

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462116

研究課題名(和文) 膵癌間質細胞の表現型に基づく治療抵抗性機序解明と抗間質薬内包ナノカプセルの開発

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms about therapeutic resistance due to the difference of pancreatic stellate cell phenotypes and development of nano capsule including anti-stromal drugs

研究代表者

前山 良 (MAEYAMA, Ryo)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：10611668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌微小環境において重要な役割を担う膵星細胞を細胞接着に関わるCD146やCD51に着目し、膵癌切除標本における発現解析を行うと、膵星細胞でのCD146の発現は予後と負の相関を、CD51の発現は正の相関を示した。また、培養実験や動物実験によって、膵星細胞におけるCD146の発現は腫瘍の悪性度に抑制的に作用する一方で、CD51は促進的に作用した。また、抗間質薬としてPirfenidoneやCalpeptineに着目し、これらを用いた治療実験をXenograftモデルで行った。これらの薬剤は、腫瘍内の線維化や膵星細胞の量的な減少を介して、抗腫瘍効果を発揮し、膵癌治療に有用となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed about expression of CD146 and CD51 in pancreatic stellate cells by immunohistochemistry of human pancreatic cancer specimens. Expression of CD146 was negatively related with patients prognosis, whereas expression of CD51 was positively related. In vitro and in vivo experiments showed expression of CD146 in pancreatic stellate cells attenuated aggressiveness of cancer cells, although CD51 enhanced the tumorigenicity. Next we focused on pirfenidone and calpeptine which are known as anti-stromal drugs and their effect of pancreatic cancer tumor growth by Xenograft mouse model. These drugs showed significant reduction of fibrosis in tumor microenvironment via suppression of stellate cells, in addition they enhanced anti-tumoral effect of gemcitabine. These data indicates that targeting specific subgroup of stellate cells by anti-stromal agents could be a promising treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌間質細胞 膵星細胞 抗間質薬

1. 研究開始当初の背景

膵癌は予後不良の疾患であり、ここ数十年で治療成績の改善が得られていない癌種である。その要因の一つとして化学療法へ抵抗性が挙げられる。

膵癌の病理学的特徴は過剰な間質増生 (desmoplasia) で、申請者らはその責任細胞として癌間質ニッチに存在する膵癌浸潤・転移責任間質細胞として膵星細胞を同定し、報告した (Cancer Research, 2004 & Gastroenterology, 2010)。この膵星細胞を標的とした治療法は、腫瘍内線維化の低減や血流増加によって、Gemcitabine 等の抗癌剤の薬剤送達率を改善させ得ることから、有望な新規治療戦略と期待されている。

一方で膵星細胞は多様性を有した細胞集団であり、全ての膵星細胞が癌細胞の悪性度に促進的に作用するわけではない。そこで、全ての膵星細胞を治療標的とするのではなく、癌細胞の悪性度を増強する細胞群を同定しそれらに対してより選択的に治療を行うことが重要と考えられる。そこで、申請者らはこれまで行ってきた膵星細胞の表面抗原に着目した phenotype に基づく機能解析を更に進め、悪性化責任細胞を同定することを計画した。

また、上記研究によって同定した標的細胞への薬剤の送達には選択的ドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いることを計画した。古細菌 *Methanococcus jannaschii* 由来の Mj285 が形成する球状構造体は、細胞への侵入を実現し、高い細胞特異性と薬剤送達能力を有していることが知られている。このような間質細胞を標的とした DDS の開発は世界で例がなく、これによって開発された新規治療方法は膵癌の予後改善に多大な貢献をもたらすと思われた。

2. 研究の目的

本研究では化学療法抵抗性を主導する癌間質ニッチ転移浸潤責任間質細胞に注目し、これをターゲットとして、さらなる characterization とその機能、機序を解明し、その制御を目的としたドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発を行う。

3. 研究の方法

膵星細胞の表面抗原の違いによる phenotype の分類を行うため、下記の実験を行った。

(1) 膵星細胞の表面抗原である CD146 や CD51 に着目し、癌細胞との相互作用における機能を解析してきた。具体的には免疫組織化学染色法で、膵癌切除症例における CD146 や CD51 の発現解析を行い、患者の予後との相関を解析した。

さらに、siRNA による CD146 の発現抑制を行い、癌細胞の遊走・浸潤に与える影響を解析した。

(2) 抗線維化薬として肺線維症の治療薬である Pirfenidone、および Calpine 阻害剤である Calpeptine に着目し、免疫不全マウスを用いた Xenograft モデルでの治療効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 膵星細胞の表面抗原の違いによる癌細胞への影響を解析するため、CD146 および CD51 に着目した。CD146 および CD51 はともに細胞間の接着に関与するタンパクである。これらのタンパクの膵星細胞での発現を当科で手術を行った膵癌切除標本の免疫組織化学染色を行い、その発現意義について解析した。

