

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591897

研究課題名(和文) 乳癌遠隔転移における間葉系幹細胞(MSC)の役割の解明とその臨床的意義の検討

研究課題名(英文) Elucidation and examination of the role and the clinical meaning of mesenchymal stem cells (MSC) in breast cancer distant metastases.

研究代表者

白羽根 健吾 (SHIRAHANE, KENGO)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：10529803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では乳癌の治療抵抗性や遠隔転移に関わるMSCを特定しその役割を解明した上で乳癌の新たな治療戦略を創造する。乳癌におけるDesmoplasiaからのMSC分離作業の習得に当たり、研究室に豊富に存在する膵癌のサンプルを用い、MSCのマーカーとされている多数の表面マーカーの発現解析を行った。CD10は10%前後の発現であり、MSCを同定するための重要な抗原の候補であり、CD105は95-100%の発現だが、陰性細胞陽性細胞で分取行うと、数日後発現状況が均一化した。CD271陽性の間質細胞は膵癌に対して癌細胞との共培養下で一旦上昇後に低下しており、免疫染色で発現が多い症例ほど予後良好であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, MSC relating with the chemotherapy resistance and distant metastases of a breast cancer was evaluated, and the aim of this study was to create the new strategy for breast cancer. First, the pancreatic cancer tissues in our laboratory were used for MSC separation. Expression analysis of many surface markers used as the marker of MSC was conducted. CD10 was expressed in 10% of mesenchymal cells and it was considered to be one of the candidates of the important antigen for identifying MSC. Although expression rates of CD105 were 95-100%, the expression rates equalized easily after isolation. CD271 positive rates was increased under co-culture with pancreatic cancer cells, and CD271 expression in mesenchymal cells was related with good prognosis.

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：乳癌 間葉系幹細胞(MSC) 間質増生(desmoplasia) 癌間質相互作用

1. 研究開始当初の背景

日本人の乳癌の罹患率は全悪性腫瘍の中でも第1位であり、今後も増加していくことが予想される。これまでも腫瘍細胞自体に関する研究が進められ分子標的治療薬などを含めた集学的治療が行われているが、乳癌の再発・転移に対する治療はまだまだ困難であり、死亡率の低減化には至っていない。近年、癌組織中にある特定の微量細胞集団だけが腫瘍形成能を持つとする癌幹細胞の概念が提唱され、特異的細胞標的治療の対象として注目を浴びている。乳癌においてはCD44+ CD24-/low ESA+細胞が癌幹細胞であることが証明され、これらの細胞集団は抗癌剤抵抗性や放射線耐性を有していることが示唆された。また、乳腺組織は豊富な間質構造を有するため、癌間質相互作用が乳癌の高い浸潤能、転移能、治療抵抗性に強く影響を与える。さらに、癌幹細胞を周囲微小環境で支持する間質細胞(ニッチ)の存在も報告され、その相互作用が今後の新たな治療標的になると大きく期待される。しかしながら間質細胞には様々なphenotypeが存在しその機能は一様ではなく、一部の特定の間質細胞だけがニッチの働きを担っているものと考えられる。乳癌においても乳癌由来線維芽細胞が骨髄中の内皮前駆細胞の誘導を介し血管新生を促し、腫瘍の成長に大きく貢献していることが明らかにされたが、その多様性に関する検討はなされていない。申請者らはこれまで癌間質相互作用の検討および癌幹細胞に関する研究に取り組み、大腸癌や膵癌を対象に細胞膜表面抗原に対する多色の蛍光抗体を駆使したソーティング技術を利用し、癌幹細胞新規特異的表面抗原の同定、分離、解析を進めてきた。これまで膵癌同様、乳癌でも desmoplasia の報告はみられ、Platelet-derived growth factor の関与が示唆されている。乳癌の遠隔転移は大きな予後規定因子であるが、原発巣の desmoplasia の中から如何にして癌細胞が他臓器へと転移していくのかは重要な研究課題である。乳癌では間質線維芽細胞が癌細胞浸潤の先導役として共に移動すると報告されており、申請者は間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem cells; MSC) が乳癌細胞浸潤の先導役として働き、原発巣での desmoplasia 形成のみならず遠隔臓器での微小転移巣形成にも関与するのではないかと考え、本研究を構想した。

2. 研究の目的

本研究では乳癌の治療抵抗性や遠隔転移に関わる MSC を特定し、その役割を解明した上で乳癌の新たな治療戦略を創造することを目的とする。desmoplasia を誘導する MSC を prospective に同定し、その癌細胞との相互作用を含めた生物学的特徴を明らかにする。特に予後に直接関わる治療抵抗性と遠隔

転移形成機序に焦点をあて、乳癌根治を目指す治療法を開発する。

3. 研究の方法

乳癌組織における MSC の同定および純化を行い、さらに効率的に同定・純化するため MSC に特異的な表面抗体を検索する。また、純化した間葉系幹細胞と癌細胞とを共培養し、本研究で特に独創的な点である癌細胞を支持するニッチとしての役割を、特に治療抵抗性と転移機序に焦点を当て検討を進める。

