

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390318

研究課題名(和文) 膵癌浸潤を先導するリーディングセルの解明：第3の浸潤機構に基づく癌治療の新展開

研究課題名(英文) Identifying the leading cell for the invasion of pancreatic cancer

研究代表者

田中 雅夫 (TANAKA, Masao)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30163570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌浸潤を先導するリーディングセルを同定するために、膵癌細胞と過剰な間質増生の形成主体である膵星細胞の細胞外基質取り込み能に着目した。膵星細胞では98.5%、2種類の膵癌細胞株では14.4%、36.2%の細胞が基質を取り込んでいた。膵癌細胞に上皮間葉移行を誘導すると基質取り込み能が増加、コラーゲン結合膜蛋白の一つであるEndo180の発現抑制で基質の取り込み能が減弱することを明らかにした。膵癌細胞と膵星細胞の三次元共培養浸潤アッセイを行うと、膵癌細胞の浸潤に先立って膵星細胞がコラーゲン内を浸潤することが明らかとなり、膵癌浸潤におけるリーディングセルは膵星細胞であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the ability of collagen internalization in pancreatic stellate cells which play a central role in pancreatic cancer desmoplasia to identify the cell which leads the cancer cell invasion. Pancreatic stellate cells had a strong ability for collagen internalization compared to the cancer cells. 98.5% of stellate cells internalized collagen beads while the proportion of cancer cells were 14.4% and 36.2%. The ability of collagen internalization was increased by inducing epithelial-mesenchymal transition, and decreased when the expression of Endo180, a collagen uptake receptor, was suppressed by RNA interference. Leading cell was the pancreatic stellate cell and cancer cells invaded behind the stellate cell when they were cocultured in the three-dimensional collagen gel culture system. In conclusion, our data suggested that pancreatic stellate cell led the invasion of pancreatic cancer cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 浸潤 上皮間葉移行 膵星細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 他の消化器癌とは対照的に、膵癌はここ 30 年ほとんど生存率の改善が見られない取り残された癌である。外科的切除が唯一の根治的治療法だが、切除可能である症例は 20%で、たとえ根治切除ができてその 5 年生存率はわずか 15%である。膵癌の新規治療法の開発は、社会的要請度・貢献度・緊急性が高い。

(2) 癌細胞は、間葉系細胞の性質を獲得する上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition; EMT)により浸潤・遊走能を亢進させ、周囲間質への浸潤、血管内侵入、遠隔転移へと進展する(Jean et al., Cell, 2009)。EMT を起こした癌細胞は癌幹細胞と類似した性質を持ち(Mani et al., Cell, 2008)、アポトーシスやセネセンスに抵抗性で(Gal et al., Oncogene, 2008; Ansieau et al., Cancer Cell, 2008)、浸潤・転移だけでなく再発や治療抵抗性の原因にもなるため、EMT のメカニズム解明は癌研究における至上命題である。EMT はすべての癌細胞で誘導されるものではなく一時的・局所的なイベントであり(Prall, Histopathology, 2007)、EMT を起こした細胞集団は癌浸潤を先進役になると考えられている。

(3) EMT 細胞の間質浸潤は、細胞外基質 (Extracellular matrix; ECM)の分解と形成されたスペースへの細胞遊走から構成されるが、癌細胞も PSC 同様、エンドサイトーシスによりコラーゲンを細胞内に取り込み分解していることが最近報告され(Quintanilla-Dieck, J Invest Dermatol, 2008)、癌細胞の新たな ECM リモデリング機序の存在を示唆するものとして注目されている。マウスモデルでは EMT を起こしている細胞が、原発巣から脈管内に浸潤する経路を形成し、non-EMT 細胞がその経路を通して遠隔臓器へ移動しているとの報告があるが(Tsujii et al., Cancer Res, 2008)、癌進展の重要プロセスである浸潤初期

における EMT 細胞と non-EMT 細胞の役割分担についてはまだ十分に解明されていない。

(4) 膵癌は、豊富な細胞外基質を伴う過剰な desmoplasia を病理学的な特徴とし、癌間質相互作用が膵癌の高い浸潤能、転移能、治療抵抗性に影響を与える(Bhowmick et al., Nature, 2004)。癌間質に存在する PSC は、種々の液性因子の分泌を介し膵癌細胞の増殖、浸潤、転移を促進するため(Vonlaufen et al., Cancer Res, 2008)、膵癌の悪性形質を誘導する責任細胞として注目されている。

