

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 25 年 4 月 9 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591522

研究課題名（和文）膵癌幹細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の解明とその臨床応用

研究課題名（英文）Epigenetic regulation of genes related to pancreatic cancer stem cells and its clinical application

研究代表者

佐藤 典宏 (SATO NORIHIRO)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：20423527

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、膵癌幹細胞におけるエピジェネティックな異常をゲノム網羅的に解析し、発癌、癌進展、薬剤耐性および予後など臨床病理学的因子との関係を明らかにすることである。膵癌幹細胞は CD133 の表面抗原を有する細胞である可能性が高く、当研究室においてソーティングを行いその間質相互作用に関して報告した。また、より膵癌幹細胞のマーカーの同定を目指して種々の表面抗原を発現するサブポピュレーションをソーティングにて分離、純化し、そのフェノタイプおよび DNA メチル化状態を網羅的に解析した。この結果、DNA メチル化プロファイリングが膵癌幹細胞のサブポピュレーションでは明らかに異なっていることを発見した。今後はそれぞれの DNA メチレーションマーカーを詳細に解析し、膵癌発生や進展における機能的役割を明らかにする予定である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the epigenetic regulation of genes related to the phenotype of pancreatic cancer stem cells. First, we planned to purify pancreatic cancer stem cell population by sorting cells using specific cell surface markers. Then, we used a genome-wide approach to identify DNA methylation markers in the subpopulation of pancreatic cancer stem cells. We already have a list of genes that may be regulated primarily by DNA methylation in pancreatic cancer stem cell population. Finally, we are planning to validate these DNA methylation markers identified through the genome-wide approach and to further investigate the functional relevance of each DNA marker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：膵癌・癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 他の消化器癌などにおける飛躍的な治

療法の改善とは対照的に、膵癌は欧米や日本

でも癌死の上位をしめる主要な癌であるにも関わらず、ここ30年以上ほとんど生存率の改善が見られない取り残された癌腫である。アメリカではPanCANやNFPTR(国立家族性膵腫瘍登録機関)、また公的、私的基金が一体となり、膵癌撲滅をスローガンに国を挙げて研究を支援、奨励している。一方、本邦での膵癌研究はマンパワーにおいてもまた予算の面でも極めて立ち遅れている。膵癌発生および進展の土台となる分子生物学的特徴を利用した新たな治療法の開発は社会的貢献度の高い最重要課題である。

(2) 近年、癌における分子異常としてエピジェネティックな異常が認識され、その重要性が高まってきた。遺伝子プロモーター領域の異常メチル化やヒストン脱アセチル化などのエピジェネティック異常は、ほぼ全ての癌腫において観察される現象であり、癌抑制遺伝子の不活性化のメカニズムとして広く認識されている(Jones PA & Baylin SB, Cell 2007)。我々はこのエピジェネティックな異常にいち早く着目し、米国ジョンズホプキンス大学と共同で膵癌におけるDNAメチレーションの異常について研究を重ねてきた。その結果、多くの癌抑制遺伝子や癌関連遺伝子の異常メチル化が、膵発癌および浸潤転移など悪性化に深く関与していることを世界に先駆けて報告してきた。エピジェネティックな変化は可逆性であることより、癌治療のターゲットとして期待されている。

(3) 最近、癌組織中に自己複製能と多分化能を有し、腫瘍形成能や高転移能などの特殊な表現形(フェノタイプ)を持つある特定の細胞集団(サブポピュレーション)が存在するという、いわゆる癌幹細胞(cancer stem cell)の概念が提唱されている。癌幹細胞は1994年に白血病ではじめて同定されたが(Lapidot, Nature 1994)、その後の研究により膵癌を含

む多くの固形癌において次々と報告された(Li, Cancer Res, 2007)。しかしながら、癌幹細胞の由来およびその特徴的なフェノタイプの背景となる分子生物学的異常はいまだ明らかにされていない。通常幹細胞(stem cell)では、分化・生死に関連した遺伝子群の発現はエピジェネティックな制御で行われており、癌幹細胞ではこのエピジェネティックな遺伝子発現制御機構に何らかの異常が起こっている可能性が極めて高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌幹細胞におけるエピジェネティックな異常をゲノム網羅的に解析し、発癌、癌進展、薬剤耐性および予後など臨床病理学的因子との関係を明らかにし、得られた知見を臨床に応用することである。具体的には、以下のテーマについて研究を進めていく。