癌周囲微小環境再現モデルによる腫瘍形成性の変化や治療抵抗性、EMT に基づく浸潤能・転移能、癌間質相互作用などを解析し、これら固形癌に特有なプロセスへの関与を検討する

癌細胞ニッチ相互作用を標的とした新規乳癌治療を開発する。

4. 研究成果

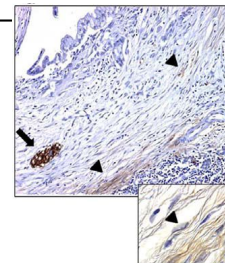
乳癌における Desmoplasia からの MSC 分離作業に当たって、研究室に豊富に存在する膵癌のサンプルを用いることとした。膵癌は乳癌同様 Desmoplasia を特徴としており、MSC の樹立には非常に適した疾患と思われる。以前より当研究室でヒト膵癌組織から樹立した間質細胞(膵星細胞)を用い表面抗原の解析を進めてきていた。本研究ではその結果をふまえた上で、およそ 50 サンプル以上を用い MSC のマーカーとされている CD10、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD106、CD117、CD146、CD166、CD271、Stro-1、VEGFR-1 などの多数の表面マーカーの発現解析を行った。これらの表面抗原解析の過程で、CD29、CD166 はほぼすべての間質細胞に発現を認めた。一方、Stro-1 などは 1% 以下の微量しか存在せず、発現強度も弱く解析は困難であり断念した。

CD10 は 10% 前後の発現であり 2010 年に膵癌の悪性度に関わる因子であることを報告していたが、MSC を同定するための重要な抗原の候補の一つと考えられた。CD10 以外の抗原の解析において、いくつかの特徴を確認することができた。CD105 は 95-100% の発現であったが、陰性細胞陽性細胞で分取行うと、数日後に発現状況が均一化した。CD271 陽性の間質

細胞は膵癌に対してであるが、癌細胞との共培養下で一旦上昇した後に低下しており、免疫染色で発現が多い症例ほど予後良好であった。

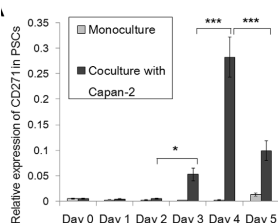
CD10 は対称的に癌細胞共培養下で CD271 より遅れて上昇を開始し継続的に上昇するという対照的な発現パターンといえ、癌細胞に対し CD10 と全く逆の

組織における CD271 陽性間質細胞



抵抗性の因子である可能性も考えられた。CD271 の検証結果は論文で報告を行った。CD146 は、線維芽細胞で CD146 を knockdown した後癌細胞と共培養すると、癌細胞の遊走能・浸潤能が増強されていた。

CD271 の経時的変化、機能的分取による発現



またその際、線維芽細胞における腫瘍促進因子 CCL5・COX2 などの mRNA 発現が増強されていることも確認でき、CD146 陽性の線維芽細胞が癌細胞に対し抵抗性の因子である可能性があり、同内容の学会発表を行った。CD51 において CD146 と同様に癌間質相互作用における意義の検討を進めた。癌間質において CD90 と SMA の共発現と予後との関連性を検証し、学会にて報告した。CD73 に関して、免疫染色では間質細胞に発現を認めないものの、RT-PCR およびフローサイトメトリーでは間質細胞に強く発現を認めた。しかしほとんどの細胞が陽性細胞であったため、残念ながら分取困難であり、今後抑制実験などでの機能確認が必要と考えられる。以上、多数の表面抗原解析を行うことができ、各表面抗原発現の複雑な発現変化がみられた。

次に表面抗原を基にした間質細胞の分取に着手したが、CD105 のみ成功したものの、分取後数日で発現は均一化し機能解析にまでは至らなかった。他に VEGFR1 の分取を試みてはいるが、発現がびまん性であったためか clear な分取には至らなかった。

残念ながらいずれの表面抗原においても解析のみにとどまり、純化するまでには至らなかった。今後本研究結果をふまえ、細胞の分取を進め、発現状況によってはレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入による強制発現あるいはノックダウン操作を行っていく。しかし、癌組織 desmoplasia における間質細胞内小細胞集団分画の検証において、一定の成果を上げられたものと考えている。

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 7 件)

すべて査読有

1. 大内田 研宙, 大塚 隆生, 水元 一博, 田中 雅夫【膵癌診療と研究の最先端】膵癌における癌間質相互作用 胆と膵 (0388-9408)32 巻 9 号 807-810 2011.

2. Fujiwara K, Ohuchida K, Mizumoto K, Shindo K, Eguchi D, Kozono S, Ikenaga N, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. CD271⁺ subpopulation of pancreatic stellate cells correlates with prognosis of pancreatic cancer and is regulated by interaction with cancer cells. PLoS One. 7(12):e52682. 2012.

