

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390194

研究課題名(和文) 骨髄由来細胞の機能改変による癌幹細胞特異的 niche を標的とした膵癌治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy targeting pancreatic cancer stem cell-niche

研究代表者

下瀬川 徹 (Shimosegawa, Tooru)

東北大学・大学病院・教授

研究者番号：90226275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000 円、(間接経費) 4,470,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では膵癌のcancer stem cell維持に必要なnicheを標的とした新規治療法開発のため、cancer stem cellに関連する細胞形質の制御因子の同定と新たなcancer stem cellマーカーの機能解析を行った。検討の結果、IPMNに比べ膵癌で高発現がみられるmiR-197はp120 cateninの発現抑制を介して上皮間葉形質転換(EMT)を誘導することが判明した。また、膜蛋白質であるCDCP1の発現はcancer stem cell関連細胞形質維持に重要であることを明らかにし、BMP4・ERK経路によりその発現が制御されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We performed a comprehensive analysis to identify an important regulator of cancer stem cell-related phenotype and a novel marker of pancreatic cancer stem cell. miR-197 was highly expressed in pancreatic cancer tissue compared with IPMN, and this microRNA had an epithelial to mesenchymal transition (EMT)-promoting role in cancer cells. miR-197 directly targeted p120 catenin, which was important for the maintenance of epithelial phenotypes. A membrane protein CDCP1 was highly expressed in pancreatic cancer cells, whose knockdown attenuated the cancer stem cell-related phenotypes such as EMT or spheroid formation. Furthermore, we confirmed that the expression of CDCP1 was regulated by BMP4/ERK pathway in pancreatic cancer cells. These data would lead to the identification of novel therapeutic targets that could eliminate cancer stem cells.

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：microRNA cancer stem cell EMT

1. 研究開始当初の背景

膵癌は本邦における部位別癌死亡数の第5位を占め、いまだに増加を続けている癌の一つである。膵癌は早期に周囲組織へ進展し、大血管や重要臓器への浸潤や遠隔転移の形成により根治的手術が困難となることで知られており、膵癌と診断された患者のうち切除が可能である症例は全体の20%程度に留まるとされている。近年の検討により、癌組織中には高い腫瘍形成能を有し、化学療法に対して抵抗性を示す少数の細胞集団が存在することが明らかとなった。このような細胞集団は cancer stem cell と呼ばれており、多様な分化度を呈する癌細胞のヒエラルキーを再構成し、抗癌剤耐性を呈することが報告されている。また、cancer stem cell は高い遊走能を有し、migrating cancer stem cell として遠隔転移の形成にも寄与することが判明している。従来は抗癌剤による治療は腫瘍内で cancer stem cell phenotype を有する細胞集団を増加させ、最終的には治療抵抗性の獲得につながることを判明している。すなわち、膵癌の予後を改善するためには膵癌の cancer stem cell を特異的に標的とする治療法の開発が必要不可欠であると考えられる。

Cancer stem cell は新たな治療標的として有望視されてきたが、普遍的な cancer stem cell を標的とするデリバリーシステムの開発は特異的なマーカーが特定されていないために未だに困難である。正常組織における stem cell の機能維持にはいわゆる niche の存在が重要である。cancer stem cell における niche の必要性についても様々な報告があり、腫瘍間質細胞との相互作用が腫瘍形成に必須であることが明らかとなっている。このような腫瘍内微小環境の制御因子として、microRNA が注目を集めている。microRNA は進化過程において高度に保存された 3' UTR の特異的配列を認識することにより mRNA からの translation を制御する小 RNA 分子であり、一つの microRNA が複数の標的遺伝子の発現を制御することで多彩な生物学的効果を示す。癌細胞における microRNA 発現プロファイルの変化やその標的遺伝子と腫瘍の生物学的悪性度との関係は既に検討されており、膵癌に対して K-ras を標的とすることで抑制的に作用する miR-96 や、対照的に膵癌での高発現がゲムシタピン耐性に関与すると報告されている miR-21 などが同定されている。

