

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：25462118
研究課題名(和文) 周皮細胞による腫瘍血管ネットワークのリモデリングに着目した新規膵癌治療戦略

研究課題名(英文) A new strategy in the treatment of pancreatic cancer focused on the tumor vessel remodeling by pericytes

研究代表者
真鍋 達也 (MANABE, Tatsuya)
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60546464
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)：本研究では周皮細胞が腫瘍血管に与える影響について検討した。周皮細胞は癌間質相互作用により癌の悪性度を増強する癌関連線維芽細胞(CAFs)と共通のマーカーを発現することが報告されており、我々が樹立した膵癌のCAFの一部にも周皮細胞のマーカーであるNG2, PDGFR の発現がみられ、切除組織の免疫染色では血管とは無関係に膵切除組織の間質に広く発現していた。又、CAFのCD51について、膵癌切除組織のCAFのCD51発現は予後と負の相関があり、in vitroのCD51抑制実験ではCAFの遊走、浸潤能は低下し、ヌードマウスへの膵癌細胞との共移植では腫瘍形成能が低下することを報告した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on how the pericytes, which cover the vessels and contribute to their stability, influence the tumor vessels. Pericytes express partially the same marker as cancer-associated fibroblasts(CAFs), which enhance cancer cell malignancy through the tumor-stromal interactions. In our study, NG2/PDGFR positive cells were observed in CAFs established from the resected pancreatic cancer specimens, and in the immunohistochemical staining, they were prevalent in the stroma regardless of blood vessels.

Moreover, higher stromal CD51 expression in the resected pancreatic cancer specimens was related to the shorter patients survival time, and the knockdown of CD51 in PSCs resulted in the suppression of proliferation and migration of PSCs in vitro. In addition, we reported that tumor growth in the nude mice co-transplanted with pancreatic cancer cells and CD51 knocked down PSCs was suppressed, compared with those co-transplanted with control PSCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 周皮細胞 膵星細胞 血管リモデリング 癌間質相互作用

1. 研究開始当初の背景

膵癌は desmoplasia と呼ばれる過剰な結合織増生を特徴とする乏血性腫瘍である。そのため、膵癌では抗癌剤の腫瘍内への到達率が低く、他の消化器癌と性質を異にしているため、血管新生という観点での研究は限定的である。近年血管新生機構において、癌間質相互作用により癌の悪性を増強する癌関連線維芽細胞と、血管を裏打ちして血管の安定性に関わる周皮細胞がそれぞれ共通のマーカーを発現し、固形癌において周皮細胞が腫瘍内血管ネットワークのリモデリングに関与していることが報告された。このことから、膵癌の癌関連線維芽細胞である膵星細胞が膵癌の進行に寄与するばかりでなく、腫瘍血管内ネットワークの構築に関与している可能性が示唆された。また、周皮細胞は膵星細胞の subpopulation である可能性も考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌内の血管ネットワーク構築に関与する膵星細胞と周皮細胞の関係を解明し、両者が行う腫瘍血管のリモデリングへの関与とそれを制御する新規の標的を同定し、膵癌への治療薬剤の送達効率を上昇させることである。

3. 研究の方法

(1) 膵癌切除標本の免疫組織化学染色を行い、活性化した膵星細胞のマーカーである SMA と周皮細胞のマーカーである NG2 および PDGFR についてその発現の有無や分布について検討する。

(2) 周皮細胞と膵星細胞の類似性に着目して我々が初代培養により樹立した膵星細胞をフローサイトメトリーを用いて解析し、周皮細胞のマーカーである NG2 および PDGFR の2つの細胞表面抗原を指標として膵星細胞における陽性率を検討する。

(3) (2)の結果から周皮細胞が膵星細胞の subpopulation である可能性が考えられた。そこで、膵癌における血管のリモデリングが膵癌の豊富な間質増生によってもたらされている可能性を考え、周皮細胞のみならず間質増生において中心的な役割を果たしている膵星細胞を対象として、間質増生の制御が血管の安定性向上に与える影響について検討を行う。具体的には、肝臓における線維化に肝星細胞の CD51 が関与するとの報告を基に、膵星細胞における CD51 制御が間質を抑制できるとの仮説に基づいて検証を行う。

膵癌切除組織の免疫組織化学染色で CD51 陽性細胞および CD31 陽性細胞 (血管内皮細胞) の分布、形態、位置関係を観察する。

膵癌切除組織の免疫組織化学染色における CD51 の染色強度と臨床病理学的因子の相関を

検討する。

膵星細胞の CD51 の発現を RNA 干渉によってノックダウンし、膵星細胞における CD51 の分子生物学的特性を検討する。

CD51 をノックダウンした膵星細胞とノックダウンしていない膵星細胞をそれぞれ膵癌細胞株 SUIIT-2 と共にヌードマウスの皮下に移植し、比較することで、*in vivo* での腫瘍形成における膵星細胞の CD51 の役割を検討する。

(4) 膵癌は豊富な間質増生を特徴とする乏血性腫瘍であり、組織内は低酸素状態である。この低酸素状態が間質のリモデリングに与える影響を膵星細胞の 3D 培養によって得られた細胞外基質の蛍光免疫染色によって検討する。

