

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390371

研究課題名（和文）膵癌における癌幹細胞と間葉細胞の相互作用の解明とそれを応用した集学的治療法の開発

研究課題名（英文）Interaction between mesenchymal and cancer stem cells in pancreatic cancer

研究代表者 吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)  
千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60375631

研究成果の概要（和文）：膵癌における癌細胞と間質細胞との相互作用を特に FGF10 を介したシグナルについて検討した。その中でも癌幹細胞に注目するため、癌幹細胞マーカーとされる細胞膜蛋白で細胞間接着に対する役割を持つと言われる CD44 発現細胞の役割を検討した。また、このような癌細胞がどのように細胞遊走を引き起こすかについての分子機構も検討した。間質細胞由来の FGF10 による癌細胞の遺伝子変化は、その培養条件が難しく、はっきりと規定できるものは認めなかった。癌幹細胞のマーカーである CD44 の膵癌における発現についても検討した。発現が増強している症例では予後良好であった。細胞株での検討から、CD44 はアクチン重合の抑制を介し細胞遊走を阻害していた。膵癌と正常膵組織における網羅的発現蛋白質の比較により、Cofilin が膵癌組織に強発現していた。細胞株でその発現を抑制すると、細胞遊走能が低下した。このことから Cofilin が細胞遊走に関わっていると考えられた。以上より、膵癌細胞の遊走能は種々の機構により複雑に制御されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We tried to elucidate the interaction between cancer mesenchymal cells and parenchymal cells, especially focused on the cancer stem cells. First we examined whether the FGF10 signal from mesenchymal cells might change the gene expression profile in cancer cells. However, we could not find out the adequate cancer cell culture condition with FGF10. Next we examined the expression pattern and the function of CD44, which is the cancer stem cells marker and cell adhesion molecule in pancreatic cancer. The strong expression of CD44 in cancer cells predicted the favorable prognosis of the patients with resected pancreatic cancer. Interestingly, the inhibition of CD44 expression in pancreatic cancer cell lines led to the increased cell migration ability of cells. Also this inhibition led to the formation of lamellipodia through modification of actin filament. We also found Cofilin induced the cell migration ability by comprehensive analysis of protein expression. These data suggest that the cell migration of pancreatic cells was controlled by complicated molecular mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬分野

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学（7302）

キーワード：膵臓癌、癌幹細胞、血管内皮細胞、間葉細胞、分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は固形癌の中でも、最も予後不良の疾患である。加えて、本邦における癌死亡原因の第5位を占めており、その罹患率も近年増加傾向にある。本疾患に対しては、外科切除が第一選択となるが、診断時にすでに遠隔転移が存在したり、周囲臓器への広がりにより、その適応となる症例は半分以下であるとされる。加えて、根治切除ができたとしても多くの症例で早期に再発を引き起こし、外科切除後の5年生存率は20%程度とされる。このように、膵癌に対しては、これまでの概念を打ち破る新規治療法の開発が急務である。

前述のように、膵癌が予後不良である原因は容易に他臓器へ転移すること、周囲臓器へ浸潤することがあげられる。すなわち、このような癌細胞遊走、浸潤のメカニズムを解明できれば、これまでの治療法とは全く違った概念の新規治療法を開発できる可能性が高く、致死的な本疾患の治療成績の改善に大いに役立つものと思われる。

近年、癌の悪性度の獲得に周囲環境との相互作用が注目されている。本研究における研究者らは、実質細胞と間質細胞との相互作用について研究してきた。特に、肝胆膵臓器をはじめとした臓器初期発生における血管内皮細胞が果たす役割について研究し、世界的な評価を得ている (*Science* 294:559-, 2001, *Development* 131:807-, 2004)。加えて、このような実質細胞と間質細胞との相互作用が癌組織においても存在し、癌の進展に関与していることを報告してきた (*Br J Cancer* 99:305-, 2008)。また、新しい蛋白質網羅的解析を研究に積極的に導入し、膵癌進展に関わる新規因子の同定や抗がん剤耐性因子の同定を行い、これらについても高い評価を受けている (*Oncogene* 27:2710-, 2008, *Ann Surg Oncol* 15:3157-, 2008, *Br J Cancer* 103:223-, 2010)。このような新規研究法を取り入れることにより、これまでの研究とは違った新たな可能性を見いだしてきた。