本研究計画の立案に際しては、Cancer stem cell の維持を困難にするために腫瘍内に集積する性質を有する骨髄由来細胞の機能を改変し、microRNA を介して微小環境を制御する新規治療開発のための基礎検討を行うことを目的とした。このような治療戦略を実現するためには desmoplasia と呼ばれる膵癌に特徴的な組織構築をもたらす特異的な microRNA 発現プロファイルの解析を進め、膵

癌細胞機能への影響を詳細に解析することが必要であると考えられた。また、膵癌組織内において cancer stem cell marker として候補となりうる分子の機能についての検討も並行して行うこととした。

2. 研究の目的

本研究は、浸潤性膵癌で発現が変化する microRNA によって cancer stem cell に関連する細胞機能が制御される機構を解析するとともに、骨髄細胞による治療標的となる有望な分子標的の同定を目的とした。期間内に以下の検討を行った。

(1) これまでの検討により同定された、浸潤性膵癌の癌腺管において有意な発現変動がみられる microRNA について、細胞機能への影響を検討した。

(2) 細胞機能に変化を与えた microRNA について、その標的遺伝子の同定と機能解析を進めた。

(3) 膵癌細胞において cancer stem cell のマーカーとなりうる分子標的の機能解析を進め、発現制御機構を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト膵癌細胞株 AsPC-1 および Panc-1、Panc-1 派生細胞 (PHU、Di-5、Di-13) は 10% FBS 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium で、5% CO₂ incubator 中で 37°C にて培養した。

(2) 膵癌細胞株における microRNA 強制発現過年度の研究により、IPMN に比較し浸潤性膵癌で発現が増加していた microRNA、miR-197 の強制発現を Pre-miRTM miRNA Precursor (Life Technologies Japan) を用いて行った。培養細胞への transfection は 100nM の濃度で Lipofectamine2000 (Life Technologies Japan) を用いて行った。コントロールには Pre-miRTM miRNA Precursor Molecules Negative Control (Life Technologies Japan) を使用した。

(3) 膵組織中での miR-197 発現の確認

正常膵・IPMN・膵癌組織中での miR-197 発現を評価するため、パラフィン包埋切片を用いて *in situ* hybridization を行った。microRNA 検出用プローブとして DIG-labeled detection probe (EXIQON) を用い、miRCURY LNATM miRNA ISH Optimization Kit (FFPE) (EXIQON)、anti-DIG-AP (Roche Applied Science) および NBT/BCIP ready-to-use tablets (Roche Applied Science) を用いてシグナルを検出した。

(4) microRNA 標的遺伝子の推定

miR-197 標的遺伝子の推定は Targetscan database (<http://www.targetscan.org/>) を用いて行った。

(5) 膵組織中での miR-197 標的遺伝子、p120 catenin の発現確認

正常膵・IPMN・膵癌組織中での p120 catenin 発現と局在は免疫組織化学で確認した。発色は DAB とヒストファイニンキット (ニチレイ) を用いて行った。

(6) 膵癌細胞株における p120 catenin ノックダウン
 培養細胞での p120 catenin ノックダウンには ON-TARGET plus SMARTpool siRNA (Dharmacon) を使用し、Lipofectamine2000 を用いた transfection (最終濃度 100nM) に行った。

(7) CDCP1 ノックダウン細胞株の作成
 他臓器の癌で足場非依存性増殖や細胞生存を促進する機能が報告されている膜蛋白、CDCP1 について、Panc-1 細胞株へ CDCP1 に対する shRNA を発現するベクターを導入して CDCP1 ノックダウン細胞株 Di-5、Di-13 を作成した。コントロール細胞として特定の mRNA を標的としない配列を有するコントロールベクターを導入した細胞株、PHU を作成した。

(8) 各種細胞機能の検討
 細胞遊走能・浸潤能は 8 μ m pore 24-well BD FALCON™ Cell Culture Insert および BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber (BD Biosciences) を用いた two-chamber assay にて確認した。Spheroid 形成能は低接着性プレートを用いた培養系で評価した。

