

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670566

研究課題名(和文)胆道癌微小転移に対する間葉系幹細胞を用いた癌標的治療の開発

研究課題名(英文)Development of a novel treatment for micro metastatic tumors derived from cholangiocarcinoma using mesenchymal stem cells

研究代表者

片寄 友(KATAYOSE, YU)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：20302151

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): ヒトMSCよりMuse細胞の分離抽出を行い、多分化能を確認できた。Muse細胞は、MSCが持つ多分化能と血管新生作用を特に強く持つ分画であると考えられるため、この移植により胆管癌の血管新生が促進され、抗癌剤の感受性が向上するものと期待される。同時に、腫瘍の血流増加は易転移性にもつながる可能性があるため、Muse細胞による抗腫瘍治療法の確立にはさらなる検証が必要であるとも考えられた。

研究成果の概要(英文): In spite of the progress of treatment for cholangiocarcinoma, the prognosis is still not good. One of the reasons for the poor prognosis is a difficulty in prevention of micro metastases, which are hardly to identify by any imaging examinations. We estimated that it is necessary for improvement of the prognosis to eliminate the micro metastases, and therefore, aimed to develop a novel treatment using multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells, which are the components of mesenchymal stem cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：間葉系幹細胞 多能性幹細胞 胆管癌

### 1. 研究開始当初の背景

胆道癌の治療の第一は外科切除であり、術式および周術期の管理の向上とともに治療成績は向上しているが、いまだ予後不良の癌の一つである。その理由は、抗癌剤の効果が不十分であり、画像診断では捉えられない微小転移の制御が困難であることが一因である。進行胆道癌に対する抗癌剤は Gemcitabine + CDDP が標準治療となり (ABC-02 試験) 積極的に抗癌剤が使用され、長期生存例から希と考えられていた遠隔転移を認めている。われわれも骨転移をまとめた検討を報告した。そのため微小転移の制御が必須と考え、われわれは抗体を軸とした免疫療法を研究しているが、今のところ臨床応用は進んでいない。そこで、予後向上のために微小転移の根絶が必須と考え、われわれは間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, 以下 MSC) の一つである多能性幹細胞 (Multilineage-differentiating stress enduring cells (Muse 細胞)) のターゲティング性を生かした癌標的治療を開発する発想となった。

### 2. 研究の目的

胆管癌治療に有効な Muse 細胞による癌標的治療の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 課題 1. MSC、Muse 細胞の評価

##### < マウス MSC の採取とその評価 >

9-12 週齢相当の BALB/c マウスの大腿骨 / 脛骨より骨髓細胞を採取回収し、培養皿上で付着培養する。血球成分は付着しないため、これを洗浄にて除去する。付着細胞を継代することで増殖させ、フローサイトメトリーで Positive marker (CD29, 44, 73, 105, 106, Sca-1) および Negative marker (CD11b, CD45 以下の表面マーカー) を用いて、培養された細胞が、MSC であることを確認する。

さらに MSC の多分化能を評価するため、骨細胞分化と脂肪細胞分化の誘導で確認する。骨細胞分化には、MEM, FBS, L-glutamine, antibiotics, Dexamethasone, Ascorbic acid,  $\beta$ -glycerol phosphate を用いて MSC を 14 日間培養し、分化の確認を骨基質である Arizarin Red で染色し確認する。また、脂肪細胞分化には、MEM, FBS, L-glutamine, antibiotics, Insulin, Dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine を用いて MSC を 14 日間培養し、脂肪滴を Oil Red O 染色し確認する。

##### < Muse 細胞の評価 >

Muse 細胞はヒト間葉系幹細胞にヒト ES 細胞のマーカーである SSEA-3+ を標識し、標識された細胞をフローサイトメトリーで分離抽出することにより採取する。Muse 細胞の多分化能は中胚葉系 (SMA)、外胚葉系

