

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8日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390381

研究課題名（和文） 高悪性膵癌細胞の Prospective isolation と次世代個別化治療開発

研究課題名（英文） Prospective isolation of pancreatic cancer cells with highly malignant phenotype and development of future individualized therapy

研究代表者

田中 雅夫（TANAKA MASAO）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30163570

研究成果の概要（和文）：

膵癌細胞中に存在する高悪性度細胞集団として CD133 陽性膵癌細胞を同定した。CD133 陽性膵癌細胞の進展メカニズムとして SDF1-CXCR4 経路が関与していることを同定し治療標的としての可能性を示した。同様に CD105 陽性細胞も癌間質相互作用の影響下で遊走能が促進することが明らかとなった。また、膵癌細胞表面にあるコラーゲン取り込みレセプター CD280 を抑制することで膵癌の細胞内コラーゲン取り込み機能が落ち、癌の浸潤を抑制できることを示した。以上の結果により膵癌における新規治療標的分子の同定に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We identified CD133 positive pancreatic cancer cells with high malignant potential. CD133 positive pancreatic cancer cells have strong invasive ability via SDF1-CXCR4 pathway. We also found that migration of CD105 positive pancreatic cancer cells was promoted by cancer-stromal interactions. Moreover, we clarified that collagen-internalization receptor CD280 was an important molecule for invasion of pancreatic cancer cells. We reduced the invasion of pancreatic cancer cells by knockdown of CD280. In the present study, we identified several molecules as promising therapeutic targets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓外科学、膵癌、セルソーティング、癌間質相互作用、上皮間葉移行(EMT)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は癌死の5位を占めながらも100人中3人しか根治しない疾患であり、その治療法の開発は、社会的要請度・緊急性が高い。腫瘍性病変がヘテロな細胞集団であることは

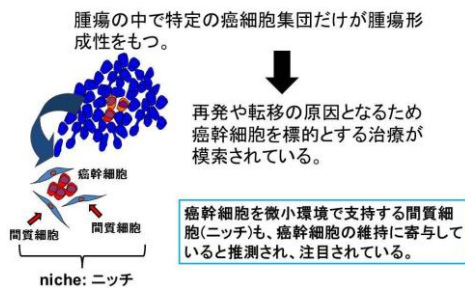
当然認識されていたが、従来の癌研究では癌組織中の大部分を占める細胞の特性が即ち組織全体の特性とされてきた。しかし、このような細胞集団を標的とした治療は効果が一時的で予後改善効果は乏しい。最近、癌組

織中のある特定の微量な細胞集団だけが腫瘍形成能をもつとする癌幹細胞の概念 (Nature, 2006, Passegue) が報告され注目されてきた。近年セルソーターの導入により、特定の表面抗原を対象として癌幹細胞集団のように数%以下の細胞集団を分離することが可能となった。この手法により、現在までに白血病 (Nature Med, 2006, Jin) を中心に癌幹細胞研究が進み、固形癌では乳癌 (Cell, 2008, Yu)、脳腫瘍 (Nature, 2004, Singh) などで報告され、膵癌でも CD44, CD24 や CD133 を中心に報告され始めた (Cell Stem Cell, 2007, Hermann)。

2. 研究の目的

癌幹細胞だけでなく、癌組織中で存在率が低いにもかかわらず予後や再発、治療抵抗性に関わる特定の細胞集団に焦点をあて、特定の分子発現に基づき同定・選別する (Prospective isolation) することを本研究の目的とした。さらに、その細胞集団の生物学的特徴をプロファイルし、治療標的とすべき細胞集団を特異的にターゲットとする標的分子を同定、次世代の個別化治療を開発することも目指した。

癌幹細胞理論



3. 研究の方法

以下のステップに従い研究を進めた。

- ① prospective isolation のための高悪性度癌細胞集団特異的表面マーカーの検索
- ② 表面マーカーを用いた微量高悪性度細胞集団同定と分離
- ③ 同定・純化した微量細胞集団の生物学的悪性度のプロファイリング
- ④ 生物学的悪性度のプロファイルに基づく標的細胞集団における標的分子の同定
- ⑤ 手術切除膵癌組織移植 NOG マウスモデルを用いた前臨床試験