4. 研究成果

(1) 膵癌細胞における miR-197 の機能
 過年度の研究により浸潤性膵癌組織では IPMN に比較して miR-197 発現が増加していることが判明していたため、ヒト膵癌細胞株である Panc-1、AsPC-1 に miR-197 強制発現を行った。miR-197 を導入した Panc-1、AsPC-1 では two-chamber assay にて細胞遊走能とマトリゲルへの浸潤能が増加していることが明らかとなった (図 1)。

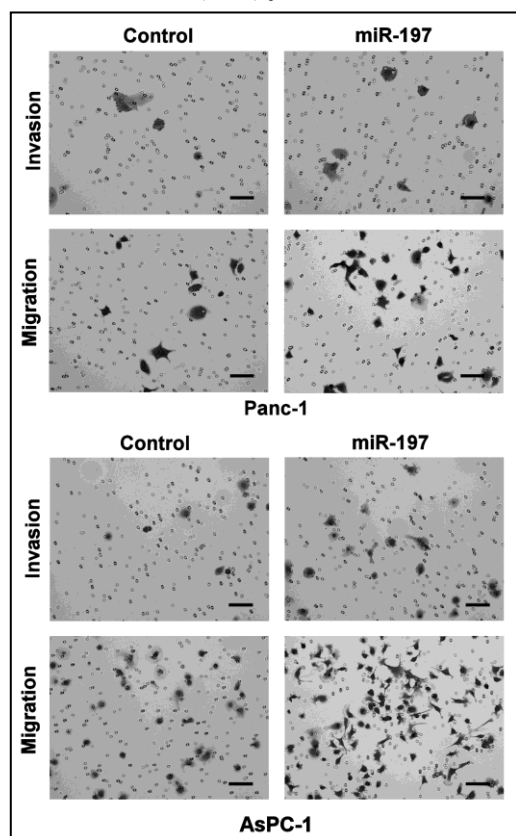


図 1

このような細胞機能の変化とともに上皮系マーカーである E-cadherin の発現は低下し、間葉系マーカーである Vimentin の発現は上昇していた (図 2)。以上の変化は cancer stem cell に関連した細胞形質の一つである上皮間葉形質転換 (EMT) が miR-197 により誘導されたことを示唆するものと考えられた。

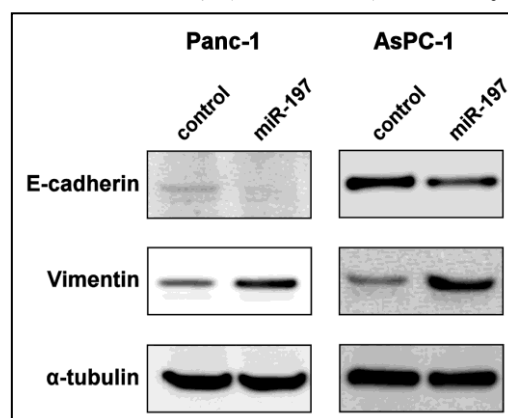


図 2

(2) miR-197 標的遺伝子の同定

Targetscan database による解析から、潜在的な miR-197 標的遺伝子として E-cadherin 結合蛋白である p120 catenin を同定した。p120 catenin の mRNA は miR-197 と相互作用しうる 3' UTR 配列を有していた (図 3)。miR-197 導入は Panc-1、AsPC-1 において p120 catenin 発現を減少させた。

