

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670594

研究課題名(和文) 循環癌細胞から見た膵癌の上皮間葉転換(EMT)の制御と治療への応用

研究課題名(英文) Regulation of epithelial-mesenchymal transition and application to new treatment for pancreatic cancer

研究代表者

海野 倫明(Unno, Michiaki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70282043

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)：膵癌の治療成績は極めて不良で、高率に遠隔転移再発を来す。この遠隔転移には上皮間葉転換(EMT)が関与していると考えられており、EMTの制御が可能かどうかを、Wnt signalの観点より検討した。膵癌細胞株Panc-1にWnt signalを抑制することで、Reverse EMTが起こることを示した。さらにReverse EMTを起こした細胞では抗癌剤感受性が上昇していることを明らかにした。以上の結果より、癌細胞におけるEMTと抗癌剤は感受性は密接に関係していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Outcome of pancreatic cancer is very miserable due to the recurrence of distant metastasis. The distant metastases were associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT). In this study, we examined the relationship between Wnt signal and EMT, and also relationship if EMT and sensitivity of anti-cancer drug.

When Wnt signal was inhibited by introducing SiRNA of LRRFIP1 into pancreatic cancer cell line Panc-1, we showed that reverse EMT was observed. Moreover, we revealed that the sensitivity of anti-cancer drug was increased in this situation. Therefore, we indicated that there was a strong relationship between the EMT and sensitivity for anti-cancer drugs in pancreatic cancer cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 上皮間葉転換 抗癌剤感受性 Wnt signal

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は消化器癌の中でも治療成績のきわめて不良な癌腫である。その生物学的悪性度より比較的小さな癌からも微小転移を生じ、外科的治療切除後に再発をきたすことも少なくない。切除不能・再発膵癌には抗癌剤による化学療法が行われるが、現在第一選択である Gemcitabine でもその奏効率は約 10% と低く、膵癌における抗癌剤耐性メカニズムを解明することは急務である。

膵癌の特徴の一つに、膵癌組織の 80% が間質で構成されていることがあげられる。近年、癌微小環境の観点から膵癌間質に関する研究が注目され、膵癌細胞と、膵癌間質の大部分を構成する Pancreatic stellate cell の相互作用が癌細胞の進展過程にきわめて重要であることが明らかにされつつある。これまでにわれわれは、膵癌切除組織検体より Pancreatic stellate cell を分離、初代培養する系を作成した。共培養系などにより癌細胞と間質細胞との相互作用の研究を行うなかで、これらの初代培養した Pancreatic stellate cell と膵癌培養細胞を免疫不全マウス皮下に共移植し、in vivo xenograft モデルを作製することに成功した。Co-injection モデルでは癌細胞単独と比較し、腫瘍の増殖スピードが速くなることから、癌細胞と癌間質細胞との相互作用の検証に適した実験モデルと考えられた。

癌組織では腫瘍細胞が急速に増大するのに比較し、腫瘍内部の血管形成速度は遅く、また未熟な腫瘍血管はその脆弱性より腫瘍組織に低酸素領域が生じるとされる。また、癌間質中の Cancer associated fibroblast は Extracellular matrix (ECM) を多量に分泌し、癌細胞の増殖、浸潤を刺激するほか、微小環境における循環不全をもたらす。Drug delivery の観点から抗癌剤感受性に深く関与する。低酸素環境下では、転写因子 hypoxia-inducible factor: HIF が誘導され、さまざまなターゲット遺伝子の発現を制御することで環境への順応をはかるとされるが、癌においては癌細胞の浸潤転移を促進するほか、薬剤耐性にも深く関与する。HIF は上皮間葉転換 (EMT) を制御する転写因子 TWIST の発現を誘導するほか、TGF- $\beta$  と協調して SMAD 経路を活性化するなど、さまざまな経路を介して EMT を起こす。また、薬剤感受性に関して、HIF-1 が活性化することで薬剤の細胞外排出に関わる multi drug resistant protein 1 (MDR1) の発現が誘導されることや、細胞周期が p27Kip1 依存的に静止期に留まることで細胞増殖依存的な薬剤に対する抵抗性を獲得することなどが報告されている。

本研究では、膵癌組織中の間質組織における低酸素環境、とくに HIF1 の活性化状態を検討するとともに、Pancreatic stellate cell における HIF の発現、その活性化が膵癌細胞

の増殖能、浸潤能、さらにその薬剤耐性獲得のメカニズムにどのように関与するかを明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌における Pancreatic stellate cell を、低酸素環境の観点からその性質を明らかにするとともに、HIF 活性化の制御を行うことで、癌細胞との相互作用、とくに癌細胞の薬剤耐性にどのような影響を与えるのかについて検討することにある。本研究では、臨床検体を用いて解析を行うことで、その抗癌剤による治療成績、生存期間など生命予後への関連まで明らかにする。

- (1) 臨床検体、患者から切除した膵癌組織での間質細胞における HIF 発現の検討と、臨床情報との対比
- (2) 膵癌組織からの Pancreatic stellate cell の分離、培養
- (3) 分離した Pancreatic stellate cell と膵癌培養細胞の共培養系における低酸素環境と薬剤感受性
- (4) Pancreatic stellate cell と膵癌細胞の共移植 xenograft モデルにおける in vivo 薬剤感受性の検討

## 3. 研究の方法

臨床検体を対象とした検討と、臨床検体からの Pancreatic stellate cell の分離・培養、およびこれらの細胞を使用して膵癌培養細胞の共培養などを行い、in vitro での解析を行う。

### (1) 膵癌切除標本での、癌間質組織中の低酸素環境、HIF-1 の活性化状態の検討

膵癌にて、本研究に同意いただいた患者を対象として、手術での摘出標本を研究試料として膵癌組織サンプルを採取し、膵癌組織中の低酸素環境について、低酸素マーカー 2-nitroimidazole による免疫組織化学を行う。本手法を用いることで、細胞レベルで正確に酸素勾配を測定、低酸素環境を組織内で評価できると考えられる。

また、免疫組織化学により HIF-1 の発現について検討を試みる。術前化学療法の施行されている検体では、臨床上的抗癌剤の効果との対比が可能となるほか、生存期間など治療成績、予後との相関の有無についても検討を行う。

### (2) 膵癌切除標本からの Pancreatic stellate cell の分離・培養、および膵癌培養細胞との共培養系での薬剤感受性の検討

膵癌組織からの Pancreatic stellate cell の分離には、Bachem らによって報告された Outgrowth method を用いて行う (Bachem MG, et al. Gastroenterology 2005)。我々は、本手法により Pancreatic stellate cell の

分離を行い、 $\alpha$ -SMA の発現など、その活性化を確認している。分離した細胞の初代培養系を用いて in vitro でさまざまな研究を行う。分離した Pancreatic stellate cell を 1% 酸素濃度など低酸素環境下で培養し、細胞内での HIF-1 の発現を検討するほか、VEGF や IGF など HIF-1 のターゲットとされる遺伝子の発現変化を検討する。さらに低酸素環境下培養時の Conditioned medium も採取し、培養癌細胞などへの添加によりその癌の増殖への効果、あるいは薬剤感受性への影響について検討を行う。

また膵癌培養細胞との共培養を、通常環境下および低酸素環境下で行い、腫瘍細胞の増殖能の変化について Ki-67 染色などを用いておこなうとともに、癌細胞における E-cadherin 発現の変化、invasion assay、migration assay などによる浸潤能移動能の評価を行う。さらに MTT assay などにより、各種薬剤への感受性の変化について検討を行う。

### (3) Pancreatic stellate cell と膵癌細胞株の免疫不全マウス皮下共移植モデルにおける検討

われわれの研究グループはこれまでに、Pancreatic stellate cell の分離同定し、さらに膵癌細胞株との共移植モデルの作成に成功している。Pancreatic stellate cell との共移植モデルでは、癌細胞を単独で皮下移植するのと比較し、腫瘍の増殖が早くなることが示されており、Pancreatic stellate cell と癌細胞との相互作用の検討に適した実験系であると考えられる。

本研究課題では、膵癌間質組織での低酸素環境の抗癌剤感受性に与える影響を検討することを目的としている。移植した Pancreatic stellate cell での HIF の活性化の状態が、共移植モデルでの腫瘍の抗癌

剤感受性にどのような影響を与えるか検討を行うとともに、siRNA の手法により Pancreatic stellate cell での HIF の活性を knock down した場合、腫瘍の抗癌剤感受性がどのように変化するか検討を行いたい。

また、抗癌剤の感受性の検討では、膵癌の実臨床で投与される Gemcitabine や 5-FU といった抗癌剤のほか、癌関連間質組織への効果が示唆されるタキサン系の抗癌剤、さらには増殖因子受容体阻害薬などの分子標的阻害薬についても、その効果について検討を行う。

### (4) 既存の膵癌細胞株を用い、EMT を制御した際の抗癌剤感受性の検討

抗癌剤 gemcitabine に耐性を有する Panc-1 細胞株を使用し、この細胞に、Wnt signal の activator である LRRFIP1 の発現を siRNA の手法で制御することで、EMT の状態が変化するかどうかを検討する。さらに、その際に抗

癌剤感受性が変化するかどうか、を検討しその分子機序に迫る。

## 4. 研究成果

臨床検体を用いた検討に関しては、現在も症例を集積している最中であり、今後もこの研究を継続する予定である。

膵癌細胞株 Panc-1 を用いた検討により、膵癌細胞株における EMT の制御と抗がん剤感受性について興味ある知見が得られたので報告する。

Wnt signal の activator である LRRFIP1 の発現を siRNA の手法で抑制することで、E-cadherin など上皮系のマーカーが上昇、Reverse EMT が起こることが示された(Douchi D, Unno M, et al. Cancer Letters. 2015)。さらに、これらの Reverse EMT を起こした細胞で抗がん剤感受性の変化について検討を行ったところ、gemcitabine 添加時に apoptosis の誘導が促進され、gemcitabine 感受性が上昇することが示された。さらにそのメカニズムとして gemcitabine 添加時の細胞内で JNK/c-Jun の活性化が関与していることが示唆された。

以上の結果より、癌細胞における EMT は抗がん剤感受性に深く関与していること、さらにその制御は抗がん剤による抗腫瘍効果を増強する可能性が示唆された。本研究期間内に腫瘍循環細胞の解析までは至らなかったが、EMT の制御による薬剤耐性克服への足がかりとなる成果が得られたと考えている。

## 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 1 件)

1. Silencing of LRRFIP1 reverses the epithelial-mesenchymal transition via inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

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.

Cancer Lett. 2015 Aug 28;365(1):132-40. doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.023. Epub 2015 Jun 3.

(査読あり)

[学会発表](計 2 件)

1. Silencing LRRFIP1 reverses epithelial-mesenchymal transition through inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

Daisuke Douchi, Hideo Ohtsuka, Kyohei Ariake, Shuhei Kawasaki, Kei Kawaguchi, Kunihiro Masuda, Koji Fukase, Fuyuhiko

Motoi, Takeshi Naitoh, Yu Katayose, Shinichi Egawa, Michiaki Unno (Division of Gastroenterological Surgery, The University of Tohoku, Miyagi, Japan) LRRFIP1 の発現抑制は Wnt/ -カテニン経路を抑制することにより Reversing EMT を起こす(英語発表)

堂地 大輔, 大塚 英郎, 有明 恭平, 川崎 修平, 川口 桂, 益田 邦洋, 深瀬 耕二, 元井 冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 江川 新一, 海野 倫明

第 73 回日本癌学会総会 2014 年 9 月 26 日、  
於：パシフィコ横浜（横浜市）

2. MK2461 regulated proliferation of pancreatic cancer disrupting interaction between pancreatic cancer cell and CAF  
Koetsu Inoue, Hideo Ohtsuka, Koji Fukase, Kunihiro Masuda, Kei Kawaguchi, Hiroshi Yoshida, Fuyuhiko Motoi, Takeshi Naitoh, Yu Katayose, Shinichi Egawa, Masanori Tachikawa, Tetsuya Terasaki, Michiaki Unno

(Department of Surgery, Tohoku University, Division of Integrated Surgery and Oncology, Tohoku University, International Research Institute of Disaster Science, Tohoku University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

MK2461 は膵癌細胞と癌関連線維芽細胞の相互作用を制御し膵癌 増殖を抑制する（英語発表）

井上 亨悦, 大塚 英郎, 深瀬 耕二, 益田 邦洋, 川口 桂, 吉田 寛, 元井 冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 江川 新一, 立川 正憲, 寺崎 哲也, 海野 倫明

第 73 回日本癌学会総会 2014 年 9 月 26 日、  
於：パシフィコ横浜（横浜市）

〔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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海野倫明 (UNNO MICHIAKI)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：70282043

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大塚 英郎 (OHTSUKA HIDEO)  
東北大学病院・肝胆膵外科・助教  
研究者番号：50451563

有明 恭平 (ARIAKE KYOHEI)  
東北大学病院・肝胆膵外科・助教  
研究者番号：10754921

(4) 研究協力者

堂地 大輔 (DOUCHI DAISUKE)  
東北大学大学院生