(neurofilament)、内胚葉系 (CK7) の各マーカーの免疫染色により評価する。

#### 課題 2. MSC の血管新生促進効果を活かした効果的な抗腫瘍剤治療モデルの開発

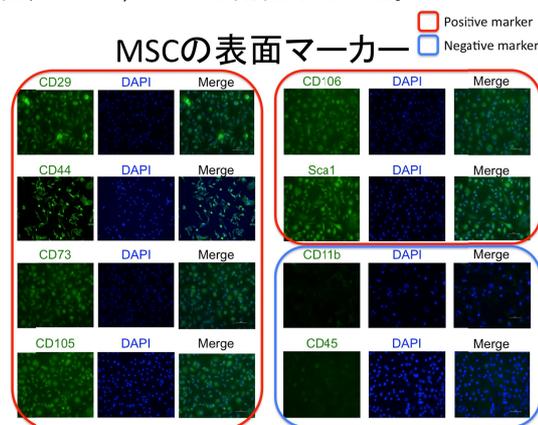
##### < MSC と内皮細胞の共培養による新生血管の作成 >

微小転移の制御のためには、抗癌剤を病巣に効果的に作用させる工夫が必要と考えられるが、MSC には血管新生誘導作用があるため、この移植で局所的に病巣の血流を向上させることにより、抗癌剤の病巣への効果的な流入が期待できる。その一つのモデルとして、マウス MSC とヒト臍帯静脈血管内皮細胞を温度感応性培養皿で共培養することで、培養皿上に血管の構築が可能であるか検証する。

### 4. 研究成果

#### < 採取した MSC の評価 >

骨髓細胞を付着培養にて増殖させ、フローサイトメトリーにて MSC を回収した。回収した MSC は CD29, 44, 73, 105, 106, Sca-1 が陽性、CD11b, CD45 が陰性であった。



また得られた MSC に対し、骨および脂肪への分化誘導を行ったところそれぞれへの分化を確認できた。

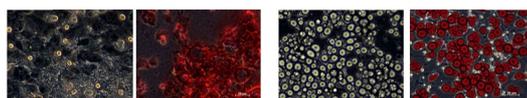
### 多分化能評価

#### 骨細胞分化

- confluentしたMSCを14日間培養。
  - $\alpha$ MEM, FBS, L-glutamine, antibiotics, Dexamethasone, Ascorbic acid,  $\beta$ -glycerol phosphate
- 分化後、骨基質をArizarin Redで染色。

#### 脂肪細胞分化

- confluentしたMSCを14日間培養。
  - $\alpha$ MEM, FBS, L-glutamine, antibiotics, Insulin, Dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine
- 分化後、脂肪滴をOil Red O染色した。



以上より、得られた細胞が MSC であることの確認が得られた。

#### < Muse 細胞の評価 >

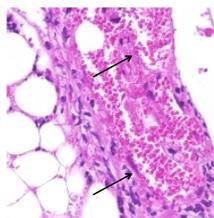
ヒト MSC より Muse 細胞の分離抽出を行った。結果、総 MSC における Muse 細胞の存在

比は 5%以下であった。また、得られた Muse 細胞は分化誘導処置により、SMA、neurofilament、CK7 といった各胚葉の特異マーカーが陽性になることを確認できた。

#### <MSC と血管内皮細胞との共移植実験>

マウス MSC とヒト臍帯静脈血管内皮細胞との共培養により、MSC と血管内皮細胞はクラスター化し、その組織学的検討でヒト CD31 陽性細胞による管腔形成像が認められた。

そしてこれをマウスの腹腔内に移植したところ、移植後 14 日において血流を伴う血管形成が認められた。



腹腔内に移植され、14日を経過したMSC+血管内皮細胞組織。移植片における血管形成と血流(=赤血球の存在)が認められる。

Muse 細胞は、MSC が持つ多分化能と血管新生作用を特に強く持つ分画であると考えられるため、この移植により胆管癌の血管新生が促進され、抗癌剤の感受性が向上するものと期待される。同時に、腫瘍の血流増加は易転移性にもつながる可能性があるため、Muse 細胞による抗腫瘍治療法の確立にはさらなる検証が必要であるとも考えられた。