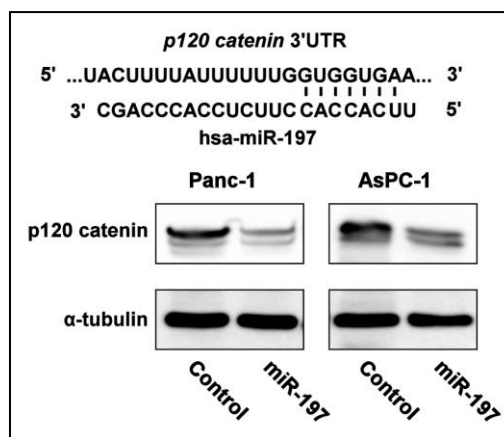


図 3

正常膵組織、IPMN、浸潤性膵癌の組織切片を用いて miR-197 の *in situ* hybridization と p120 catenin の免疫染色を行い、両者の局在を比較した。その結果、図 4 に示すごとく正常膵組織及び IPMN では miR-197 の発現はほとんど認められず、対照的に p120 catenin の発現が腺房細胞・導管細胞・IPMN の腫瘍腺管に確認された。p120 catenin は細胞膜に局在しており、正常膵組織・IPMN 組織において細胞間接着を保つ機能を担っている可能性が考えられた。浸潤性膵癌組織では癌腺管に一致して強い miR-197 発現がみられ、p120 catenin の発現は減弱していた。この結果は miR-197 発現と p120 catenin 発現が相互排他的であることを示すものであった。

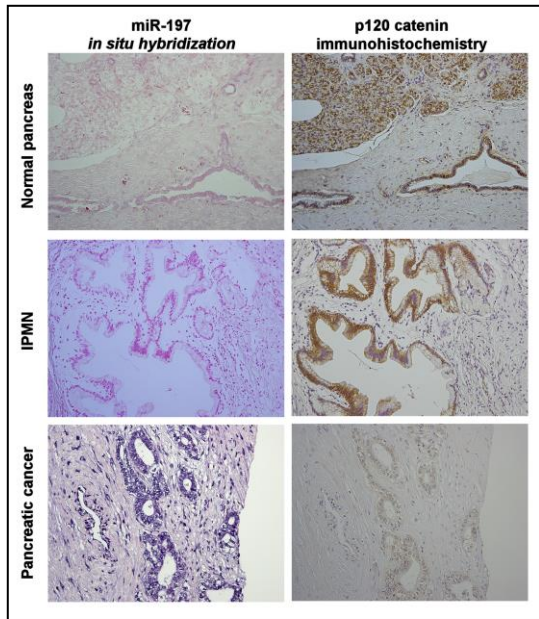


図 4

(3) p120 catenin ノックダウンによる EMT 誘導の確認

Panc-1、AsPC-1 に p120 catenin に対する siRNA を導入したところ、コントロール処理に比べて two-chamber assay にて細胞遊走能とマトリゲルへの浸潤能が増加していることが判明した (図 5)。

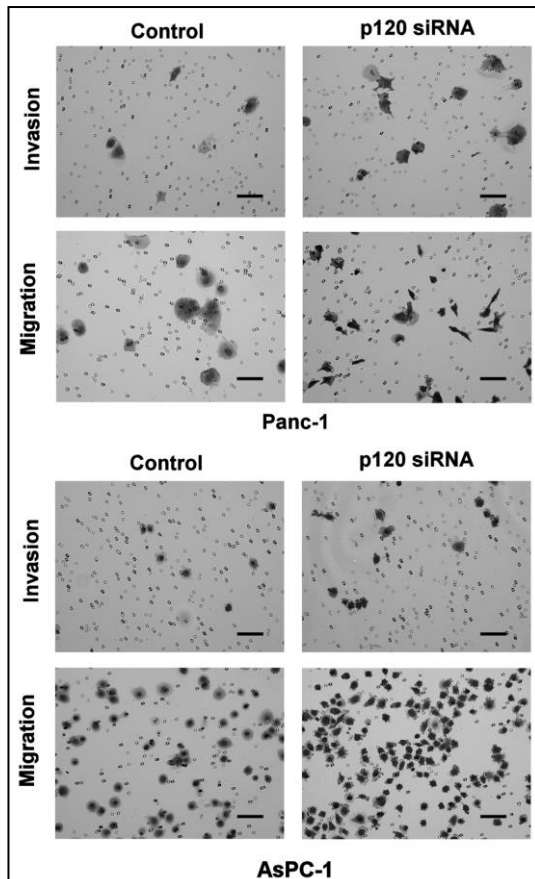


図 5

このような変化とともに、p120 catenin がノックダウンされた Panc-1、AsPC-1 では E-cadherin の発現低下と Vimentin の発現増加がみられ、miR-197 を導入したときと同様