(1) 特異的表面抗原にて純化した膵癌幹細胞集団におけるDNAメチレーションの異常を、マイクロアレイを用いた包括的アプローチにて解析する。

(2) 膵癌幹細胞におけるDNAメチレーション異常のターゲット遺伝子の同定と機能解析を行い、膵発癌との関係を調べる。

(3) 膵癌幹細胞に特徴的なエピジェネティック異常と薬剤耐性、予後、また膵癌前駆病変における悪性化との関連を明らかにし、最終的にはこのエピジェネティックな異常をターゲットとした膵癌治療法を開発する。

3. 研究の方法

平成22年の計画

(1) 膵癌幹細胞の純化

一般的に癌幹細胞は全癌細胞中のわずか数パーセント程度であると報告されており、特に固形腫瘍においては癌幹細胞の同定、分離、解析はきわめて困難である。しかしながら、

申請者らは独自のプロトコールにしたがって細胞浮遊液を作成し、目標の表面抗原を発現する純度の高い細胞集団のみを単離する手法を確立している。

まず手術により得られた膵癌切除標本組織を、コラゲナーゼ処理を行って単一細胞レベルまで分離し、細胞浮遊液を作成する。これを、癌幹細胞マーカーとして期待される CD44 陽性分画および CD133 陽性分画を用いてソーティングを行い、膵癌幹細胞を同定、純化する（下図左）。同様のマーカーを用いて膵癌の前駆病変と考えられている IPMN（Intraductal papillary mucinous neoplasm）の切除標本からもソーティングを行い、同腫瘍内における癌幹細胞の同定および純化を行う。また、ソートした癌幹細胞と考えられる細胞集団を実際に新規免疫不全

マウス(NOG マウス)に移植し、腫瘍形成性があることも確認している。

現在 CD44 および CD133 分画を対象に解析を進めているが、これらの細胞集団が癌幹細胞である確証はなく、もちろんソートした細胞集団に癌幹細胞が含まれていない可能性もある。この場合、新たな表面マーカーが必要となる。申請者らはすでに CD133 陽性分画と陰性分画の遺伝子発現をマイクロアレイで比較し、新たな特異的表面マーカーを同定しつつある。

（2）膵癌幹細胞集団における包括的メチレーション異常解析

申請者らは DNA メチレーションの解析については十分にその手技に精通しており、これまでマイクロアレイを用いた網羅的アプローチを駆使して様々な新規膵癌メチル化遺伝子を同定してきた（Sato N, Cancer Res 2003, Sato N, Gastroenterology 2006）。

今回、膵癌細胞株、原発性膵癌組織、およ

び IPMN 切除標本から単離した癌幹細胞集団とそれ以外の細胞集団から DNA を抽出し、プロモーターマイクロアレイを用いて DNA メチレーションのプロファイリングを行う。正常コントロールとしては、手術時に採取した正常膵組織を同様にコラゲナーゼ処理し、上皮のマーカーでソーティングした正常膵管上皮細胞を用いる。本マイクロアレイは、抗メチル化シトシン抗体を用いてクロマチン免疫沈降することにより、約 20,000 個のヒト遺伝子プロモーターのメチル化パターンを一網打尽に解析することができる high-throughput な方法である。マイクロアレイによって得られた莫大な情報を、専用ソフトウェアを用いて統計学的に解析する。まず、クラスター解析を行い、癌幹細胞が他のポピュレーションおよび正常膵管上皮と異なった特異的メチル化パターンを示すかどうかを調べる。次に、癌幹細胞でのみ特異的に異常メチル化している遺伝子を同定する。マイクロアレイによるスクリーニングで得られた膵癌幹細胞異常メチル化候補遺伝子については、実際の細胞、組織内（原発性膵癌、IPMN、正常膵）でのメチル化状態についてメチレーション特異的 PCR やバイサルファイトシーケンスで確認する。また、遺伝子の異常メチル化が発現消失を伴っているかをリアルタイム RT-PCR を用いて調べる。

