

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390319

研究課題名(和文) 膵癌の desmoplasia 形成責任間質細胞の同定とその起源解明及びその機能制御

研究課題名(英文) Identification of the key stromal cell responsible for desmoplasia of pancreatic cancer, elucidation of the origin of it, and regulation of its function

研究代表者

水元 一博 (MIZUMOTO, Kazuhiro)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：90253418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000 円

研究成果の概要(和文)：(1) 膵癌切除組織における免疫組織化学染色で膵癌周囲の間質にperivascular cellのマーカーであるNG2、PDGFR が発現している。(2) NG2/PDGFR 陽性の癌関連線維芽細胞は膵癌細胞の遊走・浸潤能を増強する。(3) 膵癌組織における免疫組織化学染色で、CD51は膵癌間質に広範囲に高発現している。(4) 活性化膵星細胞において、CD51の発現を抑制すると細胞外基質であるコラーゲン やフィブロネクチンの産生が低下する。(5) マウスの皮下移植モデル実験では膵癌細胞株と膵星細胞とを皮下共移植すると膵星細胞におけるCD51ノックダウン群は対照群と比較して腫瘍径が減少する。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed the following. (1) Perivascular markers, NG2 and/or PDGFR, are expressed in the stroma of pancreatic tumor. (2) NG2/PDGFR -positive cancer-associated fibroblasts increase the migratory and invasive abilities of pancreatic cancer cells. (3) CD51 is widely expressed in the stroma of pancreatic tumor. (4) Knockdown of CD51 in activated pancreatic stellate cells decreases the production of extracellular matrix, such as collagen and fibronectin. (5) Knockdown of CD51 suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 desmoplasia 膵星細胞

1. 研究開始当初の背景

膵癌は癌死の 5 位を占めながら現在でも 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。従来の膵癌研究は腫瘍細胞自体を中心として進められてきたが、革新的な治療法の実現には至っておらず、他の消化器癌の抗癌剤治療の進歩と比較し取り残された癌腫となっている。近年、癌細胞が様々な治療に抵抗性を示す一因として癌間質相互作用が注目を集めており、腫瘍細胞の周囲に存在する様々な間質細胞や、その間質細胞により産生される細胞外基質が癌細胞研究における重要な研究対象となっている。特に、膵癌は desmoplasia と呼ばれる著明な線維組織の増生が病理学的な特徴であり、著明な線維化は乏血性組織を形成することにより膵癌組織中を低酸素環境へと導いている。間質基質との癌間質相互作用や癌細胞がおかれた低酸素環境が膵癌細胞の悪性度を高めていることや、desmoplasia の主成分であるコラーゲン、フィブロネクチンが腫瘍栄養血管と膵癌細胞の間隙を増大させ膵癌細胞への薬剤到達効率を低下させることで膵癌の治療抵抗性を高めることなどが報告されている (Science, 2009, K Olive)。このように、desmoplasia を中心とした膵癌の生物学的悪性度の理解は進みつつあるが、実際の desmoplasia を誘導する間質細胞の起源に関してはまだコンセンサスは得られていない。現在のところ、肝線維化に關与する肝星細胞と似た性質を示す膵星細胞 (Pancreatic Stellate Cells; PSCs) が膵臓組織中に存在し、慢性膵炎における膵線維化の中心を担っていること (Gastroenterology, 1989, Bachem) や、膵癌組織でも腫瘍細胞の刺激により活性化された膵星細胞 (activated PSCs) が間質増生を促し desmoplasia 形成の主役を担うことが報告されている (Gastroenterology, 2005, Bachem)。一方で近年、胃癌発生マウスの骨髄移植モデルでは、癌組織中における癌関連線維芽細胞の約 20% が骨髄由来であり、骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) がその供給源であることが報告された (Cell, 2011, M Quante)。また、皮膚由来の線維芽細胞より多能性幹細胞の性質をもつ細胞集団が分取され、骨髄中に存在する間葉系幹細胞と同様の性質を示すことが報告されている (PNAS, 2010, Y Kuroda)。このように、癌組織中における癌関連線維芽細胞 (Carcinoma-associated fibroblasts, CAFs) が骨髄由来であることを示唆する報告はあるものの、現在のところ、膵癌における癌関連線維芽細胞の供給源が膵星細胞由来なのか、骨髄由来間葉系幹細胞由来なのかは今のところ明らかでない。