に EMT が誘導されたものと考えられた (図 6)。

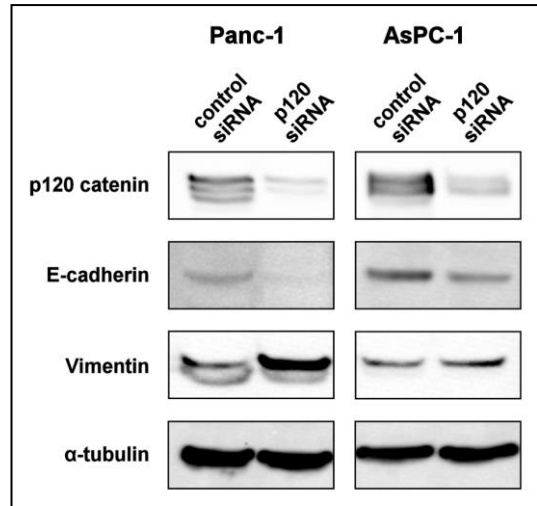


図 6

ここまでの検討によって、miR-197 による p120 catenin の発現制御が cancer stem cell に関連する細胞形質である EMT 誘導に寄与するということが明らかとなった。

(4) 膵癌 cancer stem cell のマーカーとなりうる分子の機能解析

膵癌における cancer stem cell を標的とした新規治療開発のため、あらたな cancer stem cell marker の特定と機能解析を行った。膵癌を含む各種固形癌で発現増加が報告されている CUB-domain containing protein 1 (CDCP1) について、ヒト膵癌細胞株 Panc-1 を用いて安定ノックダウン細胞株を作成して cancer stem cell に関連する細胞機能を評価した。図 7 に示すごとく、CDCP1 ノックダウン細胞株 Di-5 および Di-13 は E-cadherin 発現の増加と N-cadherin 発現の低下を示し、細胞間接着が密となっていた。この結果により、CDCP1 は膵癌細胞の EMT を促進する因子であることが示された。

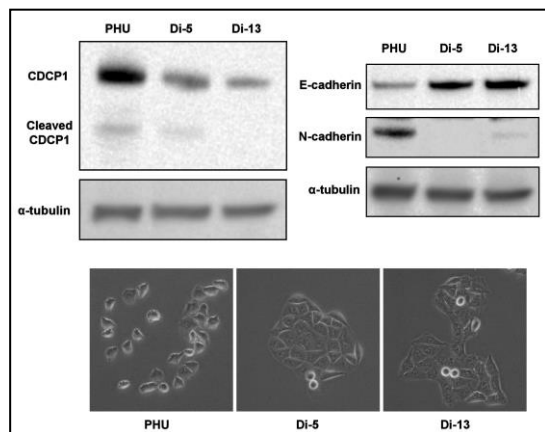


図 7

Two chamber assay で評価した細胞遊走能についても Di-5、Di-13 では低下しており、さらにもう一つの cancer stem cell 関連細胞形質である低接着条件下での spheroid 形成能についても低下が認められた (図 8)。以上の知見は CDCP1 発現レベルが膵癌における cancer stem cell 関連細胞形質と関連してい

ることを示唆しており、CDCP1 が膵癌のあらたな cancer stem cell marker として利用できる可能性が考えられた。

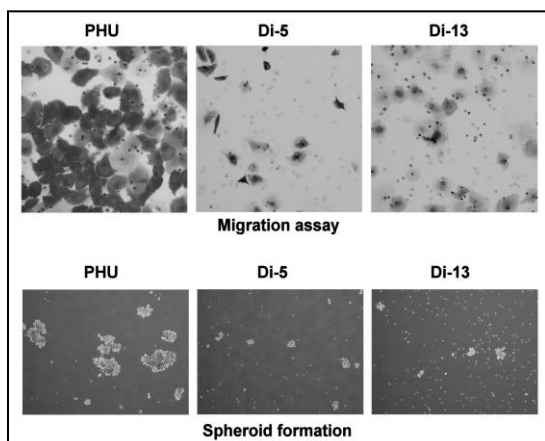


図 8

(5) CDCP1 発現制御機構の解析

Panc-1 を用いて、既報により EMT を誘導することが報告されている各種サイトカインが CDCP1 発現レベルを制御しうるかを検討した。図 9 に示すごとく、Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) は検討したサイトカインの中で最も強く CDCP1 発現を誘導した。