## 2. 研究の目的

このような背景から、本研究の目的は癌細胞の遊走、浸潤の分子機構を解明することである。特に、周囲間質細胞が癌細胞のこのような能力を誘導できるかを検討し、実際にどのような分子が制御しているかを見いだすこととした。

我々の臓器発生の研究から、膵臓の初期発生段階では、膵の起源である背側原腸細胞は周囲の間質細胞からの FGF10 シグナルにより、膵細胞への分化に重要な Ptf1a 等の因子を発現することが示された。同様のことは癌細胞でも認められ、我々は癌細胞周囲に FGF10 を発現する細胞が存在し、癌細胞に

発現するその受容体である FGF2R を介して癌細胞の遊走、浸潤能を誘導していることを示してきた。そこで、本研究では第一に周囲間質細胞からの FGF10 シグナルにより、癌細胞においてどのような形態変化が起こるか、もしくは、どのような遺伝子発現の変化が起こるかを、検討した。

また、我々がこれまで行ってきた網羅的蛋白質解析を通して、遊走、浸潤に関わる因子の発見を目指した。すなわち、膵癌組織と周囲の非癌組織の蛋白質発現の違いを検討し、この中で細胞遊走、浸潤に関わる因子を拾い上げ、膵癌細胞を使用した実験を通し、その役割を解明していくことを目指した。

加えて、近年、癌幹細胞への発現で注目されている細胞膜蛋白質で、細胞接着に関わる因子の一つである CD44 に着目し、本因子が細胞の遊走や浸潤に関与しないかを検討した。

## 3. 研究の方法

### (1):FGF10 による膵癌細胞浸潤能誘導の分子機構の解明

膵癌細胞株である CFPAC-1, AsPC-1, Panc1 を使用し、FGF10 投与による細胞の形態変化、遊走能変化を定点タイムラプス法にて観察した。また、その遺伝子変化を FGF10 投与細胞と非投与細胞を比較することで検討を試みた。

### (2)膵癌組織と正常膵組織の網羅的蛋白質発現比較による細胞遊走に関わる因子の発見

当院にて切除を行ったパラフィン固定膵癌切除標本3例より癌組織、正常膵組織から蛋白を抽出、SDS-PAGE による2次元電気泳動を施行し、発現量の異なるスポットを切り出し、これを蛋白質ゲル内消化を行い、質量分析計に似て蛋白質同定を行った。このような検討から抽出された癌組織と正常膵組織で発現が異なる蛋白質の中から、文献的に癌細胞の遊走や浸潤に関わる可能性のある蛋白質を抽出し、その発現が本当に癌部、非癌部で異なっているかを免疫組織染色法、および、Western blot 法にて検討した。

次に、膵癌細胞株 Capan-1 を用い、siRNA を使用してこの蛋白質の発現を抑制することで、細胞の遊走能の指標として8 $\mu$ m孔を持つ透過膜で仕切られたトランスウェルプレートを用い、その膜通過細胞数を計測した。

### (3)CD44 の膵癌細胞における役割

当院における膵癌切除標本86例を用い、免疫染色法にて膵癌組織におけるCD44の発現パターンを検討した。また、その発現が癌細胞の10%以上あるものを強発現群、それ以外を弱発現群とし、その患者背景、切除後の無再発生存期間、全生存期間を比較した。また、多変量解析を用いて、無再発生存期間、

全生存期間の独立した予後因子を同定した。  
一方、膵癌細胞株 AsPC-1, Panc-1 を用い、CD44 の発現を siRNA を用いて抑制することにより定点タイムラプス法によりその細胞遊走能、細胞形態の変化を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) FGF10 による膵癌細胞浸潤能誘導の分子機構の解明

CFPAC-1, AsPC-1 培養液中に FGF10 100ng/ml を反応させた際の細胞形態、細胞診順応を検討したが、これらの細胞については FGF10 に反応した明らかな変化は今回の検討では認められなかった。また、Scratch assay による細胞遊走能の検討も行ったが、明らかな細胞遊走能の亢進は認められなかった。これらは、細胞の活性の問題の可能性もあり、現在も投与量、培養条件などを検討中である。しかし、このような形態学的な変化が明らかでない状況での遺伝子変化を検討することに対する意義は薄いと考えられ、現在は、FGF10 が細胞に変化を及ぼす条件の設定に全力を注いでいる。

