

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23791542
研究課題名（和文）癌間質制御の新しいアプローチ - 癌間質細胞のセネセンスと間葉系幹細胞誘導の関わり -
研究課題名（英文）New stromal management to focus on senescence and induction of pancreatic mesenchymal stem cells.
研究代表者
宮坂 義浩（MIYASAKA YOSHIHIRO）
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：40507795

## 研究成果の概要（和文）：

膵癌組織ではセネセンスに陥っている細胞は少数であり、間葉系幹細胞との相互作用によってセネセンスが抑制されている可能性がある。本研究では、膵癌の前駆病変とも考えられる IPMN ではセネセンスマーカーの高発現を認めるも癌では認められないことから、癌へと進展するにつれセネセンスマーカーの発現が低下することが示唆された。新しい癌間質相互作用の制御として、既存の薬剤であるゾメタとピルフェニドンが Gemcitabin との併用で膵癌の進展を抑制することが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

In pancreatic cancer tissue, few stromal cells expressed senescence markers. Senescence in stromal cells might be inhibited due to interaction between mesenchymal stem cells and normal stromal cells. The cells of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas (IPMN) expressed senescence markers, which implied that senescence markers expression decrease along pancreatic cancer progression. For management of cancer-stromal interaction, we found two candidates, Pirfenidone and Zoledronic acid, will be some role. These drugs inhibited pancreatic cancer progression, in particular, combined with Gemcitabine

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

## 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、セネセンス、間葉系幹細胞、デスマプレジア、癌間質相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は我が国における癌死の5位を占め、現在でも100人中3人しか根治しない疾患であり、その治療法・診断法の開発は、社会的要請度・緊急性が高い。膵癌は豊富な細胞外基質を伴う過剰な desmoplasia を病理組織学的な特徴とする。一方、セネセンス(senescence)とは、元々正常な細胞がある程度の細胞分裂後に至る非可逆的な分裂停止と定義されるが、DNA 傷害・酸化ストレスなどによる組織障害や癌遺伝子活性化などの様々なストレスでも惹起される。放射線治療や化学療法で

は局所に組織障害が生じてセネセンスを誘導するが、他方で局所臓器障害は骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)をも誘導する。いずれも局所組織障害時の反応として注目されているが、これら二つの事象の関わりを検討した報告はない。またこれまでの国内外の研究は特定の間質細胞と癌細胞との相互作用にのみ着目しており、本研究構想のようにセネセンス誘導膵星細胞による間葉系幹細胞(MSC)の誘導やその他の間質細胞との相互作用を介した desmoplasia 形成・癌の進展に焦点を当てた研究は例を見ない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、①膵星細胞においてセネセンスを誘導する特異的な因子を解明し、網羅的発現解析によりセネセンス誘導間質細胞の新たなマーカーとなる表面抗原を同定すること、②desmoplasiaを誘導する間葉系幹細胞(MSC)を prospective に同定すること、③セネセンス誘導間質細胞と MSC の相互作用と desmoplasia 形成の関連を解明し、上皮間葉移行(EMT:Epithelial mesenchymal transition)や浸潤に焦点をあて、セネセンス誘導膵星細胞と MSC、癌細胞の三者間相互作用を含めた生物学的特徴を明らかにすること、④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、セネセンス誘導間質細胞あるいは MSC の関与を明らかにし、膵癌根治を目指してセネセンス誘導星細胞/MSC-癌相互作用を標的とした間質制御療法を開発することである

## 3. 研究の方法

### (1)膵星細胞のセネセンス誘導と新規特異的表面抗原の同定

現在、セネセンス誘導細胞の分取に必要な特異的表面抗原は同定されておらず、網羅的発現解析によりセネセンス特異的な新規表面抗原や特異的遺伝子発現を確認する。また、将来の癌治療を見据え、Gemcitabine や Pirfenidone、Zoledronic acid など他の薬剤によるセネセンス誘導についても評価する。

### (2)間葉系幹細胞純化と新規間葉系幹細胞特異的表面抗原の同定

間葉系幹細胞マーカーとして期待される CD10、CD271、CD105 陽性分画などに関して解析をすすめる。(1)で同定したセネセンス誘導星細胞に特異的と考えられる表面抗原も解析の対象とする。具体的には、手術組織から樹立した膵星細胞あるいは手術切除標本そのものからセルソーターで純化する。以前より、発現の異なる星細胞をマイクロアレイ解析しており、その結果それぞれに特異的な分子を同定してきた。これらの解析結果から新たな間葉系幹細胞の表面マーカーと成り得るものを同定する。

### (3)セネセンス誘導間質細胞-間葉系幹細胞相互作用と desmoplasia・EMT・治療抵抗性の関連の解明

膵癌において desmoplasia は特筆すべき病理組織学的特徴であり、膵癌の浸潤・転移・予後に強く影響する。また、EMT に基づく転移や浸潤は固形癌に特異的であり、特に膵癌では予後を決定している。具体的には、セネセンス誘導膵星細胞や、上記のセネセンス・間葉系幹細胞表面マーカーを用い初代培養膵星細胞・切除組織から純化した細胞群を用いる。in vitro、in vivo で間質増生や基質・増