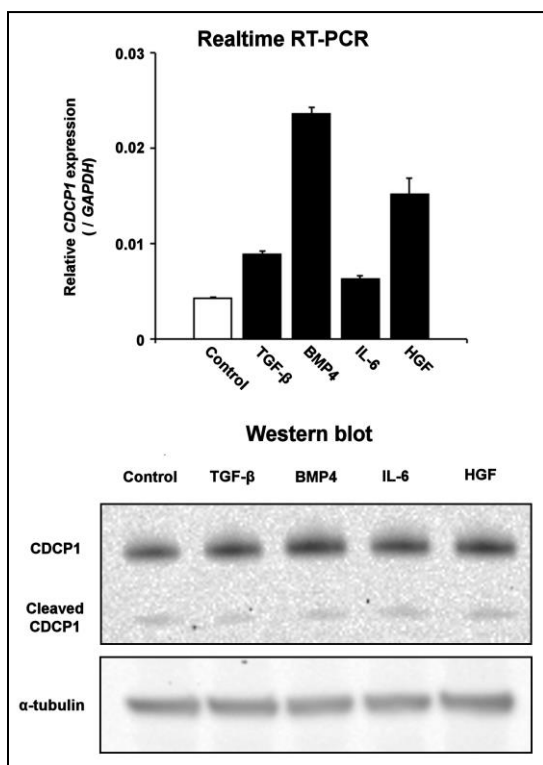


図 9

以前の検討において、BMP4 により活性化される下流の経路のうち ERK 経路が EMT 誘導に寄与することが報告されているため、MEK 阻害剤である U0126 を用いて ERK 経路の阻害が CDCP1 誘導を抑制するかを検討した。U0126 による前処理は ERK の活性化を抑制し、BMP4 のよる CDCP1 誘導も抑制することが確認された (図 10)。以上より、BMP4 は ERK 経路の活性化を介して CDCP1 発現を誘導することが明らかとなった。

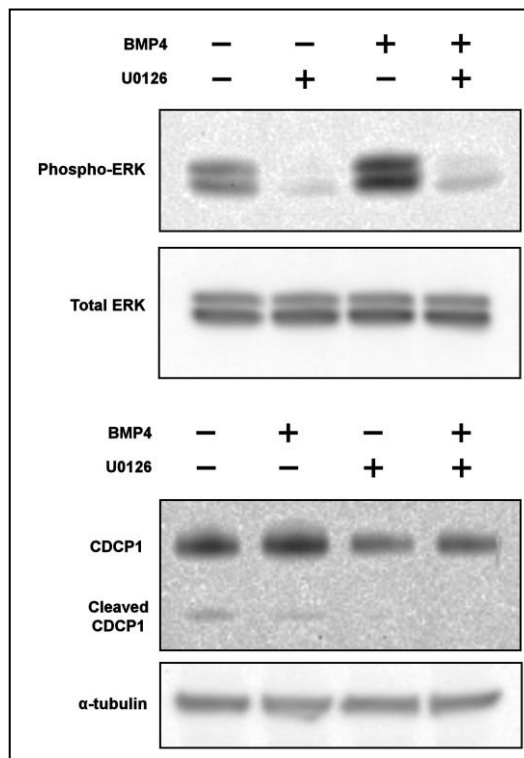


図 10

さらに、BMP4 により誘導される膵癌細胞の EMT が CDCP1 ノックダウンによって抑制されるかについても確認した。図 11 に示すように、BMP4 による E-cadherin 発現の抑制効果は Di-5 および Di-13 において減弱しており、細胞遊走能の促進効果も低下していた。