##### (2) 膵癌組織と正常膵組織の網羅的蛋白発現比較による細胞遊走に関わる因子の発見

膵癌切除標本 3 例より、それぞれ癌部、正常膵部を切り出し、ここより蛋白質を抽出した。この蛋白質を 2 次元 SDS-PAGE 法を用い展開し、それぞれを比較、癌部で発現が上昇しているスポットを 36 個認めた。これらのスポットを切り出し、質量分析計を用いて蛋白質の同定を行ったところ、7 スポットは既知の蛋白質であることを確認した。これらの蛋白質を文献的に考察したところ、そのうちの一つで分子量約 20kDa のスポットは、細胞骨格関連蛋白質である Cofilin であった。Cofilin は細胞内のアクチンフィラメントの

再構築に関わる因子であり、その発現は卵巣癌において腫瘍の悪性度と関わるということが知られている。そこで、本蛋白質が膵癌においても腫瘍の悪性変化に関わっている可能性があると考えた。まず、2 次元電気泳動の結果を確認する意味で、前述の 3 症例を含む 9 症例で膵癌切除標本から癌部と正常膵組織部の蛋白質を抽出し、Western blot を用いてその発現の強弱を検討したところ、全例において、癌部でその発現が増強していることが確認された。そこで、Cofilin が膵癌組織のどの部分に発現しているかを検討するために、59 例の膵癌切除標本における膵癌組織での免疫組織染色を行った。Cofilin は膵癌発生母地とされる膵管細胞にはその発現を認めなかったが、癌細胞細胞質に発現していた。この発現の程度により強発現群 44 例、弱発現群 15 例に分けてその臨床病理学的因子との関係を検討したところ、リンパ節転移の有無、ステージ、分化度、生存期間には両群間に差がなかったが、再発部位との関係で、Cofilin 強発現群では肝転移を中心とした遠隔転移が多く、一方、弱発現群では局所再発が多かった。

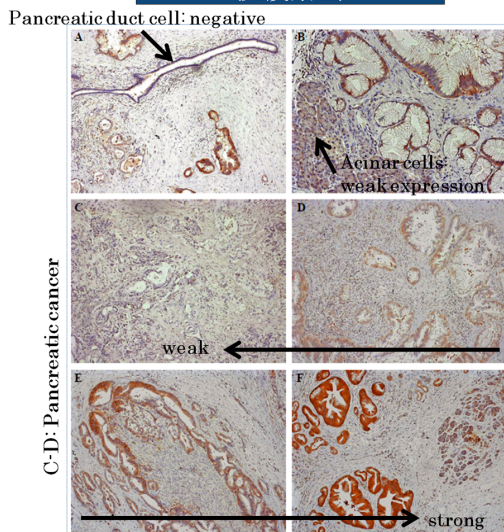
Cofilin 強発現群で遠隔転移例が多かったことは、本蛋白質の発現が細胞遊走能に関わっている可能性を示唆していた。そこで、膵癌細胞株である Capan-1 を用いて、その細胞における Cofilin 発現を siRNA 法により抑制することで、細胞遊走能に変化が起きるかどうかを検討した。トランスウェルプレートを用い、膜通過細胞数を計測したところ、siRNA の容量依存的に、すなわち、Cofilin の発現量に依存して膜通過細胞数が減少した。このことから、Cofilin は膵癌細胞において、その細胞遊走能を亢進させる働きを持っており、そのことが遠隔転移に関わっている可能性が示された。

##### (3) CD44 の膵癌細胞における役割

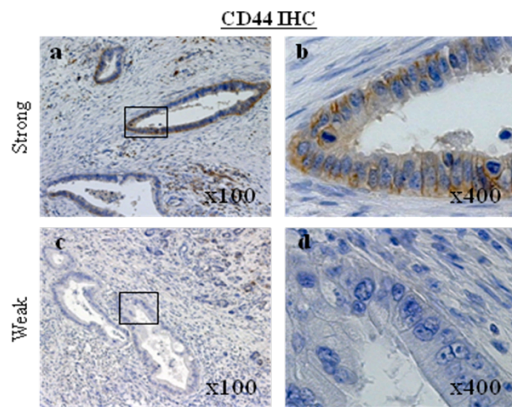
細胞膜蛋白質で、細胞間または細胞外マトリックスとの接着に関与している CD44 の膵癌細胞における役割について検討した。