平成 23 年度以降の計画

（3）膵癌幹細胞特異的メチル化遺伝子の機能解析

マイクロアレイにより得られた膵癌幹細胞メチル化遺伝子のうち、細胞の増殖、アポトーシス、アノイキス、細胞遊走・浸潤能など、発癌および癌の進展に關与する重要な遺伝子を選択し、その膵癌における機能を調べる。

特に、これまで癌であり機能解析が行われていない遺伝子については重点的にしらべ、新規の発癌メカニズムの解明へつなげる。膵癌幹細胞で異常メチル化により発現消失している遺伝子に関しては、発現ベクターを作成し、トランスフェクション法にて遺伝子導入を行う。申請者はこれまでに *TFPI-2* など数個の膵癌メチル化遺伝子の導入実験を行い、その機能を明らかにすることに成功している (Sato N, *Oncogene* 2005)。今回、この遺伝子導入実験をソーティングした癌幹細胞集団で行い、細胞増殖、浸潤能などに与える影響を調べる。純化した膵癌幹細胞はマウスにおいて高い腫瘍形成能を示すことを確認しているが、遺伝子導入が腫瘍形成能に与える影響を *in vivo* (*ex vivo*) で調べる。腫瘍形成抑制効果が得られた遺伝子に関しては、治療のターゲットとしてさらなる解析を行う。

(4) 膵癌幹細胞特異的メチル化遺伝子の臨床への応用

同定し得た癌幹細胞メチル化遺伝子のうち、機能的に重要と考えられるものについては、原発性膵癌組織でのメチル化状態と生存期間など臨床病理学的因子との関係を調査する。予後との関連が示唆されるものが発見できればさらに大規模な症例について検討し、予後因子として臨床応用が可能かどうかを評価する。申請者らはこれまで *p53* 誘導性 G2/M メディエーターである *Reprimo* の異常メチル化が膵癌患者の予後と相関することを示しており (Sato N, *Cancer* 2006)、エピジェネティックマーカーが予後因子として有用であることを報告した。癌幹細胞の特徴の一つとして薬剤耐性機能が報告されているが、癌幹細胞メチル化異常と抗癌剤耐性との関係も調べる。また、腺腫から癌まで様々

な悪性度を示す膵癌前駆病変 IPMN における癌幹細胞メチル化異常を調べ、悪性度 (特に浸潤癌の合併) との関連を明らかにする。

治療に関しては、癌幹細胞とそれ以外のポピュレーションで DNA メチル化阻害剤や HDAC 阻害剤に対する感受性が異なるかを調べる。また、これらの薬剤と通常の抗癌剤とを併用することにより、一般に薬剤耐性を示すとされる癌幹細胞の抗癌剤感受性が高まるかどうかを調べる。

4. 研究成果

膵癌幹細胞は CD133 の表面抗原を有する細胞である可能性が高く、当研究室においてソーティングを行いその間質相互作用に関して報告した。さらに、膵癌幹細胞のマーカーの同定を目指して CD10, CD29, CD34, CD44, CD54, CD105, CD117, CD271, Stro-1, c-Met, MSCA-1 などの表面抗原を発現するサブポピュレーションをソーティングにて分離、純化し、そのフェノタイプおよび DNA メチル化状態を網羅的に解析した。この結果、DNA メチル化プロファイリングが膵癌幹細胞のサブポピュレーションでは明らかに異なっていることを発見した (論文準備中)。また、本解析により同定した遺伝子群のうち、マウス幹細胞の分化に関与することが報告されている細胞接着に関与する遺伝子 *claudin4* (*CLDN4*) に注目し (Stankovich BL, et al., *PLoS One*. 2011;6: e23810)、本遺伝子の発現を膵癌および膵 IPMN で調べた。*claudin4* は、高グレード IPMN で低グレード IPMN より有意に高頻度に発現しており、また予後不良と言われる腸型 IPMN に特異的に発現していた (Tsutsumi K, Sato N, et al. *Mod Pathol* 2011)。さらに、膵癌においては *claudin4* の高発現群は低発現群に比較して予後良好であった (Tsutsumi K, Sato N, et al. *Ann Surg Oncol* 2012)。すなわち、

claudin4 は膵癌幹細胞における特徴的なフェノタイプの責任遺伝子の可能性があると同時に膵腫瘍の特殊な分化（腸型への分化）を示す新たなマーカーとなることが示唆された。今後は同定された遺伝子リストよりピックアップしたDNAメチレーションマーカーを詳細に解析し、膵癌発生や進展における機能的役割を明らかにする予定である。