4. 研究成果

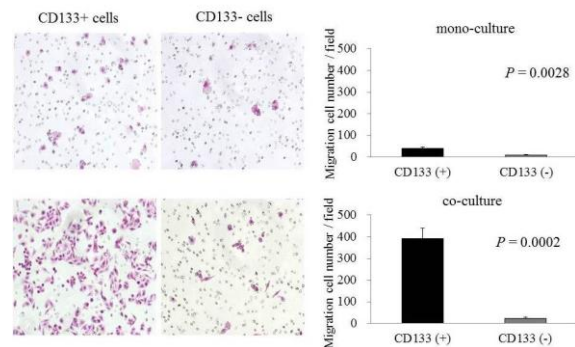
① prospective isolation による高悪性度癌細胞集団特異的表面マーカーの同定。

当研究室で樹立した抗癌剤耐性膵癌細胞株 2 種類 (SUIT-2, CAPAN-1) とその親株とのマイクロアレイデータをもとに、化学療法抵抗性をもつ膵癌細胞集団を標識すると思わ

れる表面マーカーを同定した。また当研究室で樹立した膵癌高肝転移株 3 種類 (SUIT-2, MiaPACA-2, Panc-1) とその親株とをマイクロアレイにかけ、高悪性度癌細胞集団を標識する表面マーカーの同定を進めている。また EMT の過程で CD280 が上昇すること、CD280 発現膵癌細胞は浸潤能が高いことを同定した。

② 表面マーカーを用いた微量高悪性度細胞集団同定と分離。

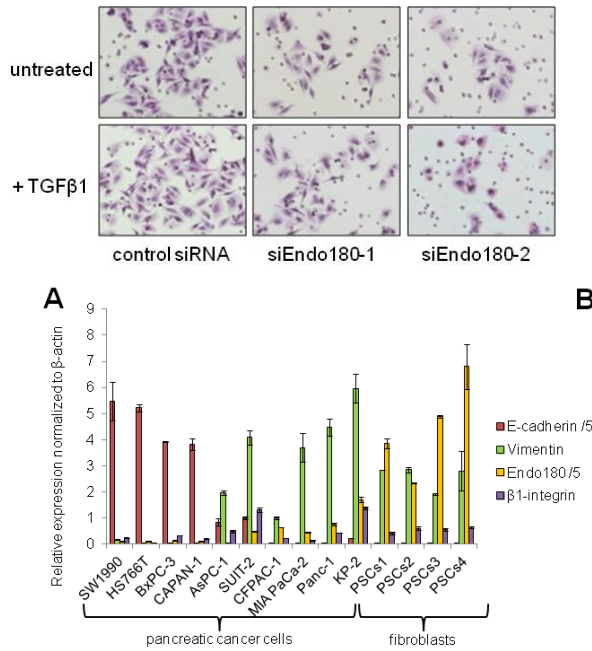
膵癌幹細胞マーカーとして報告のある CD133、CD24、CD44 を用いて膵癌細胞を分取し phenotyping を行った。その結果、CD133 陽性膵癌細胞株は増殖・浸潤・転移能が高いこと、その能力は線維芽細胞との HGF-cMET 経路を介した癌間質相互作用により増強されることを発見し報告した (下図)。このように、特定の癌細胞の進行が線維芽細胞由来液性因子により影響を受けているとの報告は今までにはなく、学会発表、論文報告により高い評価を受けた。いままで進めてきた CD133、CD24 による膵癌細胞株の分取に加え CD280 やコラーゲン取り込み能から同定した EMT 細胞の細胞分取を試みたが、陽性細胞の割合が低いことやコラーゲンビーズの製品の問題により有効な解析はできなかった。



③ 同定・純化した微量細胞集団の生物学的悪性度のプロファイリング。

癌幹細胞マーカー以外にも新たに CD90、CD105、CD280 など他の細胞表面マーカーにより膵癌細胞株あるいは手術切除組織から癌細胞を純化し、生物学的悪性度のプロファイリングを行った。CD133 陽性膵癌細胞に関してはその浸潤能や間質からの相互作用を受けやすい性質より、治療標的細胞集団となりうることは示したが、新しくコラーゲン取り込みレセプターと呼ばれる CD280 を治療標的候補として同定した。CD280 を抑制することで膵癌の細胞内へのコラーゲン取り込み量が低下し、浸潤能が有意に低下すること

を同定した(次頁図)。また CD280 は膵癌細胞の EMT と密接な関係を有していることも明らかとなった(次頁図)。また、癌細胞周囲に存在する間質細胞の中で特異的に癌の浸潤を促進する細胞集団を同定することにも成功した。



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 5 件)

1. Taiki Moriyama, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Lin Cui, Naoki Ikenaga, Norihiro Sato, Masao Tanaka. Enhanced cell migration and invasion of CD133(+) pancreatic cancer cells cocultured with pancreatic stromal cells. *Cancer* 116(14):3357-3368, 2010.

2. Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Lin Cui, Tadashi Kayashima, Katsuya Morimatsu, Taiki Moriyama, Kohei Nakata, Hayato Fujita, Masao Tanaka. CD10⁺ pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 139:1041-1051, 2010.

3. Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Jun Yu, Tadashi Kayashima, Akifumi Hayashi, Kohei Nakata, Masao Tanaka. Characterization of CD24 expression in intraductal papillary mucinous neoplasms and ductal carcinoma of the pancreas. *Hum Pathol.* 41:1466-1474, 2010.

4. Hayato Fujita, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Soichi Itaba, Tetsuhide Ito, Kohei Nakata, Jun Yu, Tadashi Kayashima, Akifumi Hayashi, Ryota Souzaki, Tatsuro Tajiri, Manabu Onimaru, Tatsuya Manabe, Takao Ohtsuka, Masao Tanaka. High *EGFR* mRNA Expression Level is a Prognostic Factor for Reduced Survival in Pancreatic Cancer after Gemcitabine-based Adjuvant Chemotherapy. *International Journal of Oncology*, 38; 629-41, 2011

5. Tadashi Kayashima, Kohei Nakata, Kenoki Ohuchida*, Hayato Fujita, Cui Lin, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka. *Insig2* is overexpressed in pancreatic cancer and its expression is induced by hypoxia. *Cancer Science*, 102:1137-43, 2011

[学会発表] (計 5 件)

1. Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Hayato Fujita, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka. Characterization of CD24 Expression in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms and Ductal Carcinoma of the Pancreas. 41st Annual Meeting of the American Pancreatic Association. November 4, 2010. Chicago, IL, USA.

2. Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka. The Functional Heterogeneity of Pancreatic Cancer Cells and Surrounding Stromal Cells in Cancer-Stromal Interactions. The 4th International Conference for Treatment of Pancreatic Cancer. June 25, 2011. Taipei, Taiwan.

3. Kenji Fujiwara, Kenoki Ohuchida, Shingo Kozono, Naoki Ikenaga, Lin Cui, Masafumi Nakamura, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka. Pancreatic Stellate Cells Promote Migration of CD105+ Pancreatic Cancer Cells. 42nd American Pancreatic Association (APA) Annual Meeting. November 2-5, 2011. Chicago, USA.

4. 池永直樹、大内田研宙、小藪真吾、Prawej Mahawithwong、大塚隆生、水元一博、田中雅夫。膵癌細胞は癌間質相互作用により細胞外基質コラーゲンを取り込み、浸潤を促進する。第 22 回日本消化器癌発生学会総会。2011 年 11 月 25 日～26 日。佐賀

5. 小藪真吾、大内田研宙、高浪英樹、江口大樹、藤原謙次、趙蒼、崔林、池永直樹、坂井寛、藤田逸人、大塚隆生、水元一博、田中雅夫。膵癌細胞株による放射線治療抵抗性と上皮間葉移行の関連性の検討。第 47 回九州外科学会。2011 年 5 月 7-8 日。宮崎

〔図書〕（計6件）

- ①. 大内田研宙、大塚隆生、水元一博、田中雅夫 膵癌における癌間質相互作用 特集：膵癌診療と研究の最先端 胆と膵 32巻9号 2011
- ②. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M. Molecular biology-based diagnosis and therapy for pancreatic cancer Fukuoka Igaku Zasshi. 2011 Jun;102(6):203-14
- ③. 大内田研宙、藤田逸人、水元一博、田中雅夫 膵癌の分子生物学的解析の現状 腫瘍内科, 7巻2号 131-6, 2011
- ④. 大内田研宙、水元一博、藤田逸人、大塚隆生、田中雅夫 特集／膵嚢胞性疾患の新展開 1.嚢胞性膵腫瘍の基礎 2. 分子生物マーカー:biomarker 肝胆膵 61巻3号、2010年9月号
- ⑤. 大内田研宙 大塚隆生 水元一博 田中雅夫 膵癌の分子生物学的解析に基づく個別化治療に向けた取り組み 胆と膵31巻4号 2010
- ⑥. 大内田研宙 大塚隆生 水元一博 田中雅夫 2. 分子発現解析に基づく膵癌診断法とその意義 特集『膵癌に対するトランスレーショナルリサーチの展望』膵臓 第25巻1号 2010

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 雅夫 (TANAKA MASAO)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：3163570

(2) 研究分担者

佐藤 典宏 (SATO NORIHIRO)
九州大学・大学院医学研究院・共同研究員
研究者番号：20423527

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)
九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：20452708

当間 宏樹 (TOMA HIROKI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：80437780

(3) 連携研究者
なし