3. 池永 直樹 CD10+pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer CD10 陽性膵星細胞は膵癌の進展を促進する 福岡県医報 (0285-3418)1432 号 48-49 2012

4. 池永 直樹, 大内田 研宙, 小蘭 真吾, 水元 一博, 田中 雅夫【肝胆膵の線維化; 研究と診療の最近の進歩】胆道膵臓の線維化 研究の進歩 膵臓の間質と星細胞 肝・胆・膵(0389-4991)65 巻 2 号 351-357 2012

5. 大内田 研宙, 大塚 隆生, 水元 一博, 田中 雅夫【胆道癌、膵癌に対する個別化治療の新展開】腫瘍内 heterogeneity に着目した膵癌個別化治療の可能性 腫瘍個別化から細胞個別化へ 胆と膵 (0388-9408)34 巻 2 号 165-169 2013

6. 大内田 研宙 CD10 陽性癌関連星細胞の膵癌細胞誘導機序の解明とその制御 上原記念生命科学財団研究報告集 27 巻 Page1-5 2013

7. 佐田 政史, 水元 一博, 大内田 研宙, 大塚 隆生, 田中 雅夫 胆膵 膵臓 膵癌の個別化治療を探る Annual Review 消化器 2014 巻 Page252-257 2014

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 池永 直樹, 大内田 研宙, 水元 一博, 崔 林, 小蘭 真吾, 藤田 逸人, 大塚 隆生, 田中 雅夫 CD10 陽性膵星細胞は膵癌の進展を促進する 第 111 回日本外科学会 定期学術集会 (紙上開催) 2011/5/26-28 東京都 (紙上開催)

2. Ohuchida K, et al. The Functional Heterogeneity of Pancreatic Cancer Cells and Surrounding Stromal Cells in Cancer-Stromal Interactions The 4th International Conference for Treatment of Pancreatic Cancer 2011/6/25 Taipei (Taiwan)

3. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K,

- Fujiwara K, Kozono S, Ohtsuka T, Nakamura M, Tanaka M. CD10 positive pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer. 42nd Annual Meeting of the American Pancreatic Association 2011年11月2日~5日 Chicago, USA
4. Fujiwara K, Ohuchida K, Shindo K, Kozono S, Ikenaga N, Cui L, Aishima S, Nakamura M, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M. The CD271 positive rate of pancreatic stellate cells is correlated with their migration activities enhanced by co-cultured pancreatic cancer cells The 3rd Biennial Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association Congress 2011 September 27-30, 2011 Melbourne, Australia
5. 藤原謙次, 大内田研宙, 進藤幸治, 赤川進, 江口大樹, 小園真吾, 池永直樹, 崔林, 相島慎一, 大塚隆生, 高畑俊一, 水元一博, 小田義直, 田中雅夫 膵癌における CD271 陽性膵星細胞の意義 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012/04/13 千葉
6. 進藤幸治, 相島慎一, 池永直樹, 大内田研宙, 水元一博, 田中雅夫, 小田義直 Fibroblasts expressing Podoplanin enhance the tumor progression of invasive ductal carcinoma of pancreas 第 71 回日本癌学会 2012/9/21 札幌
7. Fujiwara K, Ohuchida K, Mizumoto K, Shindo K, Eguchi D, Kozono S, Ikenaga N, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Tanaka M CD271+ pancreatic stellate cells are correlated with prognosis of patients with pancreatic cancer and regulated by interaction with cancer cells International Symposium on Pancreas Cancer 2012 in Kyoto 2012/10/6 京都
8. Shindo K, Aishima S, Ikenaga N, Ouchida K, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y. Fibroblasts expressing Podoplanin enhance the tumor progression of invasive ductal carcinoma of pancreas 2012 Joint Meeting of American Pancreatic Association and International Association of Pancreatology 2012/11/01 Miami, USA
9. 佐田政史, 大内田研宙, 藤原謙次, 赤川進, 江口大樹, 小園真吾, 趙茗, 崔林, 大塚隆生, 水元一博, 田中雅夫 膵癌間質における CD90 と α -SMA 発現の意義 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-4/13、福岡
10. 趙茗, 大内田研宙, 鄭彪, 崔林, 小園真吾, 江口大樹, 水元一博, 田中雅夫 The investigation of CD146 in pancreatic cancer associated fibroblast 第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013/4/11-4/13、福岡
11. Sada. M, etc. Clinical Significance of Stromal CD90 and alpha-SMA Expression in Pancreatic Cancer Ammerican Pancreatic Association, 44th Annual Meeting 2013/10/30-11/2Miami, USA
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔その他〕
該当なし
6. 研究組織
- (1)研究代表者
白羽根 健吾 (SHIRAHANA KENGO)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10529803
- (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
(2011~2012年)
大塚 隆生(OHTSUKA TAKAO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20372766
- (3)連携研究者
なし