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 9 件)

1. Ohuchida K, Mizumoto K, Lin C, Yamaguchi H, Ohtsuka T, Sato N, Toma H, Nakamura M, Nagai E, Hashizume M *et al*: **MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the HOXA1 gene.** *Ann Surg Oncol* 2012, **19**(7):2394-2402. 査読有
2. Tsutsumi K, Sato N, Tanabe R, Mizumoto K, Morimatsu K, Kayashima T, Fujita H, Ohuchida K, Ohtsuka T, Takahata S *et al*: **Claudin-4 expression predicts survival in pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Ann Surg Oncol* 2012, **19 Suppl 3**:S491-499. 査読有
3. Tsutsumi K, Sato N, Cui L, Mizumoto K, Sadakari Y, Fujita H, Ohuchida K, Ohtsuka T, Takahata S, Tanaka M: **Expression of claudin-4 (CLDN4) mRNA in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.** *Mod Pathol* 2011, **24**(4):533-541. 査読有
4. Cui L, Ohuchida K, Mizumoto K, Moriyama T, Onimaru M, Nakata K, Nabae T, Ueki T, Sato N, Tominaga Y *et al*: **Prospectively isolated cancer-associated CD10(+) fibroblasts have stronger interactions with CD133(+) colon cancer cells than with CD133(-) cancer cells.** *PLoS One* 2010, **5**(8):e12121. 査読有
5. Miyoshi K, Sato N, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M: **SPARC mRNA expression as a prognostic marker for pancreatic adenocarcinoma patients.** *Anticancer Res* 2010, **30**(3):867-871. 査読有
6. Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Cui L, Ikenaga N, Sato N, Tanaka M: **Enhanced cell migration and invasion of CD133+ pancreatic cancer cells cocultured with pancreatic stromal cells.** *Cancer* 2010, **116**(14):3357-3368. 査読有
7. Onimaru M, Ohuchida K, Nagai E, Mizumoto K, Egami T, Cui L, Sato N, Uchino J, Takayama K, Hashizume M *et al*: **Combination with low-dose gemcitabine and hTERT-promoter-dependent conditionally replicative adenovirus enhances cytotoxicity through their crosstalk mechanisms in pancreatic cancer.** *Cancer Lett* 2010, **294**(2):178-186. 査読有
8. Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Sato N, Kayashima T, Fujita H, Nakata K, Tanaka M: **MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic**

factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation. *Mol*

Cancer 2010, 9:169. 査読有

9. 佐藤典宏: 【**膵癌の増殖・進展に関するシグナル経路研究と臨床展開**】
Other signals related to pancreatic cancer **膵癌の増殖・進展における RELN pathway の関与.**
肝・胆・膵 2010, 61(1):81-90. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 堤宏介, 佐藤典宏, 森泰寿, 安井隆晴, 大内田研宙, 大塚隆生, 高畑俊一, 中村雅史, 水元一博, 田中雅夫
膵液中での claudin-4(CLDN4) 発現解析は腸型 IPMN の術前診断に有用である
第 111 回日本外科学会定期学術集東京都 2011 年 5 月 (紙上開催)
- ② 堤宏介, 佐藤典宏, 大内田研宙, 大塚隆生, 高畑俊一, 中村雅史, 水元一博, 田中雅夫
claudin-4 発現は膵癌の予後予測因子として有用である
第 49 回日本癌治療学会学術総会 (シンポジウム) 名古屋市 2011 年 10 月 28 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 典宏 (SATO NORIHIRO)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20423527

(2) 研究分担者

田中 雅夫 (TANAKA MASAO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 30163570

富永 洋平 (TOMINAGA YOHEI)
九州大学・医学研究院・特任講師
研究者番号: 90304823

高畑 俊一 (TAKAHATA SHUNICHI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 50437779

堤 宏介 (TSUTSUMI KOSUKE)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号: 00467937

(3) 連携研究者
()

研究者番号: