; Masamune A, Shimosegawa T. Expression of the calcium-binding protein S100P is regulated by bone morphogenetic protein in pancreatic duct epithelial cell lines. *Cancer Sci* 100:103-10, 2009. 査読有

②Satoh K, Hamada S, Kimura K, Kanno A, Hirota M, Umino J, Fujibuchi W, Masamune A, Tanaka N, Miura K, Egawa S, Motoi F, Unno M, Vonderhaar BK, Shimosegawa T. Up-Regulation of MSX2 Enhances the Malignant Phenotype and is Associated with Twist 1 Expression in Human Pancreatic Cancer Cells. *Am J Pathol.* 172:926-39, 2008. 査読有

③Kanno A, Satoh K, Masamune A, Hirota M, Kimura K, Umino J, Hamada S, Satoh A, Egawa S, Motoi F, Unno, M, Shimosegawa T. Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 122, 2707-2718, 2008. 査読有

④Satoh K, Kanno A, Hamada S, Hirota M, Umino J, Masamune A, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T. Expression of Sonic hedgehog signaling pathway correlates with the tumorigenesis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Oncol Rep* 19:1185-90, 2008. 査読有

⑤Kimura K, Satoh K, Kanno A, Hamada S, Hirota M, Endoh M, Masamune A, Shimosegawa T. Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice. *Cancer Sci* 98: 155-162, 2007. 査読有

⑥Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kimura K, Kanno A, Masamune A, Shimosegawa T. Bone morphogenetic protein 4 induces epithelial-mesenchymal transition through MSX2 induction on pancreatic cancer cell line. *J Cell Physiol.* 213 :768-74, 2007. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

①濱田晋、佐藤賢一、廣田衛久、菅野敦、海野純、伊藤広通、下瀬川徹. 膵癌細胞株における BMP4 によるカルシウム結合蛋白 S100P の発現誘導とその機能についての検討. 第 50 回日本消化器病学会大会. 2008 年 10 月 3 日. 東京

②Kennichi Satoh, Shin Hamada, Kenji Kimura, Atsushi Kanno, Morihisa Hirota, Tooru Shimosegawa. MSX2 promotes epithelial mesenchymal transition and associates with Twist 1 expression in human pancreatic cancer cells. *DIGESTIVE DISEASE WEEK* 2007. 2007 年 5 月 21 日 Washington DC, U.S.A

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 賢一 (SATO KENNICHI)
東北大学・病院・助教
研究者番号: 10282055

(2) 研究分担者

廣田 衛久 (HIROTA MORIHISA)
東北大学・病院・助教
研究者番号: 70400364

(3) 連携研究者

無

(4) 研究協力者

無