

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590477

研究課題名(和文)膵臓癌幹細胞の同定と新たな治療への試み

研究課題名(英文) Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells and Development of Novel Therapeutic Strategies using Stem Cell Markers

研究代表者

内藤 善哉(Naito, Zenya)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20237184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膵臓の癌幹細胞(CSC)マーカーのCD24, CD44, CD133, CXCR4, ESAやnestinは、前癌病変のPanINや膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)の異型度が高くなるにつれ発現が増加し、浸潤性膵管癌では高発現していた。CD133は、静脈侵襲と関連、CD24、ESAとCXCR4発現は、腺癌の分化度と関連を示した。増殖マーカーMCM2などの発現も、前癌病変の異型度につれ増強し、上皮内癌や浸潤癌では、有意に高発現した。新たに樹立した膵管細胞癌1株で、CXCR4は高発現、腺扁平上皮癌2株を含め全てで、ESA、MCM2の高発現を認めた。一方、免疫抑制マウスで腫瘍形成は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The cancer stem cell markers for human pancreatic ductal adenocarcinoma are expressed in precancerous lesions, PanIN and IPMNs. The expression levels had increased strongly higher dysplasia in the precancerous lesions and marked overexpression was observed in adenocarcinomas. The CD133 overexpression in adenocarcinoma correlated with venous invasion. CD24, ESA and CXCR4 expressions in adenocarcinomas were related with well-differentiated types. The Ki-67 and MCM2 labeling indices of the cell proliferation markers was greater in higher grade precancerous lesions compared to low grade precancerous lesions, and increased markedly in carcinoma in situ and in invasive lesions. The newly ductal adenocarcinoma cell line that we established showed an overexpression of CXCR4. This cell line and 2 adenosquamous cell lines showed high levels of expression of ESA and MCM2. These cell lines were not tumorigenic in nude mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：癌幹細胞 膵癌 前癌病変 癌幹細胞マーカー

1. 研究開始当初の背景

近年の悪性腫瘍に対する医療の進歩にも関わらず、膵癌の予後はきわめて不良であり、5年生存率は5%にも満たない。その原因は、進行が早く診断時には既に切除不能となっている例や、切除術後に局所浸潤や遠隔転移のため再発する例が多いことに加え、これらの症例に対して未だ有効な治療手段が開発されていないためである。このため膵癌に対する新たな治療手段の開発が待ち望まれている。

白血病細胞の研究から明らかとなった癌幹細胞 (CSC) は、固形腫瘍においてもその存在が確認され、膵癌での報告も近年みられるようになった。癌幹細胞は自己複製能と多分化能を有する一方、増殖速度が遅く、薬剤排泄能が高いなどの特徴を有している。このため手術不能例や術後再発例では従来の抗癌剤を中心とした治療法ではCSCを根絶することは困難であり、膵癌の増殖、浸潤、転移、及び治療後再発において中心的な役割を担っていると考えられる。現在までに膵癌幹細胞マーカーとして、フローサイトメーターの検討から、CD133, CD44, CD24, epithelial specific antigen (ESA)などが、異なった研究施設から報告されている。これらの結果からは膵癌幹細胞は癌細胞全体の1パーセント以下、また多くても数パーセントと考えられている。しかし申請者らのヒト膵臓癌組織を用いた免疫組織学的研究では、これらのマーカーは異なった癌細胞に陽性となっているだけでなく、フローサイトメーターの結果と比較すると、極めて多くの膵癌細胞に陽性となっている。この理由として、CSCには分化能があり、膵癌組織から分離し、フローサイトメーターで測定するまでの培養状態でも、分化してしまうことも推察される。膵癌幹細胞に特異的なマーカーを発見することは、CSCに対して選択的に効果のある化学療法や分子標的治療法の開発に繋がる極めて重要な問題であると考えられるが、現状ではそのようなマーカーは同定されていない。