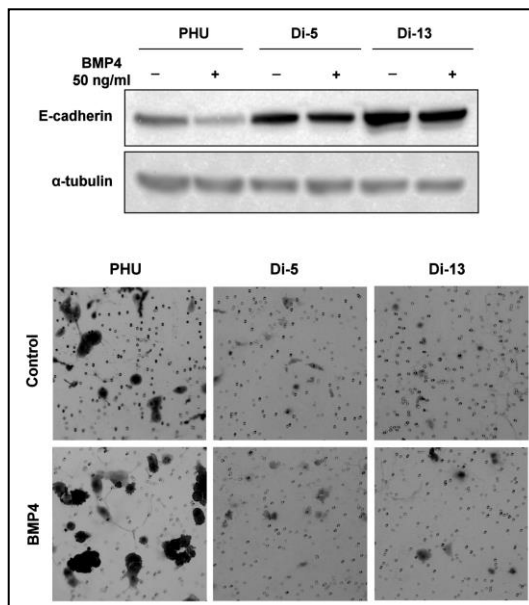


図 11

この結果は CDCP1 が BMP4 の下流で EMT 誘導に重要な役割を果たすことを意味しており、様々な細胞外刺激の影響を受ける cancer stem cell 関連細胞形質のうち、BMP4 に依存するものが CDCP1 を介して制御されている可能性が考えられた。

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 5 件)

1. Miura S, Hamada S, Masamune A, Satoh K, Shimosegawa T.

CUB-domain containing protein 1 represses the epithelial phenotype of pancreatic cancer cells.

Exp Cell Res. 2014;321(2):209-218.

doi: 10.1016/j.yexcr.2013.12.019.

査読有

2. Hamada S, Masamune A, Miura S, Satoh K, Shimosegawa T.

MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX.

Cell Signal. 2014;26(2):179-185.

doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.003.

査読有

3. Hamada S, Satoh K, Miura S, Hirota M, Kanno A, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Unno J, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T.

miR-197 induces epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by targeting p120 catenin.

J Cell Physiol. 2013;228(6):1255-1263.

doi: 10.1002/jcp.24280.

査読有

4. Hamada S, Masamune A, Takikawa T, Suzuki N, Kikuta K, Hirota M, Hamada H, Kobune M, Satoh K, Shimosegawa T.

Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2012;

421(2):349-354.

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.014.

査読有

5. Hamada S, Satoh K, Fujibuchi W, Hirota M, Kanno A, Unno J, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Shimosegawa T.

MiR-126 acts as a tumor suppressor in pancreatic cancer cells via the regulation of ADAM9.

Mol Cancer Res. 2012;10(1):3-10.

doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0272.

査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 濱田晋 佐藤賢一 正宗淳 菅野敦 菊田和宏 糸潔 廣田衛久 下瀬川徹

浸潤性膵癌特異的 oncomiR である miR-197 は VDAC1 発現を制御し好氣的解糖を促進する
第 44 回膵臓学会大会 仙台 2013 年 7 月 25 日

2. Hamada S, Satoh K, Masamune A, and Shimosegawa T.

Identification of inflammatory signal-stimulating microRNA in pancreatic duct cell carcinoma.

JSGE-ITC 2013 鹿児島 2013 年 3 月 23 日

3. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Unno J and Shimosegawa T.

Identification of invasion-related microRNAs in pancreatic cancer by comprehensive analysis.

UEGW 2012 Amsterdam 2012 年 10 月 23 日

4. 濱田晋 佐藤賢一 三浦晋 廣田衛久 菅野敦 正宗淳 菊田和宏 糸潔 海野純 江川新一 元井冬彦 海野倫明 下瀬川徹
miR-197 は膵癌細胞の EMT 誘導因子であり、p120 catenin 発現を制御する

JDDW 2012 神戸 2012 年 10 月 10 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下瀬川 徹 (Tooru Shimosegawa)

東北大学・大学病院・教授

研究者番号：90226275

(2) 研究分担者

正宗 淳 (Atsushi Masamune)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90312579

佐藤 賢一 (Kennichi Satoh)

宮城県立がんセンター・がん幹細胞研究部・部長

研究者番号：10282055

濱田 晋 (Shin Hamada)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20451560