CD146 陽性の線維芽細胞は前癌病変である PanIN の周囲に存在し、PanIN の grade が上がるにつれて、CD146 の発現は増強された。さらに、CD146 高発現群と低発現群でその予後の及ぼす影響を比較すると、CD146 低発現群の方が予後不良であった(図 1)。

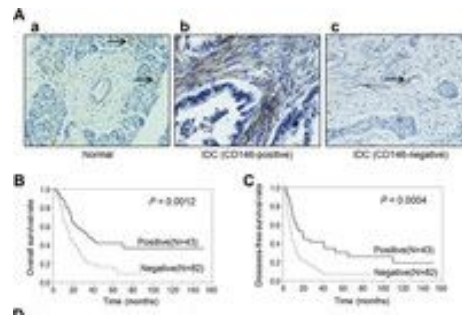


図 1 ヒト膵癌組織における CD146 の発現解析(免疫組織化学染色)

同様に CD51 の発現を免疫組織化学染色で評価した。膵星細胞における CD51 の発現を高発現群と低発現群に分けると、CD51 高発現群では有意に予後が不良であった。膵星細胞における CD51 の発現は膵癌の悪性度に促進的に作用している可能性が示唆された。(図 2)

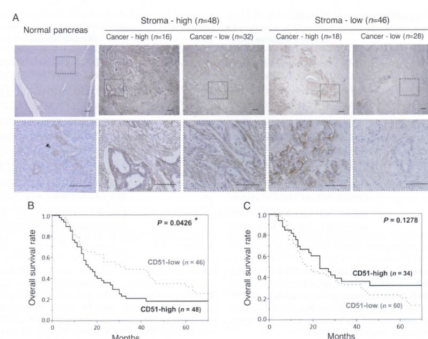
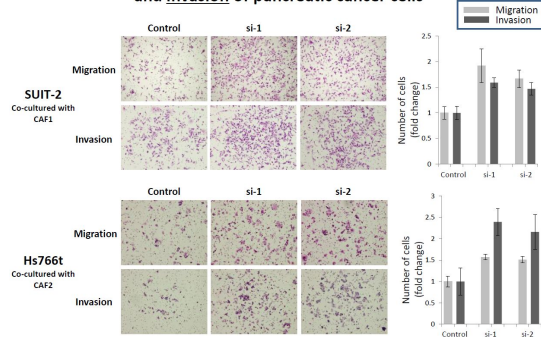


図 2 ヒト膵癌組織における CD51 の発現解析(免疫組織化学染色)

さらに、癌間質相互作用における CD146 の発現意義を解析するため、siRNA による CD146 の発現抑制を行った。間接共培養の系で、上層に癌細胞、下層に膵星細胞を置いて、癌細胞の遊走・浸潤を評価すると、CD146 の発現

Knockdown of CD146 in CAFs increase the migration and invasion of pancreatic cancer cells



抑制によって癌細胞の遊走・浸潤は亢進した。(図 3)

図 3 膵星細胞における CD146 の発現抑制が膵癌細胞の浸潤能に与える影響

膵星細胞における CD51 の発現抑制を shRNA を用いて行うと、培養実験においてその増殖能は低下し、遊走能も低下した。また、ヌードマウスへの皮下移植モデルで、CD51 の発現抑制によって腫瘍形成が减弱された(図 4)。さらに、形成された腫瘍の免疫染色を行うと、CD51 ノックダウン群では、活性化膵星細胞の指標である SMA の発現や、腫瘍内の線維化の使用である Sirius red の染色面積が低下していた。これらのことから、膵星細胞における CD51 の発現は腫瘍内線維化を介して癌細胞の悪性度に関与していることが示唆された。

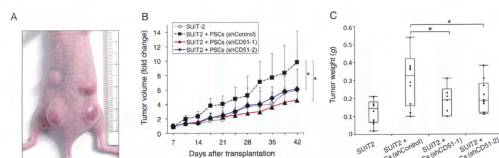


図 4 膵星細胞における CD51 の発現抑制が腫瘍形成に与える影響

(2) 膵星細胞を標的とした治療薬の探索のため、肺線維症の治療薬として既に臨床応用されている Pirfenidone に着目し、その腫瘍抑制効果を検証した。

ヌードマウスの膵臓に膵癌細胞と膵星細胞の共移植を行って、同所移植モデルを作成した。これに control 群、Pirfenidone 群、Gemcitabine 群、Gemcitabine + Pirfenidone 併用群で 4 群比較を行うと、Pirfenidone、Gemcitabine 併用群で、膵腫瘍の形成と、腹膜播種の形成が最も抑制

