

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 2日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591775

研究課題名（和文）膵癌遠隔転移における間葉系幹細胞(MSC)の役割の解明とその臨床的意義の検討

研究課題名（英文）The impact and clinical significance of mesenchymal stem cell in the process of metastasis in pancreatic cancer.

研究代表者

上田 純二 (UEDA JUNJI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90529801

研究成果の概要（和文）：

ある特定の間葉系幹細胞マーカーを発現する膵星細胞が膵癌遠隔転移の初期段階で、膵癌細胞の遊走、浸潤などを促進することを明らかにした。また癌細胞が間質細胞を刺激して自己にとって都合のよい周囲微小環境を構築していることが示唆された。癌と間葉系幹細胞マーカーを発現する膵星細胞の相互作用に関与する分子を抑制することで癌の悪性度を制御することができた。

研究成果の概要（英文）：

We clarified that pancreatic stellate cells expressing mesenchymal stem cell marker enhanced the invasion and migration of pancreatic cancer cell in the cancer initiation and metastasis. Pancreatic cancer cells construct useful niche by which they stimulate the stromal cells. Inhibition of the molecules which are involved with the interaction between cancer cells and pancreatic stellate cells expressing mesenchymal stem cell marker controls pancreatic cancer progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓外科学、膵癌、EMT、miRNA、Redox

## 1. 研究開始当初の背景

他の消化器癌などでの飛躍的な治療法の改善とは対照的に、膵癌はここ30年以上ほとんど生存率の改善が見られない取り残された癌腫である。その主要な原因の一つとして抗がん剤や放射線に対する治療抵抗性が挙げられる。膵癌の特徴である desmoplasia が治療抵抗性に強く関与していることが示されてきたが、その起源となる細胞集団および機序については明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

膵癌における desmoplasia を誘導する間葉系幹細胞(MSC)を prospective に同定し、その細胞集団と癌細胞との相互作用を含めた生物学的特徴を明らかにする。特に予後に直結する治療抵抗性と遠隔転移形成機序に焦点を当てて膵癌根治を目指した治療法を開発する。

## 3. 研究の方法

1)MSCの純化と新規MSCマーカーの同定  
CD10,CD105,CD133,CD271などを候補として

新規のマーカーとなりうる表面抗原を同定する。

## 2)MSCによる膵癌治療抵抗性や転移・浸潤・EMTへの関与

純化したMSCが抗癌剤耐性、放射線耐性などの治療抵抗性や、固形癌特有の特徴である浸潤、転移能、EMTなどへどのような影響をもつか検討する。またこれらの能力に関連する分子発現を検討する。

## 3)癌細胞と純化したMSCの相互作用関連分子の同定

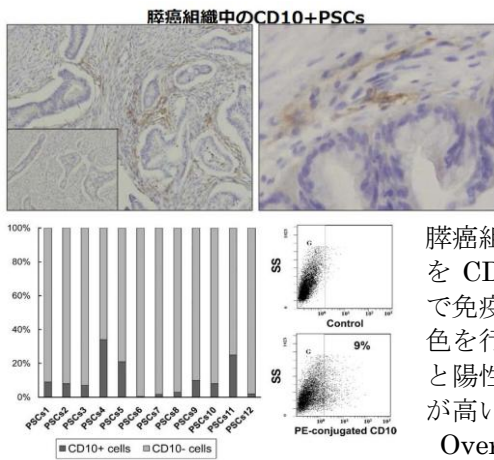
Desmoplasiaや癌・ニッチ相互作用に関わる分子を同定するために、間葉系幹細胞との直接共培養状態から双方の細胞を分取し、単培養あるいは間接共培養状態と比較して変化する細胞活性や遺伝子・蛋白発現について解析する。

## 4)MSCを標的とした治療法および癌細胞ニッチ相互作用を標的とした治療法の開発

マイクロアレイによる網羅的な解析からMSCに特異的に発現する分子を同定し、レトロウイルスに組み込むshRNAを作成する。このshRNAの導入により治療実験を*in vitro*、*in vivo*において行う。

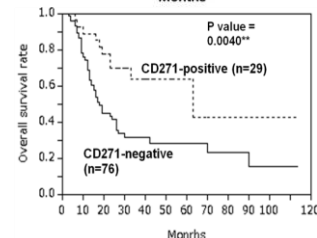
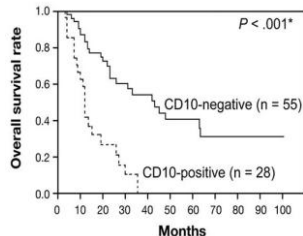
## 4. 研究成果

### 1)MSCの純化と新規MSCマーカーの同定



Survivalは悪く(右上図)、膵癌細胞の近傍でCD10陽性膵星細胞が多くみられた(上図)。また12種類の膵星細胞においてフ

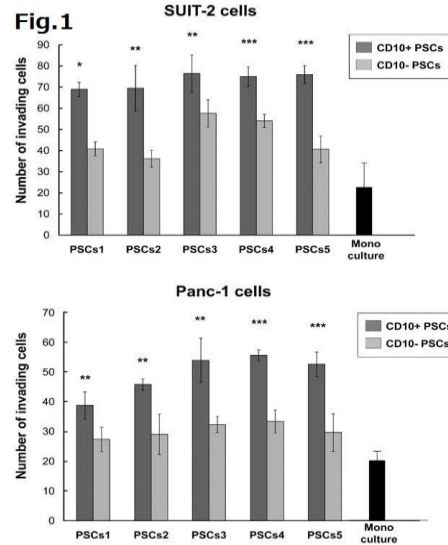
ローサイトメトリでCD10の発現を確認したとこと0.4~34%とわずかな細胞集団で発



現が確認され、MSCのマーカーの一つである可能性が示唆された。このことからCD10+PSCsは、膵癌細胞のニッチ形成に重要な役割をもつことが示唆された。CD271では、膵癌組織の浸潤部から離れた位置で高発現しており、CD271陽性率が高いほど予後は良好であった(右下図)。一方CD105は予後との関連は認められなかった。

## 2)MSCによる膵癌治療抵抗性や転移・浸潤・EMTへの関与

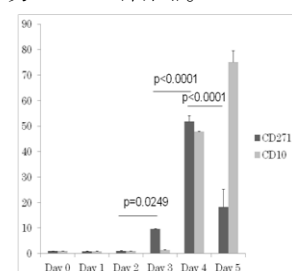
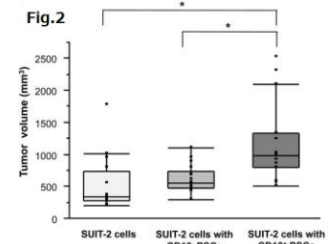
間接共培養実験において、CD10+PSCsはCD10-PSCsと比べて膵癌細胞の浸潤を促進した(Fig.1)。また、CD10+PSCsを膵癌細胞と異所共移植を行うとCD10-PSCsよりも有意に腫瘍体積が大きかった(Fig.2)。*in*



*in vitro*, *in vivo*の両面でCD10+PSCsは膵癌の悪性度を高めるMSCの可能性であることが示唆された。

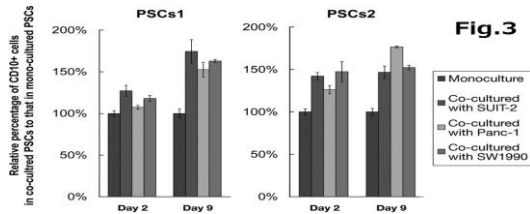
CD105は膵癌細胞の一部で発現がみられ、癌間質相互作用によってmigrationが亢進するが予後で有意差が出なかった。またPSCsでの発現レベルが低くsortingは困難を極めた。CD271は癌細胞との共培養では初期段階で高発現するが、時間とともに発現が低下することが分かった。CD10は癌との共培養で高発現が持続することが分かった(右図)。また

CD271高発現群で予後が良好であり、膵癌のinitiationの段階で癌の成立を抑制するMSCのマ



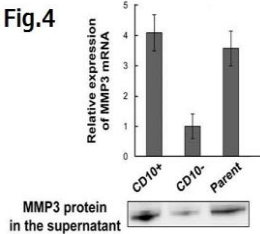
カーである可能性が示された。

### 3) 癌細胞と純化した MSC の相互作用関連分子の同定



CD133 陽性膵癌細胞は膵星細胞との間接共培養において遊走能が有意に亢進することが分かり報告した (Moriyama T. Cancer, 2010)。MSC の候補となる CD10+PSCs が癌細胞との共培養で癌間質相互作用を受けてどのような変化をきたすか検討した。CD10+PSCs は膵癌細胞株との共培養下で約 1.5 倍に割合が増え (Fig.3)、膵癌細胞が何らかの因子を介して自己の浸潤・転移に都合のいいように周囲微小環境を構築している可能性が示唆された。

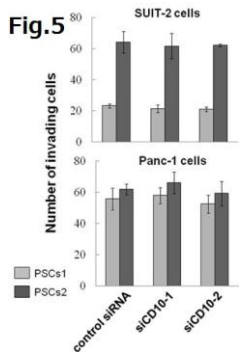
Fig.4



この現象は、間接共培養下において免疫化学組織染色検査で見られた、癌細胞の周囲に主に CD10+PSCs が存在している所見と合致しており、間質標的治療の可能性を広げるものと考えられる。一方で、同定した CD10+PSCs は MMP3 の分泌が豊富 (Fig.4) でこれが膵癌の浸潤促進に関与していると考えられた。

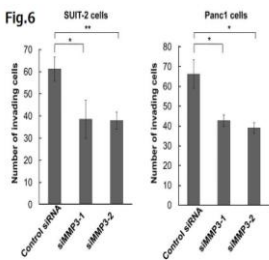
### 4) MSC を標的とした治療法および癌細胞ニッチ相互作用を標的とした治療法の開発

Fig.5

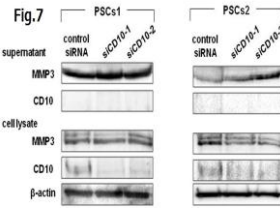


CD10 を標的とした治療が可能か siCD10 を用いて検討した。PSCs に siCD10 を導入し複数の癌細胞株と共培養を行った結果、明らかな浸潤の抑制効果は見られなかった (Fig.5)。しかし、

Fig.6



CD10+PSCs で多く分泌される MMP3 をノックダウンすると癌の浸潤が有意に抑えられた (Fig.6)。また、CD10 をノックダウンしても



MMP3 の発現は抑制されず (Fig.7)、あくまでも MSC のマーカーである可能性が示された

だけで治療標的とはなりにくいと考えられた。

### 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 2 件)

1. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Cui L, Kayashima T, Morimatsu K, Moriyama T, Nakata K, Fujita H and Tanaka M, CD10+ pancreatic stellate cells enhance the progression of the pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 139, 1041-1051, 2010
2. Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Cui L, Ikenaga N, Sato N and Tanaka M, Enhanced cell migration and invasion of CD133+ pancreatic cancer cells cocultured with pancreatic stromal cells. *Cancer*, 116, 3357-3368, 2010

[学会発表] (計 4 件)

1. Ikenaga N, CD10+ pancreatic stellate cells enhance the progression of the pancreatic cancer, 42nd Annual Meeting of the American Pancreatic Association 2011, Chicago, USA
2. Fujiwara K, et al. The CD271 positive rate of pancreatic stellate cells is correlated with their migration activities enhanced by co-cultured pancreatic cancer cells. 3<sup>rd</sup> Biennial Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association Congress 2011, Melbourne, Australia
3. Fujiwara K, et al. Pancreatic Stellate Cells Promote Migration of CD105+ Pancreatic Cancer Cells. 42<sup>nd</sup> American Pancreatic Association (APA) Annual Meeting, 2011, Chicago, USA
4. 池永直樹、大内田研宙、水元一博、田中雅夫、CD10陽性膵星細胞は膵癌の進展を促進する。第110回日本外科学会 2010年 4月8日名古屋

[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

上田 純二 (UEDA JUNJI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 90529801

### (2)研究分担者

江上 拓哉 (EGAMI TAKUYA)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究員

研究者番号: 40507787

田中 雅夫 (TANAKA MASAO)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 30163570

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 20452708

### (3)連携研究者

なし