

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640060

研究課題名(和文)可視化システムを用いた膵癌幹細胞の研究とゲノム・エピゲノム解析

研究課題名(英文) Genomic/Epigenomic analyses and investigation for pancreatic CSCs with visualizing system

研究代表者

伊藤 浩光 (Ito, Hiromitsu)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：80645474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は早期から浸潤や転移を生じる難治性の癌である。我々は、プロテアソーム活性を指標とした膵癌幹細胞の可視化システムを構築し、この課題に取り組んだ。本研究では、膵癌幹細胞が高い遊走・浸潤能力を持つことを示し、肝転移腫瘍の辺縁に局在しているという新しい知見を示した。ゲノム・エピゲノム解析から、膵癌幹細胞にDCLK1が高発現していることを同定、ヒストンのメチル化修飾との関連を示した。DCLK1を強制発現させると遊走・浸潤能力が顕著に亢進する一方、発現が抑制された癌幹細胞では転移能力は著しく消失した。臨床検体における検証も加え、DCLK1が今後の膵癌治療の標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Patients with pancreatic cancer typically develop tumor invasion and metastasis in the early stage. We previously examined the proteasome activity of CSCs and constructed a real-time visualization system for human pancreatic CSCs. In the present study, we found that CSCs were highly metastatic and dominantly localized at the invading tumor margins in a liver metastasis model. Microarray and siRNA screening assays showed that DCLK1 was predominantly expressed with histone modification in pancreatic CSCs with invasive and metastatic potential. Overexpression of DCLK1 led to amoeboid morphology, which promotes the migration of pancreatic cancer cells. Knockdown of DCLK1 profoundly suppressed in vivo liver metastasis of pancreatic CSCs. With clinical samples, our studies revealed that DCLK1 may be a promising epigenetic and therapeutic target in human pancreatic cancer.

研究分野：膵臓癌

キーワード：癌幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は近年、罹患率・死亡率ともに上昇しているものの、5年生存率は10%にも満たず、難治性の代表的な悪性腫瘍として早急に新治療の開発が望まれていた。難治性機序には癌幹細胞の関与が示唆され、以前よりCD133, CD24, ESA, CD44, CXCR4 といった表面マーカーを指標とした研究が行われてきた (Cancer Res2007)。しかしながら、このような指標は不安定なことが多く、十分な成果が未だに得られていなかった。

### 2. 研究の目的

上述のように、癌組織にも幹細胞性を示す細胞群の内在が示され heterogeneity の根源となることが報告されているものの、その動態や局在には不明な点が多い。本研究では、膵癌幹細胞の可視化システム (Gastroenterology2012) を用いて膵同所モデルを作成し、その局在・ニッチ・転移形態を解析し、生体内での維持機構・転移機序の解明を行う。また、次世代シーケンサーを用いて癌幹細胞の遺伝子発現解析を行うとともに、DNAメチル化やヒストン修飾といったエピゲノムの側面からも解析を行い、その分子生物学的特徴を明らかにすることを目標とする。

### 3. 研究の方法

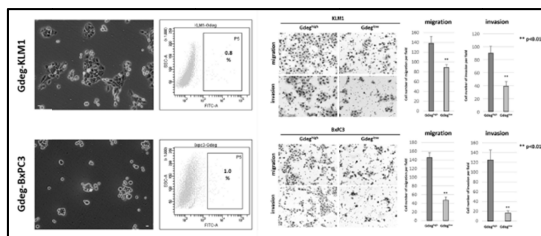
非ユビキチン化プロテアソーム活性を反映するオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) デグロン配列と蛍光蛋白 (ZsGreen) の融合遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いてヒト膵癌細胞株2種類 (KLM1, BxPC3) に導入し安定株を作成 (Gdeg-KLM1, Gdeg-BxPC3)。癌幹細胞をリアルタイムに可視化できるシステムを構築した。フローサイトメトリーにより光る細胞 (Gdeg<sup>high</sup>-KLM1, Gdeg<sup>high</sup>-BxPC3) を選別し in vitro で sphere 形成能力や遊走・浸潤能力、in vivo で腫瘍造成能力や転移能力を評価した。次にマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析により、癌幹細胞 (Gdeg<sup>high</sup>細胞) で高発現している遺伝子を同定した。この遺伝子を過剰に発現させた株と発現を抑制した株を作成し膵癌幹細胞における機能を明らかにしようと試みた。また、臨床検体の免疫組織学的染色も施行し、実臨床へ応用の可能性を模索した。

#### <実際の工程>

- (1) 安定した癌幹細胞可視化システムの構築
- (2) In vitro における動態解析
- (3) In vivo における肝転移モデルの作製
- (4) 癌幹細胞の網羅的遺伝子解析
- (5) 癌幹細胞のエピゲノム解析 (DNAメチル化・ヒストン修飾)
- (6) 標的遺伝子の同定とその作用機序の解明
- (7) 臨床検体を用いた検証

### 4. 研究成果

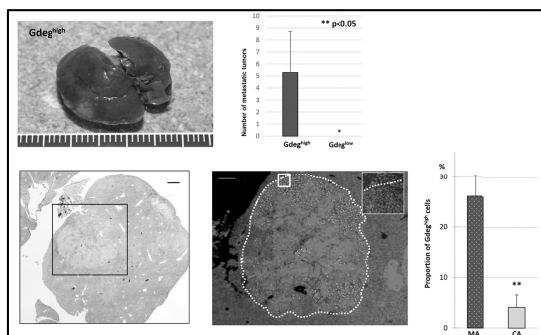
2種類のヒト膵癌細胞株に ODC デグロン配列と蛍光蛋白の融合遺伝子を導入した。安定した株が樹立され (Gdeg-KLM1, Gdeg-BxPC3)、双方とも全細胞数の約1%に光る細胞 (Gdeg<sup>high</sup>) を認めた。In vitro 実験では、Gdeg<sup>high</sup>細胞はGdeg<sup>low</sup>細胞に比べて sphere 形成能が高く、Double Chamber Assay において遊走・浸潤能力が高いことが明らかとなった



(図1)。

<図1:細胞株の樹立と遊走・浸潤能の結果>

In vivo 実験では、Gdeg<sup>high</sup>細胞はGdeg<sup>low</sup>細胞より少ない細胞で皮下腫瘍を形成し、経脾臓肝転移モデルではGdeg<sup>high</sup>細胞で高い転移能力が示された。生体内でも蛍光モニタリング可能であることが示され、転移巣において



Gdeg<sup>high</sup>細胞は中心部よりは腫瘍辺縁に局在していることが明瞭に観察された(図2 a, b)。

<図2 a: Gdeg<sup>high</sup>-KLM1 の肝転移モデル>

<図2 b: Gdeg<sup>high</sup>-BxPC3 の肝転移モデル>

KLM1-Gdeg<sup>high</sup>細胞および KLM1-Gdeg<sup>low</sup>細胞から RNA を抽出して網羅的遺伝子発現解析を行った結果、Gdeg<sup>high</sup>細胞で発現が亢進している遺伝子 (FC>2) は 483 個、発現が抑制されている遺伝子 (FC<0.5) は 1138 個を同定した。発現が亢進している遺伝子群の中で、浸潤や転移に深く関わっていると考えられる DCLK1 に着目した(下図3, 表1)。