されることが分かった(図 5)。これらの、腫瘍の免疫染色を行うと、腫瘍内の SMA 陽性細胞数の減少や腫瘍内線維化の低減がみられ、Pirfenidone は腫瘍内間質の減少によって、Gemcitabine の効果を増強している可能性が示唆された。

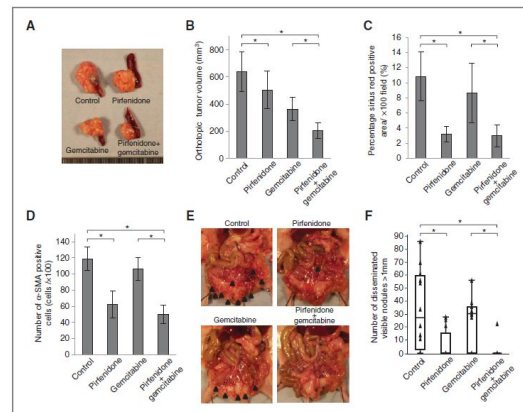


図 5 膵同所移植モデルにおける Pirfenidone の治療効果の検討

次に、Calpine 阻害剤である Calpeptine を用いた検討も行った。Calpeptine は培養実験において、膵星細胞の増殖、遊走能を低下させた。また、ヌードマウスの皮下共移植モデルで、Calpeptine は腫瘍抑制効果を示した。腫瘍の免疫染色を行うと、先述の Pirfenidone と同様に SMA 陽性細胞の減少と腫瘍内線維化の軽減が示された。これらの結果から、Calpeptine も膵星細胞を標的とした薬剤として膵癌治療に有用である可能性が示唆された。

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 5 件)

1. CD146 attenuation in cancer-associated fibroblasts promotes pancreatic cancer progression. Zheng B, Ohuchida K, Chijiwa Y, Zhao M, Mizuuchi Y, Cui L, Horioka K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Tanaka M. Mol Carcinog. 2016, in press, 査読有 doi: 10.1002/mc.22409
2. Suppression of CD51 in pancreatic stellate cells inhibits tumor growth by reducing stroma and altering tumor-stromal interaction in pancreatic cancer. Horioka K, Ohuchida K, Sada M, Zheng B, Moriyama T, Fujita H, Manabe T, Ohtsuka T, Shimamoto M, Miyazaki T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Int J Oncol. 48(4)1499-1508, 2016 査読有, doi: 10.3892/ijo.2016.3374

3. 膵癌の浸潤・転移における癌微小環境の新たな役割. 大内田研宙、大塚隆生、橋爪誠、中村雅史. 胆と膵. 2015. 36(10):1181-1187, 査読無
4. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells. Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, Ikenaga N, Fujiwara K, Cui L, Mizumoto K, Tanaka M. Cancer Research. 2013. 73(7):2345-2356, 査読有
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3180
5. 【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 -. 大内田研宙、大塚隆生、水元一博、田中雅夫. 胆と膵. 2013. 34(2):165-169, 査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Suppression of CD51 in Pancreatic Stellate Cells Inhibits Tumor Growth by Reducing Stroma and Altering Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer. Horioka K, Ohuchida K, Sada M, Zheng B, Ohtsuka T, Ueki T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. American Pancreatic Association 46th Annual Meeting(2016)
2. calpain 阻害剤である calpain による膵癌細胞及び膵星細胞への抑制効果の検討. 吉田真樹、大内田研宙、千々岩芳朗、奥村隆志、田中友晴、佐田政史、堀岡宏平、藤原謙次、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、高畑俊一、小田義直、水元一博、田中雅夫. 第 115 回日本外科学会定期学術集会(2015)
3. 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. 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. 第 45 回日本膵臓学会大会(2014)
4. トラニラストによる膵星細胞の抑制についての検討. 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. 第 114 回日本外科学会定期学術集会(2014)
5. 膵癌細胞からの作用により膵星細胞中の NPAS1 が増加する. 藤原謙次、大内田研宙、赤川進、大塚隆夫、高畑俊一、水元一博、田中雅夫. 第 45 回日本膵臓学会大会(2014)
6. The development of pancreatic cancer therapy based on regulating pancreatic cancer desmoplasia by targeting pancreatic Stellate Cells. Kozono S,

Ohuchida K, Ikenaga N, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M. International Pancreatic Research Forum (2013)

〔図書〕(計 1 件)

1. . 胆膵-膵臓- 9. 膵癌の個別化治療を探る. 佐田政史、水元一博、大内田研宙、大塚隆生、田中雅夫. Annual Review 2014 消化器. 2014. 252-257.

〔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
前山 良 (MAEYAMA, Ryo)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号: 10611668

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

当間 宏樹 (TOMA, Hiroki)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号: 80437780

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

(3)連携研究者

なし