2. 研究の目的

近年、膵癌の癌細胞のなかに自己複製能と分化能を有し、転移浸潤能が高く抗癌剤や放射線治療に不応性のCSCが存在することが明らかとなった。CSCは易転移性で、膵癌の再発、転移に重要な役割を果たしていると考えられる。今回の研究では、ヒト病理組織における、各種CSCマーカーの局在と発現レベルについて、増殖能や分化能などと比較検討し、膵癌CSCマーカーの有力な候補を絞りこみ、このマーカーにより膵癌幹細胞をヒト膵癌組織から選択的に採取することを目指した。さらに、これらの膵癌細胞を用いて分子標的治療薬などの抗癌剤の治療効果を検討し、膵臓癌の癌幹細胞の新たな治療法を開発を目指した。

3. 研究の方法

【平成23年度】

膵癌で最も多い組織型である浸潤性胆管癌 (PDAC) のヒト膵臓癌病理組織標本を用い、現在までに特異的CSCマーカーとして報告されているCD133, CD24, Cytokine receptor 4 (CXCR4), ESA, CD44, またnestinについて検討した。さらに、PDACとその前癌病変であるPanIN病変、および正常膵組織を用いて免疫組織化学的に局在と発現レベルを検討した。さらに、それらのCSCマーカー発現と臨床上的意義や役割について検討した。

【平成24年度】

通常型浸潤性胆管癌 (CPDAC) とその前癌病変であるPanINおよび、最近増加の傾向にある前癌病変の膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) とIPMN由来の膵管内癌 (ICIS) とIPMN由来の浸潤性膵管癌 (IPDAC) について、CD24, CSCとの関連が報告されているPSF1 (partner of sld five 1)、PSF1と複合体を形成するMCM2 (mini-chromosome maintenance 2)、さらに細胞増殖マーカーのKi-67の局在と発現レベルについて免疫組織学的に解析した。

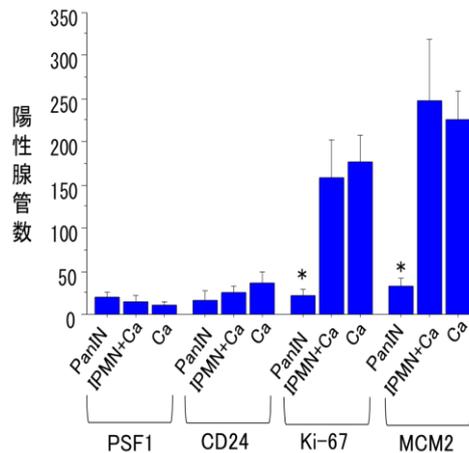
【平成 25 年度】

膵癌切除組織より膵癌細胞株を樹立し、膵管細胞マーカーの CK7, CK19, CK34 β E2, CA19-9, 腺房細胞マーカーの膵酵素等の検討と、CSC マーカーの発現について検討した。さらに樹立した膵癌細胞株を用い免疫抑制 nude マウスへの移植実験を行った。

4. 研究成果

- (1) CD133 以外の CSC マーカー陽性細胞は、正常膵管 < 低グレード PanIN < 高グレード PanIN < 通常型浸潤性胆管癌 (CPDAC) の順に増加した。
- (2) CD133 を除く CSC マーカーの発現率は、PanIN のグレード上昇に伴い増加した。
- (3) CD133 発現率は静脈侵襲に関連し、ESA および CXCR4 発現率は、高分化型 CPDAC に多く発現することが、明らかとなった。
- (4) 腺扁平上皮癌においては ESA と CD133 は腺癌成分優位に、CD44 は扁平上皮癌成分に優位に発現が見られた。
- (5) 未分化癌においては ESA、CD24 は腺癌成分優位に、CD44 および nestin は未分化癌成分に優位に発現が見られた。
- (6) CD24 は、PanIN、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の腺腫、IPMN 由来の膵管内癌 (ICIS) さらに CPDAC や IPMN 由来の浸潤性膵管癌 (IPDAC) で腫瘍腺管に陽性となり、特に IPMN の腺腫より ICIS や IPDAC では、強発現する傾向を示した。
- (7) PSF1 は、各病変で有意な差は認めず、ほぼ一定の割合で発現していた。
- (8) 3 種類の膵癌細胞株の樹立に成功した。
- (9) 1 株は、膵管癌、2 株は、腺扁平上皮癌のマーカーや形質を示した。
- (10) CSC マーカーに関して、膵管癌細胞株で、CXCR4 の高発現を認めた。
- (11) 3 株全てにおいて、ESA、MCM2 の高発現を認めた。
- (12) これらの 3 株を用いた直接接種移植実

験では、すべての細胞株において免疫抑制 nude マウスで腫瘍形成は認められなかった。



PanIN, IPMN+Ca, Ca における PSF1, CD24, Ki-67, MCM2 の陽性腺管数を示す。Ki-67 と MCM2 は PanIN で低値を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 22 件)

- ① Simultaneous Detection of Different RNAs Using a Novel Branched DNA in situ Hybridization Method. : Yoshimura H, Matsuda Y, Kawamoto Y, Naito Z, Ishiwata T. J Nippon Med Sch. 2014;81(2):62-3. <http://dx.doi.org/10.1272/jnms.81.62> (査読有)
- ② Altered expression of fibroblast growth factor receptor 2 isoform IIIc: relevance to endometrioid adenocarcinoma carcinogenesis and histological differentiation. : Peng WX, Kudo M, Fujii T, Teduka K, Naito Z. Int J Clin Exp Pathol. 2014 Feb 15;7(3):1069-76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971310/> (査読有)
- ③ Nestin regulates proliferation, migration, invasion and stemness of lung adenocarcinoma. : Narita K, Matsuda Y, Seike M, Naito Z, Gemma A, Ishiwata T. Int J Oncol. 2014 Apr;44(4):1118-30. doi: 10.3892/ijo.2014.2278. (査読有)

- ④ Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid IL2R γ (null) (NOG) mice. : Matsuda Y, Yoshimura H, Ueda J, Naito Z, Korc M, Ishiwata T. Am J Pathol. 2014 Mar;184(3):674-85. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.014. (査読有)
- ⑤ Analysis of protein expression regulated by lumican in PANC-1 cells using shotgun proteomics. : Yamamoto T, Kudo M, Peng WX, Naito Z. Oncol Rep. 2013 Oct;30(4):1609-21. doi: 10.3892/or.2013.2612. (査読有)
- ⑥ Lumican as a novel marker for differential diagnosis of Bowen disease and actinic keratosis. : Takayama R, Ishiwata T, Ansai S, Yamamoto T, Matsuda Y, Naito Z, Kawana S. Am J Dermatopathol. 2013 Dec;35(8):827-32. doi: 10.1097/DAD.0b013e31827c7f31. (査読有)
- ⑦ Expression of Lumican in Hydroacanthoma Simplex and Clonal-Type Seborrhic Keratosis as a Potent Differential Diagnostic Marker. : Takayama R, Ansai SI, Ishiwata T, Yamamoto T, Matsuda Y, Naito Z, Kawana S. Am J Dermatopathol. 2013 May 7. [Epub ahead of print] doi: 10.1097/DAD.0b013e31828b6bbf (査読有)
- ⑧ Nestin is highly expressed in advanced-stage melanomas and neurotized nevi. : Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. Oncol Rep. 2013 Apr;29(4):1595-9. doi: 10.3892/or.2013.2287. (査読有)
- ⑨ Inhibition of the stem cell marker nestin reduces tumor growth and invasion of malignant melanoma. : Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. J Invest Dermatol. 2013 May;133(5):1384-7. doi: 10.1038/jid.2012.508. (査読有)
- ⑩ Ultra-high-resolution images of nestin and vimentin in pancreatic carcinoma cells using 2 novel microscopy systems. : Yoshimura H, Matsuda Y, Naito Z, Murase M, Kawamoto Y, Ishiwata T. J Nippon Med Sch. 2012;79(6):392-3. http://dx.doi.org/10.1272/jnms.79.392 (査読有)
- ⑪ Expression of cancer stem cell markers in pancreatic intraepithelial neoplasias and pancreatic ductal adenocarcinomas. : Kure S, Matsuda Y, Hagio M, Ueda J, Naito Z, Ishiwata T. Int J Oncol. 2012 Oct;41(4):1314-24. doi: 10.3892/ijo.2012.1565. (査読有)
- ⑫ Keratinocyte growth factor stimulates growth of MIA PaCa-2 cells through extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. : Yamamoto T, Matsuda Y, Kawahara K, Naito Z, Ishiwata T. Oncol Lett. 2012 Feb;3(2):307-310. doi: 10.3892/ol.2011.466 (査読有)
- ⑬ CD44 in human glioma correlates with histopathological grade and cell migration. : Yoshida T, Matsuda Y, Naito Z, Ishiwata T. Pathol Int. 2012 Jul;62(7):463-70. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02823.x. (査読有)
- ⑭ Expression and role of nestin in human cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. : Sato A, Ishiwata T, Matsuda Y, Yamamoto T, Asakura H, Takeshita T, Naito Z. Int J Oncol. 2012 Aug;41(2):441-8. doi: 10.3892/ijo.2012.1473. (査読有)
- ⑮ Enhanced expression of fibroblast

- growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation. : Ishiwata T, Matsuda Y, Yamamoto T, Uchida E, Korc M, Naito Z. *Am J Pathol*. 2012 May;180(5):1928-41. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.01.020. (査読有)
- ⑩ Secreted 70kDa lumican stimulates growth and inhibits invasion of human pancreatic cancer. : Yamamoto T, Matsuda Y, Kawahara K, Ishiwata T, Naito Z. *Cancer Lett*. 2012 Jul 1;320(1):31-9. doi: 10.1016/j.canlet.2012.01.023. (査読有)
- ⑪ Nestin as a novel therapeutic target for pancreatic cancer via tumor angiogenesis. : Yamahatsu K, Matsuda Y, Ishiwata T, Uchida E, Naito Z. *Int J Oncol*. 2012 May;40(5):1345-57. doi: 10.3892/ijo.2012.1333. (査読有)
- ⑫ Keratinocyte growth factor induces matrix metalloproteinase-9 expression and correlates with venous invasion in pancreatic cancer. : Cho K, Matsuda Y, Ueda J, Uchida E, Naito Z, Ishiwata T. *Int J Oncol*. 2012 Apr;40(4):1040-8. doi: 10.3892/ijo.2011.1280. (査読有)
- ⑬ Immunocytochemical analysis of a three-dimensional spheroidal culture system. : Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z. *J Nippon Med Sch*. 2011;78(4):206-7. (査読有)
- ⑭ Overexpressed fibroblast growth factor receptor 2 in the invasive front of colorectal cancer: a potential therapeutic target in colorectal cancer. : Matsuda Y, Ishiwata T, Yamahatsu K, Kawahara K, Hagio M, Peng WX, Yamamoto T, Nakazawa N, Seya T, Ohaki Y, Naito Z. *Cancer Lett*. 2011 Oct 28;309(2):209-19. doi: 10.1016/j.canlet.2011.06.009. (査読有)
- [学会発表] (計 44 件)
- ①山本 哲志、工藤 光洋、彭 為霞、高田 英志、三田村 邦子、多賀 淳、内藤 善哉 : ホルマリン固定パラフィン包埋大腸がん組織を用いた新規診断マーカーの探索: 第 72 回 日本癌学会学術総会 (2013 年 10 月 3 日-5 日、横浜)
- ②石渡 俊行、松田 陽子、吉村 久志、川原 清子、河本 陽子、鈴木 妙子、柳澤 祐次、内田 英二、内藤 善哉 : 膵癌における FGFR-2 の抑制効果と、発現制御機構の検討: 第 102 回 日本病理学会総会 (2013 年 6 月 6 日-8 日、札幌)
- ③川原 清子、松田 陽子、中澤 南堂、河本 陽子、鈴木 妙子、石渡 俊行、内田 英二、内藤 善哉 : 手術検体からの膵癌培養細胞樹立の検討: 第 102 回 日本病理学会総会 (2013 年 6 月 6 日-8 日、札幌)
- ④ Ishiwata T, Yoshimura H, Suzuki T, Yanagisawa Y, Kawamoto Y, Kawahara K, Naito Z, Korc M, Matsuda Y : Inhibition of Nestin Using siRNA as a Novel Therapeutic Option for Pancreatic Cancer. American association for cancer research, 104th annual meeting 2013, AACR, April 7th 2013, Washington, DC
- ⑤Matsuda Y, Yoshimura H, Suzuki T, Naito Z, Kawahara K, Yanagisawa Y, Kawamoto Y, Ishiwata T : Inhibition of Phosphorylation of Nestin Decrease Pancreatic Cancer Cell Growth. American association for cancer research, 104th annual meeting 2013, AACR, April 9th 2013, Washington, DC
- ⑥Naito Z, Peng W-X, Isobe H, Katayama H, Hosone M, Tanno M, Maeda S : Availability of cytological diagnoses in pancreatobiliary tract diseases and