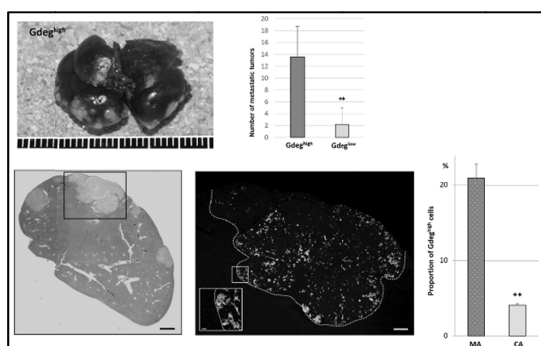
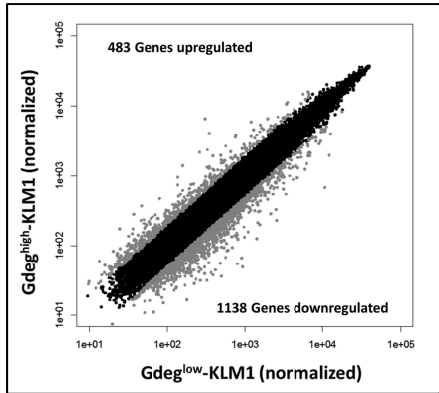


図3  
表1  
< 図3表

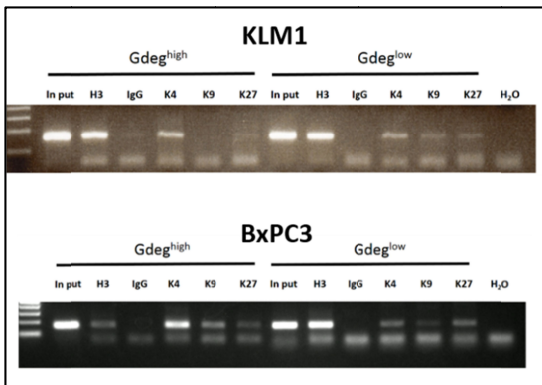


1 :Gdeg-KLM1 における網羅的遺伝子解析結果

Rank	Probe set ID	Gene symbol	Signal	FC(log2)	siRNA target sequence
1	214580_x_at	KRT5A/B/C	286.23	14.9	4.838
2	209525_at	KRT6A	665.6	30.8	4.450
3	205399_at	DCLK1	405.42	34.2	3.558
4	205767_at	EREG	1402.7	157.9	3.151
5	20964_at	SPRR1B	2003.3	260.3	3.081
6	215303_at	DCLK1	370.2	46.0	3.010
7	230962_at	DCLK1	280.4	36.5	2.942
8	209126_x_at	KRT10	2385.9	325.8	2.873
9	241280_x_at	---	172.9	24.2	2.836
10	204472_at	GEM	952.7	136.2	2.806
11	214421_at	HDV	473.9	79.7	2.572
12	1596772_at	---	725.5	138.0	2.459
13	207172_x_at	CDH11	231.5	45.6	2.345
14	209551_at	KRT14	1944.1	382.8	2.345
15	224460_x_at	ADP1B	5005.5	1190.3	2.311
16	202426_s_at	CYP11B1	3803.6	767.4	2.309
17	224441_s	PAPPA	175.2	35.7	2.293
18	202427_s_at	CYP11B1	3848.7	744.7	2.287
19	202425_s_at	CYP11B1	2893.5	564.4	2.255
20	235608_at	---	235.9	49.6	2.248

果>

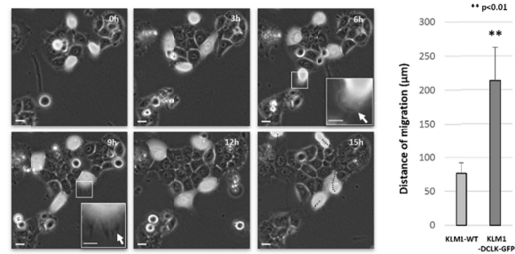
DCLK1 は、以前より神経細胞の遊走に参与していることが示されており、近年では消化管の癌幹細胞特異的のマーカとして報告されている。上記の結果をふまえ、免疫学的染色を行ったところ、Gdeg<sup>high</sup> 細胞の細胞質に DCLK1 が強く発現していることが示された。そして、クロマチン免疫沈降法により、この発現変化がヒストンのメチル化修飾 (H3K4me3 および H3K27me3) を介した動的遺伝子発現調節機構によることを示した (図



4 )  
< 図4 : 両株におけるヒストンメチル化修飾>

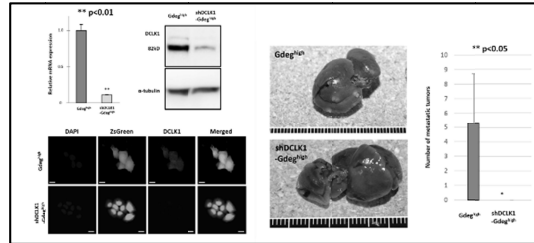
次に、DCLK1 を過剰発現させたヒト膵癌細胞株 (KLM1-DCLK1-GFP) を作成し、細胞の形態変化や遊走・浸潤能力を調べた。この過剰発現させた株において、神経細胞での報告と同様に DCLK1 は細胞骨格である微小管を形成する tubulin と merge していた。タイムラプスによる観察で、KLM1-DCLK1-GFP は細胞表面

に偽足を伸展させるなど、いわゆるアメーバ様の形態変化が認められ、遊走・浸潤能力が著しく亢進した (図5)。



< 図5 : KLM1-DCLK1-GFP の timelapse 像>

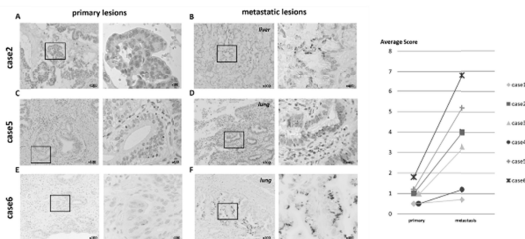
次に、Gdeg<sup>high</sup> 細胞に対して RNA 干渉により DCLK1 の発現抑制を行ったところ、遊走・浸潤能力が著しく減弱した。さらに Gdeg-KLM1 細胞から DCLK1 ノックダウン安定株を作成した結果、DCLK1 が抑制された光る細胞 (shDCLK1-Gdeg<sup>high</sup>-KLM1) では肝転移が抑制されることが示された (図6)。



< 図6 : DCLK1 ノックダウンにより肝転移が抑制された>

さらに、膵臓癌切除症例で遠隔転移巣が切除された6症例 (同時切除3例、異時切除3例) について DCLK1 の免疫組織学的染色を行った。すると、原発巣でほとんど認められなかった DCLK1 陽性細胞が転移巣では増加していることが示され、特に異時性に切除された肺組織で顕著であった (図7)。

Case	Age/Gender	Synchronous/Metachronous	Metastatic Organ	Chemo/so/therapy	Survival time after metastasis resection
1	57M	Synchronous	Liver	TS-1/Gemcitabine	23 months
2	51M	Synchronous	Liver	TS-1/Gemcitabine	6 months
3	77M	Synchronous	Liver	TS-1/Gemcitabine/Efotib	11 months
4	59M	Metachronous	Liver	TS-1/Gemcitabine	10 months
5	52M	Metachronous	Lung	TS-1/Gemcitabine	24 months
6	60F	Metachronous	Lung	TS-1/Gemcitabine/Flutidion	12 months



< 図7 : 臨床検体による評価>

以上の我々の研究結果より、DCLK1 は膵臓の浸潤と転移の促進因子であり、治療の標的となる可能性が示された。

## 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 1 件 )

Ito H, Tanaka S, Akiyama Y, Shimada S, Adikrisna R, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Arii S, Yamaoka S, Tanabe M.

Dominant expression of DCLK1 in human pancreatic cancer stem cells accelerates tumor invasion and metastasis.

PLoS ONE

査読有

11(1)

2016

10.1371/journal.pone.0146564

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

伊藤浩光

ヒト膵癌幹細胞可視化システムを用いた  
転移メカニズムの解析と標的遺伝子の同定  
第 116 回日本外科学会定期学術集会

2016 年 4 月 14 日

大阪府大阪市、大阪国際会議場

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 浩光 (Ito, Hiromitsu)

東京医科歯科大学

大学院医歯学総合研究科助教

研究者番号 : 80645474