2. 研究の目的

膵癌の治療抵抗性の一因 desmoplasia を形成する責任細胞の起源と分化誘導の機序

を明らかとし、膵癌における desmoplasia 増生の責任細胞およびその分化誘導を治療標的とした画期的な膵癌治療戦略を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 間質細胞集団における間葉系幹細胞マーカーの発現解析：

膵癌切除組織から初代培養にて樹立した間質細胞における NG2/PDGFR の発現をリアルタイム RT-PCR および免疫組織化学染色にて検討する

(2) 間葉系幹細胞と癌細胞との相互作用：

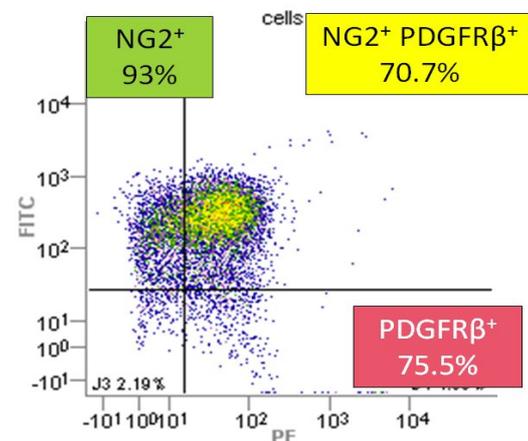
樹立した間質細胞集団からの間葉系幹細胞マーカーを発現する細胞をセルソーティングにより分取し、膵癌細胞株との共培養により、癌細胞の遊走・浸潤に与える影響を評価する

(3) 細胞外基質産生能に着目した desmoplasia 形成責任細胞の同定：

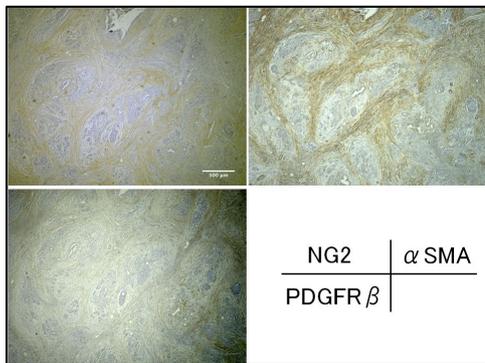
膵癌組織および膵星細胞における CD51 の発現を検討し、CD51 の抑制が細胞外基質に与える影響を RNA 干渉の手法で解明する。

4. 研究成果

(1) 膵癌組織から癌関連線維芽細胞としてすでに樹立していた初代培養細胞を使用して、各細胞集団における特定の遺伝子・タンパク発現の有無を検討した。具体的には、間葉系幹細胞を起源とする可能性が示唆されている perivascular cell の表面マーカーとして使用されている NG2 と PDGFR の mRNA およびタンパクの発現をリアルタイム qRT-PCR およびフローサイトメトリーにより解析した。その結果、癌関連線維芽細胞の集団の中には一定の割合で NG2 および/または PDGFR を発現するものが含まれていることが判明した (下図)。

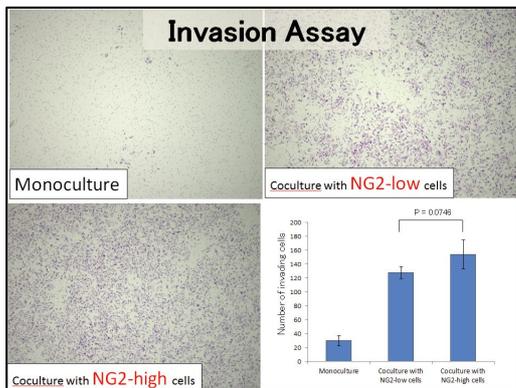


また、膵癌切除組織における免疫組織化学染色では、主に膵癌周囲の間質に NG2、PDGFR が発現する傾向を認めた (次頁)。これらの



結果は、膵癌の desmoplasia 形成の責任細胞として、NG2 / PDGFR 陽性細胞がその1つである可能性を示唆し、それらの細胞群には血管周囲に存在するとされる間葉系幹細胞が含まれる可能性がある。