#### 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 41 件)

1. Miura S, Kanno A, Masamune A, Hamada S, Hongou S, Yoshida N, Nakano E, Takikawa T, Kume K, Kikuta K, Hirota M, Yoshida H, Katayose Y, Unno M, Shimosegawa T. Risk factors for recurrent biliary obstruction following placement of self-expandable metallic stents in patients with malignant perihilar biliary stricture. *Endoscopy*. 2016 (epub ahead of print). DOI: 10.1055/s-0042-102651 査読あり
2. Hata T, Ishida M, Motoi F, Yamaguchi T, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Telomerase activity in pancreatic juice differentiates pancreatic cancer from chronic pancreatitis: A meta-analysis. 2016. doi: 10.1016/j.pan.2016.01.007. 査読あり
3. Hata T, Motoi F, Ishida M, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Effect of Hospital Volume on Surgical Outcomes After Pancreaticoduodenectomy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg*. 2016;263(4):664-72. doi: 10.1097/SLA.0000000000001437. 査読あり
4. Hata T, Ishida M, Motoi F, Sakata N, Yoshimatsu G, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Clinical Characteristics and Risk Factors for the Development of Postoperative Hepatic Steatosis After Total Pancreatectomy. *Pancreas*. 2016; 45(3):362-9. doi: 10.1097/MPA.0000000000000462. 査読あり
5. Naitoh T, Morikawa T, Tanaka N, Aoki T, Ohtsuka H, Okada T, Sakata N, Ohnuma S, Nakagawa K, Hayashi H, Musha H, Yoshida H, Motoi F, Katayose Y, Unno M. Early experience of robotic surgery for type I congenital dilatation of the bile duct. *J Robot Surg*. 2015;9(2):143-8. doi: 10.1007/s11701-015-0504-5. 査読あり
6. Tsuchiya H, Sakata N, Yoshimatsu G, Fukase M, Aoki T, Ishida M, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Extracellular Matrix and Growth Factors Improve the Efficacy of Intramuscular Islet Transplantation. *PLoS One*. 2015 Oct 16;10(10):e0140910. doi: 10.1371/journal.pone.0140910. 査読あり
7. 中川 圭, 片寄 友, 石田和之, 林 洋毅, 森川孝則, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 久保正二, 海野 倫明. 印刷業職業性胆管癌に対する化学放射線療法と根治的肝切除の経験. *日消病誌*. 2015;112(7):1341-7. 査読あり
8. 佐藤菜保子, 片寄 友, 元井冬彦, 中川 圭, 坂田直昭, 川口 桂, 佐藤富美子, 海野倫明. 膵切除術後 3 ヶ月の患者 QOL 検討からみた症状介入の方略. *膵臓*. 2015;30(5):654-662. 査読あり
9. 志村充広, 水間正道, 元井冬彦, 片寄 友, 高瀬 圭, 海野倫明. 87 歳肝血管腫自然破裂の 1 例. *日臨外会誌*. 2015;76(6):1469-1473. 査読あり
10. 井上亨悦, 水間正道, 大塚英郎, 中川 圭, 林 洋毅, 岡田恭穂, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 神宮啓一, 海野倫明. 続発性ヘモクロマトーシスを背景とした肝細胞癌門脈腫瘍栓再発に対し放射線治療が著効した 1 例(続報). *肝臓*. 2015;56(4):150-156. 査読あり
11. Douchi D, Ohtsuka H, Ariake K, Masuda K, Kawasaki S, Kawaguchi K, Fukase K, Oikawa M, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Silencing of