4. 研究成果

(1) 腫瘍内の血管には明らかな数の低下は認めず、その周囲の間質において SMA と NG2/PDGFR が広く発現していることが明らかになった。このことから、腫瘍内の乏血性を規定しているのは、血管の数ではなく機能の低下であることが示唆された。また、膵癌間質における SMA と NG2/PDGFR の発現分布の類似性からは、膵星細胞と周皮細胞の間には部分的に相同である可能性についても示唆された。

(2) 我々が初代培養により樹立した膵星細胞をフローサイトメトリーで解析すると、割合にはバラつきがあるものの、間質細胞の中にも周皮細胞のマーカーである NG2 または PDGFR 陽性の細胞群が存在していることが分かった。陽性率の違いについては、膵星細胞の由来や培養条件などに影響される可能性や、それぞれのマーカーの発現がダイナミックに変化する可能性が考えられた。

(3) 正常膵組織での CD51 の免疫組織化学染色では神経細胞のみが陽性であった。それに対し、膵癌組織では CD51 陽性細胞が血管とは無関係に間質に広く存在することが分かった (図1)。

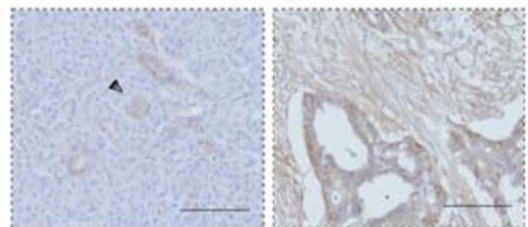


図1 CD51の免疫化学組織染色
左：正常膵組織 (矢頭：神経線維)
右：膵癌組織

膵癌切除組織の免疫組織化学染色を行い、間質細胞に占める CD51 陽性細胞の割合 (0%; 1, <25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; or 4, 76-100%) および染色強度 (陰性; 0, 弱陽性; 1, 中等度陽性

;2, 強陽性;3)をそれぞれスコア化し、掛け合わせることでCD51高発現群(>5点)、低発現群(<5点)に分けて検討を行った。その結果、CD51高発現群は低発現群と比較して有意に全生存期間が短かった(図2)。

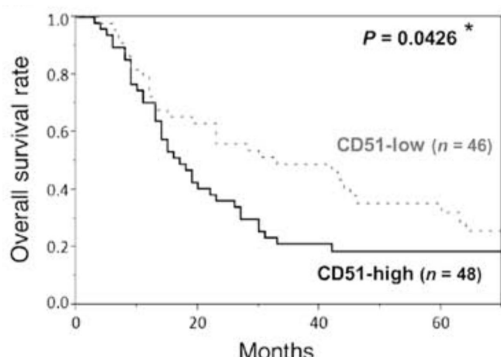


図2 膵星細胞のCD51高発現群は低発現群と比較して有意に全生存期間が短かった。

膵星細胞のCD51をRNA干渉によって発現抑制を行うと、膵星細胞の遊走および増殖能は低下した(図3)。このことから、膵星細胞のCD51発現は膵星細胞の遊走、増殖に促進的に働くことが示唆された。

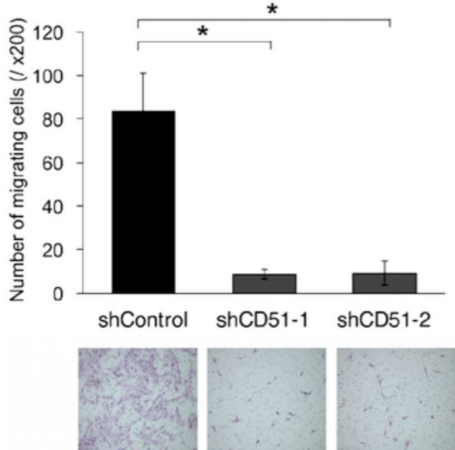
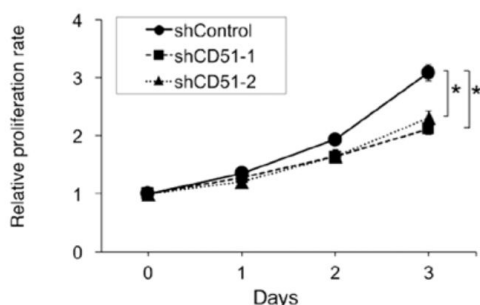


図3 CD51をノックダウンした膵星細胞では増殖能(上段)、遊走能(下段)が低下した

CD51 をノックダウンした膵星細胞とノックダウンしていない膵星細胞をそれぞれ膵癌細胞株 SUIT-2 とヌードマウスの皮下に共移植し、42 日後に解剖を行った。その結果、ノックダウンした膵星細胞と共移植した群

ではノックダウンしていない膵星細胞と共移植した群と比較して、有意に腫瘍の増殖速度が低下していた(図4)。また、腫瘍組織の sirius red 染色を行い、コラーゲン線維の増生を比較すると、CD51 をノックダウンした膵星細胞と共移植した群では有意にコラーゲン線維の増生が抑制された(図5)。

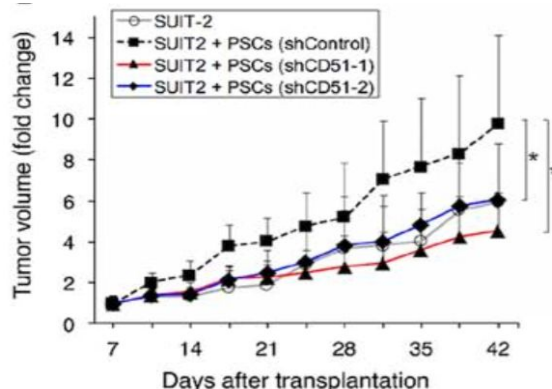


図4 ヌードマウス皮下への膵星細胞と膵癌細胞の共移植実験。CD51 をノックダウンした膵星細胞との共移植群では腫瘍の増殖能は低下した。

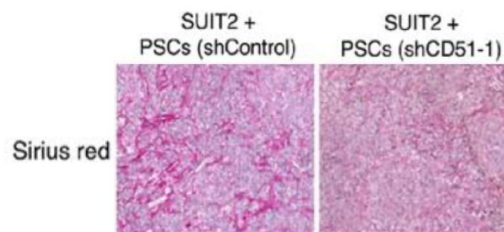


図5 CD51 をノックダウンした膵星細胞との共移植群では腫瘍内のコラーゲン線維の増生が抑制された。

(4) 膵星細胞の 3D 培養によって得られた細胞外基質をフィブロネクチンの蛍光免疫染色によって評価した。低酸素環境によって、膵星細胞が作り出す細胞外基質は、より平行に変化した。この結果から、低酸素環境は膵星細胞を介して、間質のリモデリングに影響を与えることが示唆された。

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 9 件)

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, CD146 attenuation in cancer-associated fibroblasts promotes pancreatic cancer progression. Mol Carcinog, 査読有, 2016, in press. doi: 10.1002/mc.22409.

Zheng B, Ohuchida K, Cui L, Zhao M, Shindo K, Fujiwara K, Manabe T, Torata N, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M, TM4SF1 as a prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma is involved in migration and invasion of cancer cells. *Int J Oncol.* 査読有, 47(2), 2015, 490-498.
doi: 10.3892/ijo.2015.3022

Mizuuchi Y, Aishima S, Ohuchida K, Shindo K, Fujino M, Hattori M, Miyazaki T, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y, Anterior gradient 2 downregulation in a subset of pancreatic ductal adenocarcinoma is a prognostic factor indicative of epithelial-mesenchymal transition. *Lab Invest.*, 査読有, 95(2), 2015, 193-206.
doi: 10.1038/labinvest.2014.138

Ideno N, Ohtsuka T, Matsunaga T, Kimura H, Watanabe Y, Tamura K, Aso T, Aishima S, Miyasaka Y, Ohuchida K, Ueda J, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M, Clinical Significance of GNAS Mutation in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas With Concomitant Pancreatic Ductal Adenocarcinoma., *Pancreas*, 査読有, 44(2), 2015, 311-320.
doi: 10.1097/MPA.0000000000000258

Fujimura Y, Ikenaga N, Ohuchida K, Setoyama D, Irie M, Miura D, Wariishi H, Murata M, Mizumoto K, Hashizume M, Tanaka M, Mass spectrometry-based metabolic profiling of gemcitabine-sensitive and gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Pancreas*, 査読有, 43(2), 2014, 311-318.
doi:10.1186/1476-4598-12-168

Fujiwara K, Ohuchida K, Sada S, Horioka K, Ulrich CD 3rd, Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M, CD166/ALCAM expression is characteristic of tumorigenicity and invasive and migratory activities of pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 査読有, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0107247.

Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Aishima S, Oda Y, Nagai E, Tanaka M, Micro RNA-373 is Down-regulated in Pancreatic Cancer and Inhibits Cancer Cell Invasion. *Annals of Surgical Oncology*, 査読有, 2014, doi: 10.1245/s10434-014-3676-8.

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.* 査読有, 45(1), 2014, 113-120
doi: 10.3892/ijo.2014.2391.

Eguchi D, Ohuchida K, Kozono S, Ikenaga N, Shindo K, Cui L, Fujiwara K, Akagawa S, Ohtsuka T, Takahata S, Tokunaga S, Mizumoto K, Tanaka M, MAL2 expression predicts distant metastasis and short survival in pancreatic cancer., *Surgery*, 査読有, 154(3), 2013, 573-582
doi: 10.1016/j.surg.2013.03.010.

〔学会発表〕(計 1件)

Horioka K, et al. Suppression of CD51 in Pancreatic Stellate Cells Inhibits Tumor Growth by Reducing Stroma and Altering Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer., *American Pancreatic Association 46th Annual Meeting.*, 2015.11.4., San Diego(America)

〔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

真鍋 達也 (MANABE, Tatsuya)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号: 60546464

(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

上田 純二 (UEDA, Junji)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：90529801

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