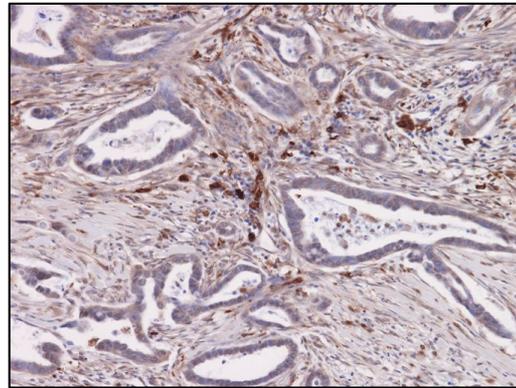
(2) 癌関連線維芽細胞を磁気ビーズ標識による手法を用いて NG2 陽性・陰性群、また、PDGFR 陽性・陰性群に分離し、それらの細胞群を膵癌細胞株である SUI2 細胞と共培養を行うことによる SUI2 細胞の遊走能・浸潤能に与える影響を検討した。その結果、NG2、PDGFR ともに陽性群との共培養により SUI2 細胞の遊走能および浸潤能は増強する傾向にあった(下図)。



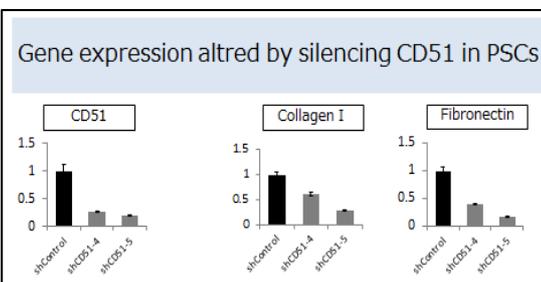
このことは、NG2/PDGFR 陽性細胞と膵癌細胞とにおける相互作用を示すものであり、NG2/PDGFR 陽性細胞が desmoplasia 形成における責任細胞の1つである可能性が示唆された。

(3) 細胞外基質産生に關与する因子として、CD51 タンパクに着目し研究を遂行した。CD51 はインテグリン V としても知られ、フィブロネクチン、ラミニン、MMP-2 など様々な細胞外基質の受容体として働き、細胞接着や細胞遊走等に関与する。最近、マウス肝線維化モデルにおいて、肝星細胞における CD51 発現が肝線維化に重要であることが明らかになった。そこで我々は、肝星細胞における CD51 が膵癌 desmoplasia 形成において果たす役割について検討することにした。ヒト膵癌組織における免疫組織化学染色では、CD51 は膵癌間質に広範囲に高発現していた(右上図)。また、活性化肝星細胞において、

mRNA およびタンパクレベルでの CD51 の発現を確認した。さらに、肝星細胞における CD51



の発現を抑制すると、細胞外基質であるコラーゲンやフィブロネクチンの産生が低下した(下図)。



また、マウスの皮下移植モデル実験では、膵癌細胞株と肝星細胞とを皮下共移植すると、肝星細胞における CD51 ノックダウン群は対照群と比較して腫瘍径が減少した。

この結果は、CD51 陽性肝星細胞が、膵癌間質において desmoplasia 形成の責任細胞の1つである可能性を示唆するものであり、新たな膵癌治療法開発へとつながりうる非常に重要なデータである。

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 3 件)

すべて査読あり

Akagawa S, Ohuchida K, Torata N, Hattori M, Eguchi D, Fujiwara K, Kozono S, Cui L, Ikenaga N, Ohtsuka T, Aishima S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M, Peritoneal myofibroblasts at metastatic foci promote dissemination of pancreatic cancer, *Int J Oncol*, 45(1):113-120, 2014, DOI: 10.3892/ijo.2014.2391

Fujiwara K, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Shindo K, Ikenaga N, Cui L, Takahata S, Aishima S, Tanaka M, Migratory Activity of CD105+ Pancreatic Cancer Cells Is Strongly Enhanced by Pancreatic Stellate Cells, *Pancreas*,

42(8):1283-1290, 2013 ,
DOI: 10.1097/MPA.0b013e318293e7bd

Shindo K, Aishima S, Ohuchida K, Fujiwara K, Fujino M, Mizuuchi Y, Hattori M, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y, Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive ductal carcinoma of the pancreas, *Mol Cancer*, 12(1):168, 2013, DOI: 10.1186/1476-4598-12-168

〔学会発表〕(計 15 件)

鄭彪、大内田研宙、崔林、水内祐介、藤原謙次、赤川進、堀岡宏平、田中友晴、佐田政史、仲田興平、前山良、大塚隆生、小田義直、水元一博、田中雅夫，膵癌関連繊維芽細胞における CD146 発現と膵がんの進展抑制，第 45 回日本膵臓学会大会，2014/7/11-12，福岡県・北九州市

藤原謙次、大内田研宙、赤川進、大塚隆生、高畑俊一、水元一博、田中雅夫，膵癌細胞からの作用により膵星細胞中の NPAS1 が増加する，第 45 回日本膵臓学会大会，2014/7/11-12，福岡県・北九州市

赤川進、大内田研宙、大塚隆生、寅田信博、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、水元一博、田中雅夫，膵癌の肝転移・腹膜播種巣における癌関連繊維芽細胞の機能解析，第 114 回日本外科学会定期学術集会，2014/4/3-5，京都市

佐田政史、大内田研宙、堀岡宏平、田中友晴、鄭彪、Cases AI、赤川進、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、大塚隆生、高畑俊一、水元一博、田中雅夫，膵癌間質の線維配列が癌細胞の形態と浸潤方向に与える影響，第 114 回日本外科学会定期学術集会，2014/4/3-5，京都市

田中友晴、大内田研宙、水元一博、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、佐田政史、堀岡宏平、鄭彪、赤川進、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、大塚隆生、田中雅夫，トラニラストによる膵星細胞の抑制についての検討，第 114 回日本外科学会定期学術集会，2014/4/3-5，京都市

Fujiwara K, Ohuchida K, Sada M, Akagawa S, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Tanaka M, Pancreatic Cancer Cells Induces Up-regulation of NPAS1 in Pancreatic Stellate Cells, *Joint*

Meeting of the International Association of Pancreatology & the Korean Pancreatobiliary Association 2013, 2013/9/4-7, Seoul (Korea)

Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M, Regulation of Pancreatic Stellate cells for Treatment of Pancreatic cancer, The 6th International Conference and Commemorative Lecture of Pin-Wen Lin of Pancreatic Cancer, 2013/6/15, Tainan (Taiwan)

佐田政史、大内田研宙、藤原謙次、赤川進、江口大樹、小藺真吾、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，2013/4/11-13，福岡県・福岡市

赤川進、大内田研宙、大塚隆生、寅田信博、江口大樹、藤原謙次、小藺真吾、崔林、池永直樹、水元一博、田中雅夫，腹膜繊維芽細胞の作用に着目した膵癌腹膜播種メカニズムの解明，第 113 回日本外科学会定期学術集会，2013/4/11-13，福岡県・福岡市

Shindo K, Aishima S, Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y, Fibroblasts Expression podoplanin Enhance the Tumor Progression of Invasive Ductal Carcinoma of Pancreas, *American Pancreatic Association/International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting*, 2012/10/30-11/2, Miami (United States of America)

Akagawa S, Ohuchida K, Otsuka T, Eguchi D, Fujiwara K, Kozono S, Cui L, Ikenaga N, Aishima S, Mizumoto K, Tanaka M, Role of Peritoneal Fibroblasts at Disseminated Sites of Pancreatic Cancer, *American Pancreatic Association/International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting*, 2012/10/30-11/2, Miami (United States of America)

Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, Fujiwara K, Zhao M, Cui L, Mizumoto K, Tanaka M, Antifibrotic Agent, Pirfenidone, Inhibits Pancreatic Stellate Cells and Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer, *American Pancreatic Association/International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting*, 2012/10/30-11/2,

Miami(United States of America)
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 , Pancreas Cancer 2012 in Kyoto ,
2012/10/4-6 , Kyoto(Japan)

藤原謙次、大内田研宙、江口大樹、小藺
真吾、池永直樹、高畑俊一、水元一博、
田中雅夫 , CD105 陽性膵癌細胞は膵星細
胞から影響を受けて強い遊走能を獲得す
る , 第 43 回日本膵臓学会大会 ,
2012/6/28-29 , 山形県・山形市

小藺真吾、大内田研宙、水元一博、大塚
隆生、赤川進、江口大樹、藤原謙次、Ana
Ines Cases、趙茗、崔林、池永直樹、田
中雅夫 , Prifenidone による膵星細胞お
よびその癌間質相互作用を標的とした膵
癌治療の可能性 , 第 43 回日本膵臓学会
大会 , 2012/6/28-29 , 山形県・山形市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

水元 一博(MIZUMOTO Kazuhiro)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：90253418

(2)研究分担者

大塚 隆生(OHTSUKA Takao)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20372766

江上 拓哉(EGAMI Takuya)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：40507787

永井 英司(NAGAI Eishi)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：30264021
(2012年)

富永 洋平(TOMINAGA Yohei)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：90304823
(2012年)

大内田 研宙(OHUCHIDA Kenoki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20452708
(2012年)

白羽根 健吾(SHIRAHANE Kengo)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10529803
(2012年)

(3)連携研究者

なし