まず、膵癌組織における CD44 発現形式を検討するため、膵癌切除標本 87 例を用い、免疫組織染色を行った。CD44 はこれまでの報告と同様に細胞膜に発現を認めた。特に、細胞と細胞が接する側面の細胞膜に発現を強く認めた。その発現は症例により差があり、癌細胞の 10% 以上に発現を認めるかどうかで 2 群に分けると、強発現群が 68 例、弱発現群が 19 例であった。これらの症例の無再発生存期間、全生存期間を検討すると、強発現群は弱発現群に比し、有意に両方において予後良好であった。加えて、多変量解析では、CD44 の強発現は、無再発生存期間、全生存期間の両方で独立した予後因子であった。

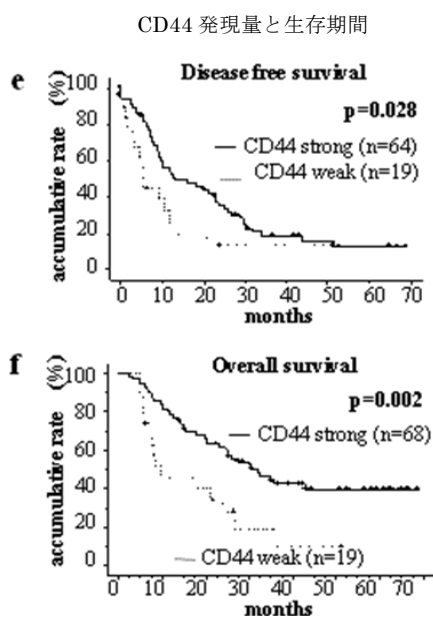
#### 膵癌組織での Cofilin の発現 (免疫染色)







膵癌組織における CD44 免疫染色



CD44 は細胞外ドメインをコードするエクソンにより多くのスプライシングバリエーションを形成することが知られ、特にバリエーションフォームは他癌腫においてその発現が予後不良と結びつくことが報告されている。そこで、膵癌におけるアイソフォームの発現を、当該エクソンを挟んだ部分に設定したプライマーを使用した PCR 法にて検討した。膵癌 5 例での検討では、当該エクソンを全く含まないスタンダードフォームが強く発現し、バリエーションフォームの発現はごくわずかに認められるのみであった。このことから、膵癌では他癌腫とは違い、CD44 はスタンダードフォームを主に発現している事が明らかとなった。

これらのことから、膵癌では CD44 が癌の悪性を弱め、予後良好に結びついていることが示唆された。そこで、CD44 が膵癌細胞でどのような機能を持っているかを膵癌細胞を用い、siRNA 法にて CD44 の発現を抑制することにより検討した。まず、前述の PCR

法を用い、膵癌細胞株である AsPC-1, Panc1 における CD44 バリエーションの発現を確認したところ、組織での発現と同様に、スタンダードフォームが極端に強く発現している事が示された。そこで、siRNA によりその発現を抑制すると、細胞増殖能には変化がなかったものの、Scratch assay によりその細胞遊走能が亢進していた。詳細な観察では CD44 の発現を抑制した細胞では、細胞の突起状の形態変化、すなわち、仮足形成を認めていた。そこで、CD44 の発現と細胞の形態を制御する細胞骨格の中心的要素であるアクチンフィラメントの変化を蛍光細胞染色法により検討した。興味深いことに、CD44 の発現が低下している細胞では、細胞の一部、すなわち、仮足形成している部分にアクチンフィラメントが集中して存在しており、アクチンがこの部分で重合しているためにこのような変化が観察されている可能性が示された。このような結果から、膵臓癌において癌細胞に発現する CD44 はアクチンフィラメントの重合を抑制することで、細胞遊走を押さえ、これにより癌細胞の広がりを阻害していると考えられた。

以上の研究により、膵癌における癌細胞遊走を制御する機構の解明を行った。このように、細胞遊走能は様々な因子により調整されており、今後、このような因子、たとえば Cofilin と CD44 がどのように相互作用を持つのか、また、それを制御している因子は何かといったことについて検討を進めていきたいと考えている。

## 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 8 件)

- ① Sakai N, Yoshidome H, Kimura F, Miyazaki M et al. CXCR4/CXCL12 expression profile is associated with tumor microenvironment and clinical outcome of liver metastases of colorectal cancer. Clin Exp Metastasis 2011 Epub ahead of print 査読有り。
- ② Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshitomi H, Miyazaki M, et al. Similarities and differences between intraductal papillary tumors of the bile duct with and without macroscopically visible mucin secretion. Am J Surg Pathol 2011;35:512-521 査読有り
- ③ 吉富秀幸, Zaret KS, 宮崎勝 膵発生における血管内皮細胞の役割 胆と膵 2011;32:1213-1218 査読なし

- ④ Takano S, Sogawa K, Yoshitomi H, et al. Increased circulating cell signaling phosphoproteins in sera are useful for the detection of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2010;103:223-231 査読有り
- ⑤ Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H et al. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. *Surg Today* 2010;40:793-808 査読有り
- ⑥ 高野重紹、吉富秀幸、木村文夫、宮崎勝ら 膵癌における ApoC-1 の増殖への関与と臨床的意義. *肝胆膵* 2010;61:91-97 査読無し
- ⑦ Kawamoto J, Kimura F, Yoshitomi H, et al. Preoperative GATA3 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells is up-regulated in patients with postoperative infection following hepatobiliary pancreatic surgery. *J Surg Res* 2009;152:118-127 査読有り
- ⑧ 吉富秀幸、小林壯一、木村文夫、宮崎勝ら 膵臓癌における Endoglin (CD105) の腫瘍内血管およびリンパ管内皮細胞での特異的な発現 *膵臓* 2009;24:201-204 査読無し

[学会発表] (計 12 件)

- ① Yoshitomi H, Kimura F, Miyazaki M et al. Combination of Preoperative Gemcitabine/S-1 Chemotherapy and Aggressive Surgical Resection for Borderline or Initially Unresectable Locally Advanced Pancreatic Cancer. 21<sup>st</sup> World congress of the International association of surgeons, gastroenterologists and oncologists. 11/11/2011 Tokyo, Japan
- ② 賀川真吾、高野重紹、吉富秀幸、木村文夫、宮崎勝ら 膵癌細胞における gemcitabine 耐性因子 Annexin II の発現と Akt/mTOR シグナル制御の意義 第 111 回日本外科学会定期学術集会 (2011 年 5 月 紙上発表)
- ③ 吉富秀幸、木村文夫、宮崎勝ら 積極的な外科切除と Gemcitabine を中心とした化学療法を組み合わせた集学的治療法による膵がん治療成績の改善 第 23 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 ワークショップ 6/8/2011 東京
- ④ 吉富秀幸、木村文夫、宮崎勝ら 膵癌術後補助化学療法の個別化を目指した Gemcitabine 耐性因子の同定と Akt/mTOR シグナル制御の意義 ワークショップ 第 66 回日本消化器外科学会総会 2011 年 7 月 15 日 名古屋

- ⑤ 木村文夫、吉富秀幸、宮崎勝ら 肝胆膵外科における術後合併症発症機序の解明と IED による予防対策 第 66 回日本消化器外科学会総会 2011 年 7 月 15 日 名古屋
- ⑥ 吉富秀幸、木村文夫、宮崎勝ら Gemcitabine/S-1 療法による切除困難進行膵癌に対する外科切除適応拡大への試み 第 42 回日本膵臓学会大会 特別企画 2011 年 7 月 29 日 弘前
- ⑦ 高原義博、吉富秀幸、木村文夫、宮崎勝ら 膵癌における CD44 発現と予後との関連性についての検討 ポスター第 42 回日本膵臓学会大会 2011 年 7 月 29 日 弘前
- ⑧ 吉富秀幸、高野重紹、木村文夫、宮崎勝ら 網羅的蛋白質解析による新規膵癌血中マーカー開発への試み JDDW 2011 ポスター 2011 年 10 月 22 日
- ⑨ 高野重紹、吉富秀幸、木村文夫、宮崎勝ら 膵癌個別化治療の臨床応用を目指した translational research 第 110 回日本外科学会 定期学術集会 一般口演 2010 年 4 月 9 日
- ⑩ 高原義博、吉富秀幸、木村文夫、宮崎勝ら 膵癌組織における CD133 および ALDH-1 の発現についての検討 ポスター 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 24 日
- ⑪ 高野重紹、吉富秀幸、木村文夫、宮崎勝ら Significance of circulating cell signal phosphoprotein in pancreatic cancer patients. パネルディスカッション 第 64 回日本消化器外科学会総会 2009/7/18
- ⑫ 吉富秀幸、高野重紹、木村文夫、宮崎勝ら FGF10 および FGFR2-IIIb の Signal を介した膵癌における細胞遊走浸潤能の誘導 第 45 回日本癌学会学術総会 2009/10/2

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60375631

### (2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：70166156

木村 文夫 (KIMURA FUMIO)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：70334208

高原 善博 (TAKAHARA YOSHIHIRO)  
千葉大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：90533290

高野 重紹 (TAKANO SHIGETSUGU)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20436380