- LRRFIP1 reverses the epithelial-mesenchymal transition via inhibition of the Wnt/ -catenin signaling pathway. *Cancer Lett.* 2015;365(1):132-40. doi:10.1016/j.canlet.2015.05.023 査読あり
12. Katayose Y, Yamamoto K, Nakagawa K, Takemura S, Takahashi M, Nakamura R, Shimamura H, Rikiyama T, Egawa S, Yoshida H, Motoi F, Naitoh T, Unno M. Feasibility Assessment of Modified FOLFOX-6 as adjuvant treatment after resection of liver metastases from colorectal cancer: analyses of a multicenter phase II clinical trial (Miyagi-HBPCOG Trial-001). *Hepatogastroenterology.* 2015;62(138):303-8. <http://www.thieme.com/books-main/internal-medicine/product/2172-hepato-gastroenterology>. 査読あり
  13. Ohtsuka H, Fukase K, Yoshida H, Motoi F, Hayashi H, Morikawa T, Okada T, Nakagawa K, Naitoh T, Katayose Y, Unno M. Long-term outcomes after extrahepatic excision of congenital cholangiocyst: 30 years of experience at a single center. *Hepatogastroenterology.* 2015;62(137):1-5. <http://www.thieme.com/books-main/internal-medicine/product/2172-hepato-gastroenterology>. 査読あり
  14. Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Minowa T, Takemura T, Morita H, Hata T, Fukase M, Aoki T, Ishida M, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. The co-transplantation of bone marrow derived mesenchymal stem cells reduced inflammation in intramuscular islet transplantation. *PLoS One.* 2015 Feb 13;10(2):e0117561. doi:10.1371/journal.pone.0117561. 査読あり
  15. 吉田 寛, 林 洋毅, 片寄 友, 海野倫明. 胆道癌 手術適応と術式選択 開腹手術 日本臨床. 2015;73 Suppl 3:576-9. 査読なし
  16. 片寄 友, 林 洋毅, 海野倫明. 胆道癌治療のアルゴリズム. 日本臨床. 2015;73 Suppl 3:572-5. Japanese. 査読なし
  17. Hata T, Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Fukase M, Ishida M, Aoki T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Nerve Growth Factor Improves Survival and Function of Transplanted Islets Via TrkA-mediated Cell Proliferation and Revascularization. *Transplantation.* 2015;99(6):1132-43. doi:10.1097/TP.0000000000000655. 査読あり
  18. Miura S, Kanno A, Masamune A, Hamada S, Takikawa T, Nakano E, Yoshida N, Hongo S, Kikuta K, Kume K, Hirota M, Yoshida H, Katayose Y, Uuno M, Shimosegawa T. Bismuth classification is associated with the requirement for multiple biliary drainage in preoperative patients with malignant perihilar biliary stricture. *Surg Endosc.* 2015;29(7):1862-70. doi:10.1007/s00464-014-3878-y. 査読あり
  19. Komatsu H, Egawa S, Motoi F, Morikawa T, Sakata N, Naitoh T, Katayose Y, Ishida K, Unno M. Clinicopathological features and surgical outcomes of adenosquamous carcinoma of the pancreas: a retrospective analysis of patients with resectable stage tumors. *Surg Today.* 2015;45(3):297-304. doi:10.1007/s00595-014-0934-0. 査読あり
  20. 佐瀬友彦, 唐澤秀明, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 海野 倫明. FDG-PET で発見され悪性腫瘍との鑑別が困難であった硬化性腸間膜炎の 1 例. 日臨外会誌. 2014;75(10):2779-2782. 査読あり
  21. 海野倫明, 青木 豪, 吉田 寛, 元井冬彦, 片寄 友. 中下部胆管癌の外科治療. 胆道. 2014;28(2):249-253. 査読あり
  22. 河野えみ子, 田中直樹, 工藤克昌, 武者宏昭, 土屋堯裕, 宮地智洋, 長尾宗紀, 梶原大輝, 木村俊一, 唐澤秀明, 青木 豪, 阿部友哉, 大沼 忍, 中川 圭, 森川孝則, 吉田 寛, 元井冬彦, 片寄 友, 内藤 剛, 海野倫明. 術前 S-1 + CDDP 分割投与により pCR が得られた進行胃癌の 2 例. 癌と化学療法. 2014;41(12):2279-81. 査読なし
  23. 谷口 肇, 水間正道, 元井冬彦, 阿部友哉, 岡田 良, 川口 桂, 唐澤秀明, 益田邦洋, 藪内伸一, 深瀬耕二, 坂田直昭, 岡田恭穂, 中川 圭, 林 洋毅, 森川孝則, 吉田 寛, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明. 術後 8 年で局所・遠隔転移再発を認めた通常型膵癌の 1 例. 癌と化学療法. 2014;41(12):2193-5. 査読なし
  24. 小林 実, 大沼 忍, 加藤俊介, 唐澤秀明, 青木 豪, 工藤克昌, 田中直樹, 渡辺和宏, 長尾宗紀, 阿部友哉, 武者宏昭, 森川孝則, 元井冬彦, 片寄 友, 内藤 剛, 海野倫明. 長期間に及ぶ化学療法により組織学的 CR が得られた局所進行直腸癌の 1 例. 癌と化学療法.

- 2014;41(12):1755-7. 査読なし
25. 木村俊一, 大沼 忍, 唐澤秀明, 青木 豪, 工藤克昌, 渡辺和宏, 田中直樹, 長尾宗紀, 阿部友哉, 武者宏昭, 森川孝則, 元井冬彦, 片寄 友, 内藤 剛, 海野倫明. S-1 併用術前化学放射線療法により側方リンパ節転移が消失したと考えられた直腸癌の1例. 癌と化学療法. 2014;41(12):1560-2. 査読なし
  26. 白崎圭一, 森川孝則, 大塚英郎, 片寄 友, 海野倫明. 肝門部胆管癌多発肝転移に対し肝切除および Gemcitabine, S-1 療法が奏効し長期生存を得た1例. 癌と化学療法. 2014;41(12):1530-2. 査読なし
  27. 片桐宗利, 片寄 友, 藪内伸一, 唐澤秀明, 佐藤 純, 森川孝則, 元井冬彦, 内藤 剛, 海野倫明. 進行胆嚢癌術後の縦隔転移に対する集学的治療が奏効した1例. 癌と化学療法. 2014;41(12):1527-9. 査読なし
  28. Asano R, Shimomura I, Konno S, Ito A, Masakari Y, Orimo R, Taki S, Arai K, Ogata H, Okada M, Furumoto S, Onitsuka M, Omasa T, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Umetsu M, Kumagai I. Rearranging the domain order of a diabody-based IgG-like bispecific antibody enhances its antitumor activity and improves its degradation resistance and pharmacokinetics. *MAbs*. 2014;6(5):1243-54. doi: 10.4161/mabs.29445. 査読あり
  29. Aoki T, Motoi F, Sakata N, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Miyazaki J, Unno M. Somatostatin analog inhibits the growth of insulinoma cells by p27-mediated G1 cell cycle arrest. *Pancreas*. 2014;43(5):720-9. doi: 10.1097/MPA.000000000000128. 査読あり
  30. Hayashi H, Morikawa T, Yoshida H, Motoi F, Okada T, Nakagawa K, Mizuma M, Naitoh T, Katayose Y, Unno M. Safety of postoperative thromboprophylaxis after major hepatobiliary-pancreatic surgery in Japanese patients. *Surg Today*. 2014;44(9):1660-8. doi: 10.1007/s00595-014-0890-8. 査読あり
  31. Komatsu H, Tanji E, Sakata N, Aoki T, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M, Furukawa T. A GNAS mutation found in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms induces drastic alterations of gene expression profiles with upregulation of mucin genes. *PLoS One*. 2014;9(2):e87875. doi: 10.1371/journal.pone.0087875. 査読あり
  32. Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hata T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Strategy for clinical setting in intramuscular and subcutaneous islet transplantation. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014;30(1):1-10. Review. doi: 10.1002/dmrr.2463. 査読あり
  33. 大沼 忍, 内藤 剛, 羽根田翔, 工藤克昌, 神山篤志, 長尾宗紀, 田中直樹, 佐々木宏之, 青木 豪, 阿部友哉, 武者宏昭, 森川孝則, 吉田 寛, 元井冬彦, 片寄 友, 柴田 近, 海野倫明. 直腸神経内分泌腫瘍に対する治療方針. 癌と化学療法. 2013;40(12):2077-9. 査読なし
  34. 青木修一, 水間正道, 元井冬彦, 深瀬耕二, 坂田直昭, 中川 圭, 岡田恭穂, 林洋毅, 森川孝則, 吉田 寛, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明. 切除不能局所進行膵癌に対し R0 のアジュバント切除を施行し得た1例. 癌と化学療法. 2013;40(12):1868-71. 査読なし
  35. 元井冬彦, 川口 桂, 青木 豪, 工藤克昌, 藪内伸一, 深瀬耕二, 水間正道, 坂田直昭, 乙供 茂, 森川孝則, 林 洋毅, 中川 圭, 岡田恭穂, 吉田 寛, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明. 切除企図・切除可能膵癌に対する術前化学療法の有効性. 癌と化学療法. 2013;40(12):1632-6. 査読なし
  36. 水間正道, 中川 圭, 坂田直昭, 林 洋毅, 岡田恭穂, 森川孝則, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 海野倫明. 肝外胆管癌に対する術前治療. 癌と化学療法. 2013;40(10):1311-3. 査読なし
  37. Hata T, Sakata N, Okada T, Aoki T, Motoi F, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Dilated papilla with mucin extrusion is a potential predictor of acute pancreatitis associated with intraductal papillary mucinous neoplasms of pancreas. *Pancreatology*. 2013;13(6):615-20. doi: 10.1016/j.pan.2013.09.003. 査読あり
  38. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Aoki T, Mizuma M, Motoi F, Katayose Y, Kodama T, Egawa S, Unno M. Imaging of transplanted islets by positron emission tomography, magnetic resonance imaging, and ultrasonography. *Islets*. 2013;5(5):179-87. Review. doi: 10.4161/isl.26980. 査読あり
  39. Hata T, Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hayashi H, Motoi F, Goto M, Katayose Y, Egawa S, Unno M.

Postoperative cholestasis and cholangitis after total pancreatectomy with biliary reconstruction impair the function of autotransplanted islets. Transplantation. 2013;96(5):e40-3. doi: 10.1097/TP.0b013e3182a049bb. 査読あり

40. Sakata N, Goto M, Motoi F, Hayashi H, Nakagawa K, Mizuma M, Yamaya H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Sawada S, Ottomo S, Okada T, Fukase K, Yoshida H, Ito T, Hirota M, Ishigaki Y, Sekiguchi S, Rikiyama T, Katayose Y, Fujimori K, Egawa S, Shimosegawa T, Katagiri H, Satomi S, Unno M. Clinical experiences in the treatment of pancreatic arteriovenous malformation by total pancreatectomy with islet autotransplantation. Transplantation. 2013;96(5):e38-40. doi: 10.1097/TP.0b013e3182a01333. 査読あり
41. Takikawa T, Kanno A, Masamune A, Hamada S, Nakano E, Miura S, Ariga H, Unno J, Kume K, Kikuta K, Hirota M, Yoshida H, Katayose Y, Unno M, Shimosegawa T. Pancreatic duct drainage using EUS-guided rendezvous technique for stenotic pancreaticojejunostomy. World J Gastroenterol. 2013;19(31):5182-6. doi: 10.3748/wjg.v19.i31.5182. 査読あり

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片寄 友 (KATAYOSE, Yu)  
東北大学・医学(系)研究科(研究院)・  
大学院非常勤講師  
研究者番号: 2 0 3 0 2 1 5 1

### (2) 研究分担者

中川 圭 (NAKAGAWA, Kei)  
東北大学・医学(系)研究科(研究院)・  
講師  
研究者番号: 2 0 5 4 2 2 9 4

力山 敏樹 (RIKIYAMA, Toshiki)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 8 0 3 4 3 0 6 0