cytological slide seminar of pancreatobiliary tract lesions: The 20th Thai-Japanese Workshop In Diagnostic Cytopathology. January 16-18, 2013. Thailand

- ⑦ 吳 壯香、松田 陽子、萩尾 真人、鈴木 妙子、柳沢 祐次、上田 純志、山初 和也、山本 哲志、内藤 善哉、石渡 俊行：膵癌・PanIN における癌幹細胞マーカーの発現：第 101 回日本病理学会総会（2012 年 4 月 26 日-28 日、東京）
- ⑧ 山本 哲志、工藤 光洋、川原 清子、彭 為霞、松田 陽子、石渡 俊行、内藤 善哉：膵癌細胞における分泌型 lumican の増殖・浸潤への関与：第 101 回日本病理学会総会（2012 年 4 月 26 日-28 日、東京）
- ⑨ Kure S, Matsuda Y, Hagio M, Suzuki T, Ueda J, Yamahatsu K, Yamamoto T, Ishiwata T, Naito Z : Expression of Cancer Stem Cell Markers in Pancreatic Ductal Adenocarcinomas and Pancreatic Intraepithelial Neoplasias: American association for cancer research, 103rd annual meeting 2012, AACR, April 1st 2012, Chicago, IL
- ⑩ Yamahatsu K, Matsuda Y, Hagio M, Aimoto T, Nakamura K, Uchida E, Naito Z. Nestin inhibits proliferation of vascular endothelial cells in vitro and tumor angiogenesis in pancreatic cancer in vivo. : American Pancreatic Association Meeting, APA, Chicago, Nov. 5th 2011
- ⑪ 石渡 俊行、松田 陽子、上田 純志、川原 清子、萩尾 真人、山本 哲志、内田 英二、Murray Korc、内藤 善哉：膵癌の新規分子標的としての線維芽細胞増殖因子受容体 2 (FGFR2)：第 70 回 日本癌学会学術総会（2011 年 10 月 3 日-5 日、名古屋）
- ⑫ 川原 清子、松田 陽子、藤井 雄文、山初 和也、上田 純志、石渡 俊行、内藤 善哉：

NOG マウス膵癌転移モデルの転移細胞株における細胞動態の検討：第 100 回日本病理学会総会（2011 年 4 月 28 日-30 日、横浜）

〔図書〕（計 1 件）

- ① (1) (編集)「病理と臨床 Vol.31 臨時増刊号 細胞診の基本から実践へ」：内藤善哉、羽場礼次、文光堂、2013 年、413 ページ
(2) 同書内、(分担執筆)(第 1 部)細胞診の基本 細胞診断の基本 術中迅速細胞診：片山博徳、細根勝、丹野正隆、前田昭太郎、内藤善哉、10 ページ
(3) 同書内、(分担執筆)(第 2 部)細胞診の実際とトピックス リンパ節 悪性：細根勝、丹野正隆、片山博徳、磯部宏昭、内藤善哉、12 ページ
(4) 同書内、(分担執筆)(第 2 部)細胞診の実際とトピックス 19.膵臓：内藤善哉、竹中明美、9 ページ

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nms-pathology.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 善哉 (NAITO, Zenya)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20237184

(3) 連携研究者

石渡 俊行 (ISHIWATA, Toshiyuki)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90203041

松田 陽子 (MATSUDA, Yoko)

日本医科大学・医学部・講師

2013 年 11 月より下記に移動

地方独立行政法人 東京都長寿健康医療センター・病理診断科・医長

研究者番号：20363187