殖因子合成能、さらに固形癌特有である浸潤・転移能や EMT へ間葉系幹細胞が与える影響を検討し、またこれらの能力に関連する分子発現を検討する。直接共培養状態やマウス共移植モデルで形成した腫瘍・転移腫瘍から癌細胞や間葉系幹細胞を分取し、遺伝子・蛋白発現の解析も行う。

### (4) 間葉系幹細胞を標的とした治療および癌細胞ニッチ相互作用を標的とした治療法の開発

骨転移での有効性が報告されている Zoledronic acid や、肺線維症で線維化の制御を目的として使用されている Pirfenidone による治療実験を in vitro、in vivo の両面で行う。すでに実臨床で用いられている薬剤による間葉系幹細胞を標的とした治療が可能か検討する。

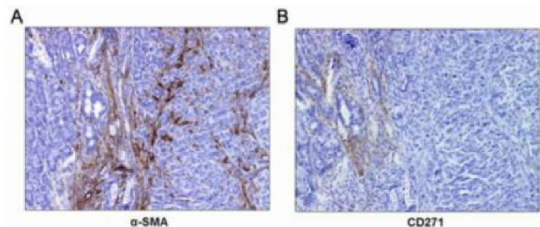
## 4. 研究成果

### (1)膵星細胞のセネセンス誘導と新規特異的表面抗原の同定

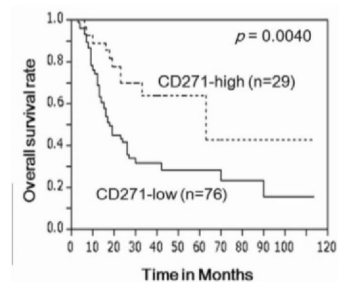
膵星細胞のセネセンスにより誘導される膵癌の desmoplasia という点に焦点を当てて、膵癌で新規のセネセンスマーカーを検索したが、候補となりうるものは認めなかった。しかし、膵癌の前駆病変ともいえる IPMN ではセネセンス関連βガラクトシダーゼやヘテロクロマチンが高発現しており、報告を行った(Human pathology, 2011)。また、P16<sup>INK4A</sup> や p15<sup>INK1B</sup> といったセネセンスマーカーは正常膵組織で発現が見られなかったが、IPMN では間質組織との境界で発現が見られることを見出した。

### (2)間葉系幹細胞純化と新規間葉系幹細胞特異的表面抗原の同定

当研究室で CD10 陽性膵星細胞が膵癌の進行を特異的に促進することを報告したが、その機序はセネセンスではなく MMP3 の分泌を介するものであった。CD10 と同じように間葉系幹細胞の表面抗原として報告されている CD271 に注目しセネセンスとの関連、癌との



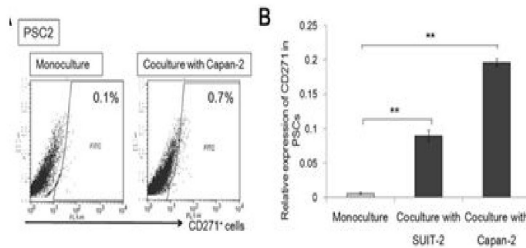
相互作用を検討した結果、膵癌細胞の増殖の活発な腫瘍中心部に CD271 陽性膵星細胞は



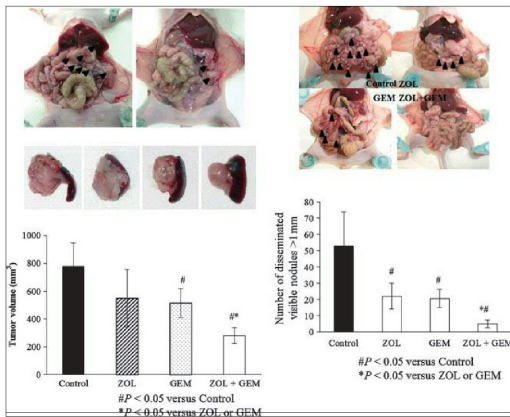


なく、離れた位置に存在することがわかった(上図)。さらに CD271 陽性群の膵癌患者のほうが予後がよいことがわかり(右図)、膵癌の進行を抑える働きをもつ膵星細胞集団の存在の可能性が示唆された。セネセンスとの関連は不明であったが、膵星細胞が癌の進行において、一方的に促進因子として働くばかりではなく、癌を抑制する方向にも機能している可能性があると考えられ報告した(PLoS One, 2012)。

(3)セネセンス誘導間質細胞-間葉系幹細胞相互作用と desmoplasia・EMT・治療抵抗性の関連の解明



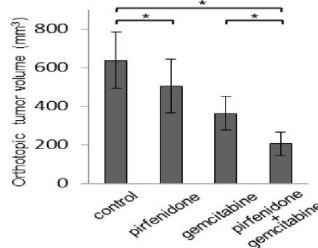
膵癌組織から樹立した膵星細胞を用い、癌細胞との相互作用を検討した。その結果、膵星細胞単独で存在するより、癌細胞と共培養や癌細胞の上清を添加すると先の CD271 陽性膵星細胞の割合が増加した(下図)。(4) 間葉系幹細胞を標的とした治療法および癌細胞ニッチ相互作用を標的とした治療法の開発



間葉系幹細胞や癌細胞ニッチ相互作用を標的とした治療を目的として、特発性肺線維症に用いられるピルフェニドン、骨転移治療薬であるゾメタの2剤に注目した。それぞれすでに実臨床で用いられている薬剤ではあるものの膵癌への効果は明らかではなかったが、本研究では劇的な効果を認め、報告した(Cancer Sci, 2012)(Cancer Res. 2013)。ゾメタは MMP2、MMP9 の癌細胞からの分泌を抑制することで浸潤能が低下し、とくに従来から用いられている Gemcitabine とゾメタの併用で膵癌の縮小効果が in vivo において認められた(上図)。またピルフェニドンは、periostin、TGF- $\beta$ 、PDGF-A,B などの癌間



質相互作用にかかわる液性因子の分泌を抑制することで腫瘍縮小効果を認めると考えられ、こちらも特に Gemcitabine との併用でより強い効果を認めた(左図)。



### 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 6 件) すべて査読あり

1. Miyasaka Y, Nagai E, Ohuchida K, Fujita H, Nakata K, Hayashi A, Mizumoto K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Senescence in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. Hum Pathol. 2011 Dec;42(12):2010-7

2. Nakata K, Ohuchida K, Aishima S, Sadakari Y, Kayashima T, Miyasaka Y, Nagai E, Mizumoto K, Tanaka M, Tsuneyoshi M, Oda Y. Invasive carcinoma derived from intestinal-type intraductal papillary mucinous neoplasm is associated with minimal invasion, colloid carcinoma, and less invasive behavior, leading to a better prognosis. Pancreas. 2011 May;40(4):581-7.

3. Yamao K, Yanagisawa A, Takahashi K, Kimura W, Doi R, Fukushima N, Ohike N, Shimizu M, Hatori T, Nobukawa B, Hifumi M, Kobayashi Y, Tobita K, Tanno S, Sugiyama M, Miyasaka Y, Nakagohri T, Yamaguchi T, Hanada K, Abe H, Tada M, Fujita N, Tanaka M. Clinicopathological features and prognosis of mucinous cystic neoplasm with ovarian-type stroma: a multi-institutional study of the Japan pancreas society. Pancreas. 2011 Jan;40(1):67-71.

4. Zhao M, Tominaga, Ohuchida K, Mizumoto K, Cui L, Kozono S, Fujita H, Maeyama R, Toma H, Tanaka M. Significance of combination therapy of zoledronic acid and gemcitabine on pancreatic cancer. Cancer Sci. 2012 Jan;103(1):58-66

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

6. Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, Ikenaga N, Fujiwara K, Cui L, Mizumoto K, Tanaka M. Pirfenidone Inhibits Pancreatic Cancer Desmoplasia by Regulating Stellate Cells. Cancer Res. 2013 Jan 24. In press

[学会発表] (計 5 件)

1. 藤原謙次, 大内田研宙, 進藤幸治, 赤川進, 江口大樹, 小菌真吾, 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

2. Kenji Fujiwara, Kenoki Ohuchida, Koji Shindo, Shingo Kozono, Naoki Ikenaga, Lin Cui, Shinichi Aishima, Masafumi Nakamura, Kazuhiro Mizumoto, Yoshinao Oda, Masao Tanaka, CD271<sup>+</sup> 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

3. Shingo Kozono, Kenoki Ohuchida, Daiki Eguchi, Kenji Fujiwara, Ming Zhao, Lin Cui, Kazuhiro Mizumoto and Masao Tanaka, Antifibrotic Agent, Pirfenidone, Inhibits Pancreatic Stellate Cells and Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic cancer 2012 Joint Meeting of American Pancreatic Association and International Association of Pancreatology 2012/11/01 Miami, USA

4. 小菌真吾, 大内田研宙, 水元一博, 田中雅夫, Pirfenidone による膵星細胞を標的とした新しい膵癌治療の可能性, 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012/04/13, 千葉

5. 小菌真吾, 大内田研宙, 水元一博, 大塚隆生, 赤川進, Ana Ines Cases, 江口大樹, 藤原謙次, 趙茗, 崔林, 池永直樹, 田中雅夫, Pirfenidone による膵星細胞を標的とした新しい膵癌治療の可能性, 第 43 回日本膵臓学会大会, 2012/06/29, 山形

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮坂 義浩 (MIYASAKA YOSHIHIRO)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号: 40507795

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし

研究者番号: