

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791432

研究課題名(和文) 膵癌微小環境に着目したウイルス治療の新展開 - 間質におけるウイルス拡散と導入効率 -

研究課題名(英文) Novel development in viral therapy targeting pancreatic cancer microenvironment &#8211; viral spread and transduction efficiency in pancreatic stroma

研究代表者

安井 隆晴 (YASUI, TAKAHARU)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：60611283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で得られた成果は以下のとおりである。(1)低酸素環境下の膵星細胞が膵癌細胞の浸潤能を増強する。(2)低酸素環境下における膵癌細胞の浸潤能は膵星細胞から分泌されるconnective tissue growth factor(CTGF)によって促進される。(3)膵癌間質におけるCD90の低発現は膵癌切除患者の予後良好因子である。(4)CD146の発現を抑制した膵星細胞と膵癌細胞との共培養によって、膵癌細胞の遊走能・浸潤能が増強する。

研究成果の概要(英文)：The achievements in the present study are as follows. (1) Pancreatic stellate cells cultured in hypoxic condition promote invasive ability of pancreatic cancer cells. (2) The invasive ability of pancreatic cancer cells in hypoxic condition is promoted by connective tissue growth factor (CTGF) secreted by pancreatic stellate cells. (3) Lower expression of CD90 is associated with good prognosis in surgically resected pancreatic cancer patients. (4) The migratory and invasive ability of pancreatic cancer cells are increased when co-cultured with CD146 knockdown pancreatic stellate cells.

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：hypoxia stellate cells

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は極めて予後不良な疾患であり、5年生存率は10%前後しかない。その原因は、膵癌が早期に局所進展や遠隔転移を起こすことから手術可能症例に限られることや化学・放射線療法へ抵抗性を示すことがあげられ、そのためこれまでの治療法に加え新たな治療戦略を開発することは社会的急務である。近年、治療用ウイルスのさらなる改良が進み(J Virol, 2008, Ylosmaki)、免疫学的な問題も克服され(Nature, 2006, Robert)、有望な治療手段として再度注目されてきている。膵癌に対するウイルス治療の効果を高める手段を模索していく過程において、従来の治療法である抗癌剤や放射線との併用におけるウイルス関連治療の飛躍的な増強効果が認められた(Br J Cancer, 2007, Liu ; Mol Ther, 2008, Wack)。この増強効果は単なる相加作用では無く、我々の報告を含む最新の知見によると、特に従来の治療法が劇的にウイルス関連治療の効率を増強していることが明らかになっている(Clin Can Res, 2008 Egami, 右図)。さらに癌周囲の微小環境を伴う癌間質相互作用がウイルス治療効果を低下させることが報告されており、ウイルス治療の適応検討においてその詳細なメカニズム解析が至上命題となっている。固形癌においては癌周囲の癌間質相互作用が腫瘍の進展、遊走、浸潤などに強い影響を与えることは最近認識されており、ウイルス関連治療の作用機序を考慮する際にも、このような微小環境を含めて検討することは重要である。さらに、癌細胞周囲微小環境の制御を含めた他の各種治療法との相互作用機序を検討することにより、ウイルス関連治療の臨床応用を実現するだけでなく、他の様々なドラッグデリバリーによる導入効率の飛躍的な改善にもつながる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、膵癌微小環境の間質がアデノウイルスによる治療効果にどのように影響を与えるか検討し、その詳細なメカニズムを解析する。特に、ウイルス感染、エンドサイトーシスから導入蛋白発現までの各段階で間質がウイルス治療に与える影響に焦点を当て、抗がん剤や放射線による癌周囲微小環境への影響も含めて明らかにする。さらにその責任分子を同定し、更なる遺伝子導入効果増強システムの構築も視野に入れて検討を進める。

### 3. 研究の方法

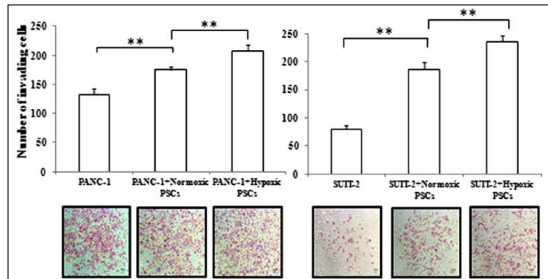
(1)低酸素微小環境においてウイルス治療抵抗性に影響を及ぼすと考えられる癌間質相互作用の解明のため、膵星細胞と膵癌細胞の低酸素環境下における相互作用を検討する。具体的には、低酸素環境における共培養や培養上清添加による増殖や遊走・浸潤に与える影響を検討する。

(2)膵癌微小環境下におけるエンドサイトーシスおよび拡散効率について検討するために、膵癌の間質増生において最重要とされる膵星細胞に関して、その phenotyping を行うことで膵癌へのウイルス導入の障壁となる膵星細胞の垂細胞集団を同定する。具体的には、細胞表面マーカーに注目し、膵癌切除組織における発現解析や膵癌細胞との相互作用を免疫組織化学染色や共培養実験などにより明らかにする。

### 4. 研究成果

(1)低酸素環境下の膵星細胞は膵癌細胞の浸潤能を増強する。

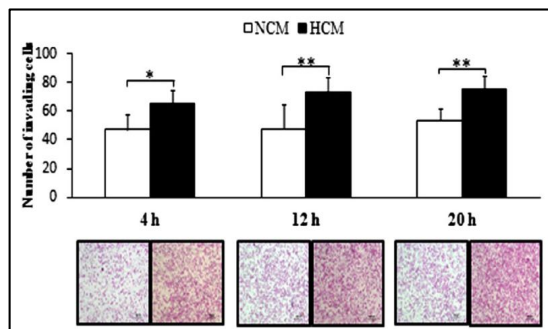
膵星細胞と膵癌細胞 SUIT-2, PANC-1 との間接共培養実験では、低酸素環境下で培



養された膵星細胞は正常酸素環境下のものよりも膵癌細胞の浸潤能を増強することがわかった(図1)。

図1

膵星細胞の培養上清添加実験では、膵癌細胞の浸潤能は、低酸素環境下(2-20時間)におかれた膵星細胞の培養上清を添加することによって増強した(図2)。このことは、



膵星細胞が産生する何らかの可溶性因子が膵癌細胞の浸潤能増強を媒介していることが示唆された。

図2

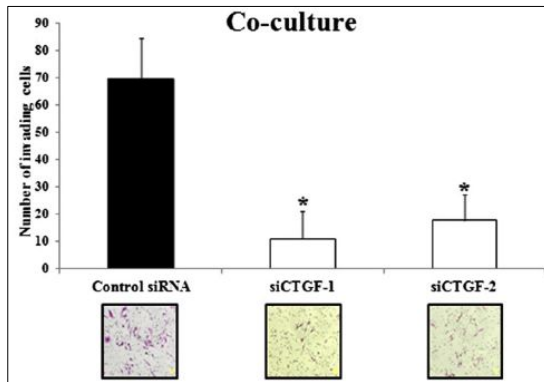
(NCM: 正常酸素下調整培地、HCM: 低酸素下調整培地)

(2)低酸素環境下における膵癌細胞の浸潤能は膵星細胞から分泌される connective tissue growth factor(CTGF)によって促進される。

低酸素培養下と正常酸素培養下における膵星細胞の遺伝子発現の差異を、各種成長因子について検討したところ、CTGFは低酸素環境下で1.5倍以上高発現していた。siRNAを用いて膵星細胞におけるCTGFの発現を抑制す

ると、共培養、上清添加のどちらにおいても、膵癌の浸潤能増強効果が減弱した(図3,4)。

図3. SUI-2 膵癌細胞の浸潤能



(膵星細胞との共培養)

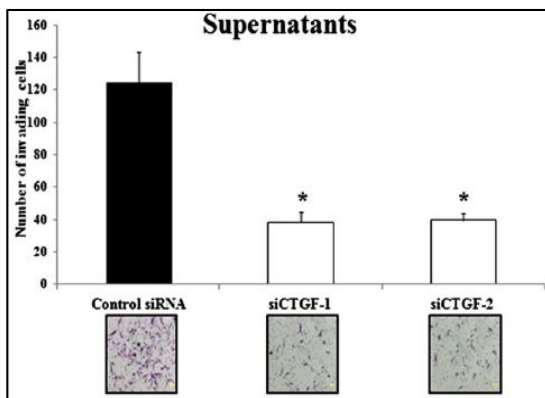
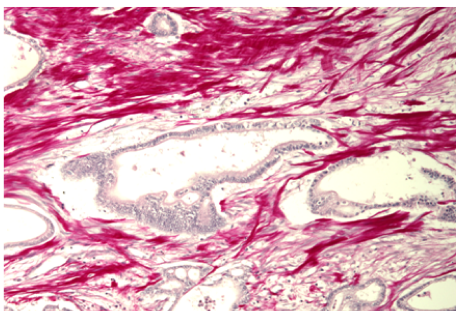


図4. SUI-2 膵癌細胞の浸潤能  
(膵星細胞の培養上清添加)

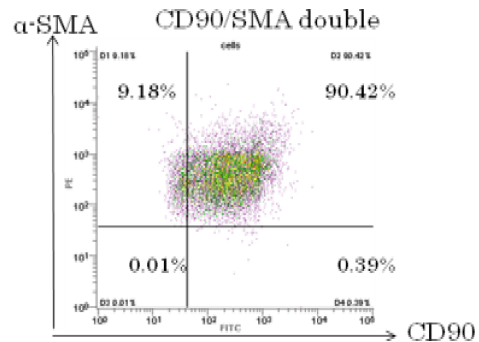
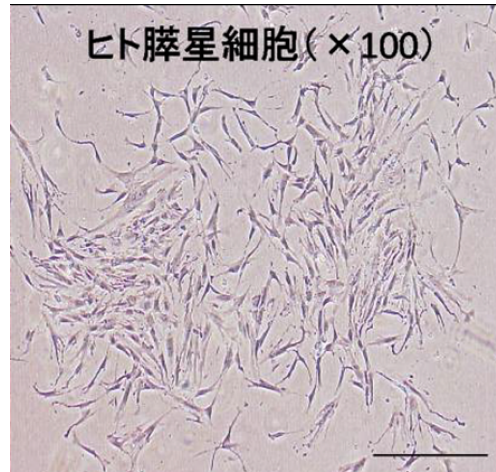
(3) 膵癌間質における CD90 の低発現は膵癌切除患者の予後良好因子である。

膵癌desmoplasia (Sirius red染色)



膵癌切除組織に対して CD90 の免疫組織化学染色を行うと、膵癌間質における CD90 低発現かつ SMA 低発現の群が、その他のものと比べて予後が良好であった。また、SMA 低発現群の中でみても、CD90 低発現の方が CD90 高発現よりも予後がよいことが分かった。このことは膵癌の間質、特に膵星細胞における特定の細胞集団の中に、膵癌細胞の悪性度を減弱する方向に作用するものが存在することを示唆する。(4)CD146 の発現を抑制

した膵星細胞と膵癌細胞との共培養によって、膵癌細胞の遊走能・浸潤能が増強する。細胞表面マーカーCD146は膵切除組織において間質に広く発現しているが、その機能解明のために siRNA を膵星細胞に導入した。この膵星細胞と膵癌細胞を共培養すると、膵癌細胞の遊走・浸潤能が増強した。



## 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3件)

全て査読有

1. Mori Y, Ohtsuka T, Tsutsumi K, Yasui T, Ueda J, Takahata S, Nakamura M, Tanaka M. Different incretin responses after pancreatoduodenectomy and distal pancreatectomy. *Pancreas*. 2012 Apr;41(3):455-60. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182319d7c.
2. Tsutsumi K, Ohtsuka T, Mori Y, Fujino M, Yasui T, Aishima S, Takahata S, Nakamura M, Ito T, Tanaka M. Analysis of lymph node metastasis in pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs) based on the tumor size and hormonal production. *J Gastroenterol*. 2012

Jun;47(6):678-85. doi:

10.1007/s00535-012-0540-0.

3. Yasui T, Takahata S, Kono H, Nagayoshi Y, Mori Y, Tsutsumi K, Sadakari Y, Ohtsuka T, Nakamura M, Tanaka M. Is cholecystectomy necessary after endoscopic treatment of bile duct stones in patients older than 80 years of age? J Gastroenterol. 2012 Jan;47(1):65-70. doi: 10.1007/s00535-011-0461-3.

〔学会発表〕(計0件)

該当なし

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔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

安井 隆晴 (YASUI TAKAHARU)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：60611283

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし