

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670591

研究課題名(和文) 膵癌微小環境を標的とした膵癌転移に対する治療法の開発

研究課題名(英文) The development of the therapy for metastatic pancreatic cancer targeting its microenvironment.

研究代表者

山並 秀章 (Yamanami, Hideaki)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん幹細胞研究部・共同研究員

研究者番号：70270840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌間質(微小環境)は癌の進展に密接に関与していることが知られている。Periostinは癌間質で発現し、膵癌の進展に関する重要な分子であることが示唆されている。Pdx1-cre; K-ras LSL-G12D; Periostin+/+に比べ、Pdx1-cre; K-ras LSL-G12D; Periostin-/-はPanINの形成が遅延していたことから、癌間質に発現するPeriostinの膵癌発症への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer stroma (microenvironment) is shown to be involved in pancreatic cancer development. Periostin, which is expressed in stroma, is suggested to be an important molecule related to pancreatic cancer progression. To assess the possibility of development of the effective therapy for pancreatic cancer by targeting Periostin, we compared the pancreatic tissues derived from Pdx1-cre; K-ras G12D; Periostin+/+ with Pdx1-cre; K-ras G12D; Periostin-/- mice. PanIN formation was delayed in Periostin-/- compared to Periostin+/+ mice, suggesting that Periostin is involved in pancreatic carcinogenesis and might be therapeutic target.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 微小環境 ペリオスチン

1. 研究開始当初の背景

Periostin は osteoblastic factor として同定され、骨、歯牙、血管形成に重要な役割を果たす分泌蛋白であり、TGF β や BMP2 に誘導され、細胞接着や増殖に重要な役割を果たしている。マイクロアレイによる網羅的解析によって正常膵組織にくらべ膵癌組織に特異的に強く発現する分子として Periostin が抽出されてから、この分子の膵癌における役割が注目されるようになった

実際の膵癌組織における発現を in situ hybridization、免疫染色、Microdissection を行った組織より抽出した RNA を用いた RT-PCR などの手法により検索してみると、Periostin の発現は癌細胞ではなく、癌周囲の間質細胞、特に Pancreatic stellate cell (膵星細胞、PSC) に強く発現していることが明らかになった。Periostin は膵癌と共培養した PSC で発現が上昇する。つまり、癌細胞から発するシグナルに呼応する形で PSC から分泌される。さらに、本研究分担者らの報告から高濃度の Periostin を膵癌細胞に投与すると、膵癌細胞は EMT を生じ浸潤能が高まることが明らかになった (Int J Cancer 2008)。これらのことから、Periostin は癌間質で発現し、膵癌の進展に関与する重要な分子であることが示唆されている。

一方、Periostin が乳癌原発巣周囲と肺転移巣の筋線維芽細胞に強く発現し、Periostin KO マウスと MMTV-PyMT 自然肺転移乳癌マウスを交配させたマウスでは肺転移が著しく減少することが示された (Nature 2011)。さらに、Periostin KO マウスとの交配で生じた原発部位より CD90 で分離した癌幹細胞分画は sphere 形成能が消失していることが示され、Periostin は癌間質で発現し癌幹細胞の性質を維持する分子であることが強く示唆されている。従って、膵癌間質で発現する Periostin を治療標的とすれば膵癌幹細胞にも効果が及ぶことが強く想定され

る。

2. 研究の目的

研究期間内に以下のことを明らかにするを目的とした。

1) 遺伝子改変膵癌マウス Pdx1-cre; K-ras^{G12D} (膵特異的 K-ras 活性型変異発現マウス) と Periostin^{-/-} マウスを交配させ、Periostin の発現がない背景膵で膵癌を作製する。同様に Pdx1-cre; K-ras^{G12D} Periostin^{+/+}、Periostin^{+/-} マウスとも交配させ、Periostin の発現が膵癌化に与える影響を検討する。

2) 遺伝子改変膵癌転移マウス Pdx1-cre; K-ras^{G12D}; p53^{R172H} マウスと Periostin^{-/-} マウスと交配させ、同様に交配させた Periostin^{+/+}、Periostin^{+/-} マウスと比較することによって Periostin の発現が膵癌転移にどのような影響をもたらすのか解析する。

3) Periostin の発現消失によって生じる癌間質相互作用の変化を網羅的遺伝子解析にて明らかにする。

3. 研究の方法

1) Periostin 発現の消失した膵癌形成マウス (Pdx-1-Kras 変異マウス、Pdx1-cre; K-ras^{G12D} マウス) を作製し、Periostin の膵癌化における役割を検討する ; 2) Periostin 発現のない膵癌転移マウス (pdx1-K-ras 変異-p53 変異マウス、Pdx1-cre; K-ras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H} マウス) を作製し、微小環境でのペリオスチン発現消失によって膵癌転移が抑制されるか否かを検討する ; 3) 膵癌マウスから、膵癌幹細胞分画が濃縮されることがいわれている CD44⁺C-MET⁺細胞を分離し、Periostin リコンビナントタンパク投与の sphere 形成能への影響と PSC に shRNA を導入し Periostin 発現を消失させ共培養することによって、Periostin の膵癌幹細胞形質維持への関与を確認する。

4. 研究成果

1) Pdx1-cre; K-ras^{LSL-G12D}; Periostin+/+に比べ、Pdx1-cre; K-ras^{LSL-G12D}; Periostin-/-はPanINの形成時期が遅延していた(図1 a,b)。

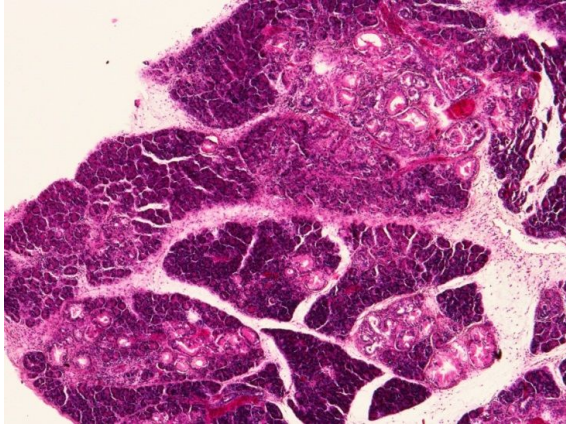


図1a Pdx1-cre; K-ras^{LSL-G12D}; Periostin+/+ 生後8w、PanINの形成が広汎にみられる。

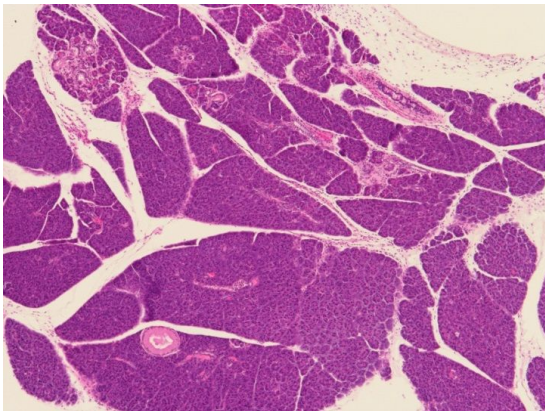


図1b、Pdx1-cre; K-ras^{LSL-G12D}; Periostin-/- 生後8w、PanINの形成が少ない。

2) Pdx1-cre; K-ras^{LSL-G12D}; Periostin+/+にセルレインを投与した群では、早い例では生後12Wのマウスにも膵癌の形成がみられ、セルレイン投与による膵癌化の促進効果が確認された。一方、Pdx1-cre; K-ras^{LSL-G12D}; Periostin-/-にセルレインを投与すると生後24Wの観察期間までは膵癌の形成は認められなかった。しかし、両群とも例数が少ないため、今後のさらなる検討が必要である。

3) Pdx1-cre; K-ras^{LSL-G12D} マウスに形成された膵癌より、癌細胞と cancer associated

fibroblast (CAF)の細胞株を樹立した。癌細胞株を Periostin-/-マウスと Periostin+/+の膵に同所移植し、現在転移数の差異を検討中である。

まだ例数の少ない状態で結論を得ていないが、現在までの検討では、Pdx1-cre; K-ras^{LSL-G12D} Periostin-/-では、Pdx1-cre; K-ras^{LSL-G12D} Periostin+/+に比べ膵の癌化が遅延しており、これはセルレインによって炎症を惹起しても同様であった。つまり、膵の癌化過程にも Periostin が関与している可能性が高いことが示された。近年、膵癌間質が膵癌化や進展に対して促進的に機能すると考えられていたが、ごく最近の報告では抑制的機能する可能性が示唆されている。間質の膵癌癌化・進展への関与を明らかにするためにも、膵癌間質において非常に強い発現を示す Periostin の機能を詳細に解明することが必要と考えられる。低濃度の Periostin は膵癌の EMT に対して抑制的な働きを示している。

このことから、通常状態では Periostin は癌進展に対して障壁として機能している可能性も否定できない。今後も検討を継続し、これらの点について明らかにしていきたい。

一方、Pdx1-cre; K-ras^{LSL-G12D} Periostin+/+にセルレインによって膵炎を誘導した後に、形成した膵癌より樹立した膵癌細胞株をマウス膵に同所移植をすると、早い時期から肝転移を示すことが明らかとなった。Pdx1-cre; K-ras^{G12D}; p53^{R172H}に形成した膵癌より樹立した膵癌細胞株より悪性度が高いことから、その機序について検討が必要である。

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 2件)

- 1) Hamada S, Masamune A, Miura S, Satoh K, Shimosegawa T. MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX. Cell Signal. 26: 179-85, 2014. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.003.
- 2) Abue M, Yokoyama M, Shibuya R, Tamai K, Yamaguchi K, Sato I, Tanaka N, Hamada S, Shimosegawa T, Sugamura K, Satoh K. Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer. Int J Oncol. 46 (2): 539-47, 2015. doi: 10.3892/ijo.2014.2743.

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

山並 秀章 (YAMANAMI, Hideaki)
地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん幹細胞研究部・特任研究員
研究者番号：70270840

(2) 研究分担者

佐藤 賢一 (SATO, Kennichi)
地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん幹細胞研究部・部長
研究者番号：10282055