(5) 最近、膵星細胞が膵癌細胞の EMT を誘導していることが報告されたが(Kikuta et al., BBRC, 2010)、そのメカニズムや生体内における意義についてはまだ明らかとなっていない。また PSC 自体も高いクリアランス機能を有しており、癌浸潤を先導する leading cell としての役割を果たしている可能性がある。

2. 研究の目的

膵癌浸潤を先導する細胞集団であるリーディングセルを同定し、リーディングセルの制御による新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

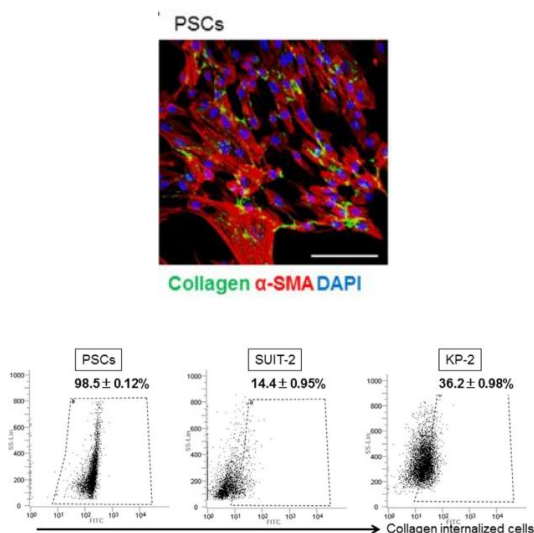
膵癌の浸潤を先導するリーディングセルの基質取り込み能を評価するため、蛍光コラーゲンビーズを用いる。基質取り込みの制御遺伝子を同定し、基質取り込み能と癌細胞の EMT の関連も調べる。リーディングセルの同定には、膵癌細胞と膵星細胞の三次元共培養モデルを用いる。

4. 研究成果

(1) 膵星細胞だけでなく膵癌細胞にも細胞外基質クリアランス能が認められる

フローサイトメトリーで蛍光標識されたコラーゲンビーズを取り込んだ細胞の割合を検討したところ、膵星細胞では約 98.5%の細胞がコラーゲンビーズを取り込んでいた

が、膵癌細胞株 SUI-2 では 14.4%, KP-2 では 36.2%の細胞がビーズをとりこんでいた(下図)。



(2) 膵癌細胞の EMT によって細胞外基質のクリアランス能が増強される

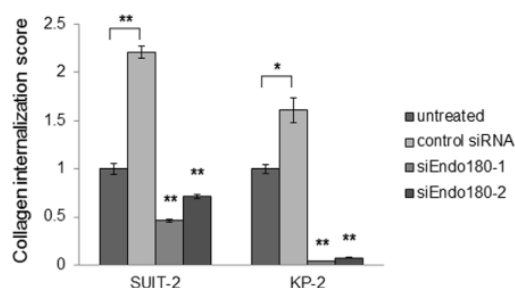
TGF-β 添加によって間葉系形質を誘導した膵癌細胞株では、コラーゲンの取り込み能が増強された。

(3) Endo180 発現は、膵癌細胞の間葉系形質と相関する

当科で保有する膵癌細胞株 10 種類の EMT マーカーである E-cadherin, Vimentin の発現を検討すると、Vimentin の発現とコラーゲン結合膜蛋白をコードする Endo180 遺伝子発現が相関することが明らかとなった。

(4) Endo180 発現の抑制で膵癌細胞の細胞外基質クリアランス能が減弱する

RNA 干渉を用いて膵癌細胞の Endo180 発現を抑制すると、コラーゲンの取り込み能が減弱することが明らかとなった(下図)。



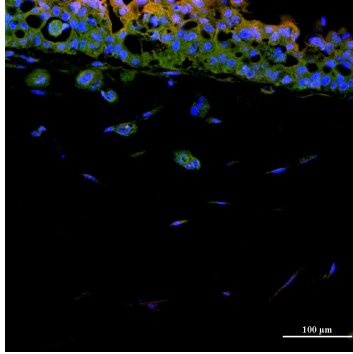
(5) 膵星細胞によって膵癌細胞の細胞外基質クリアランス能が増強される

膵癌細胞と膵星細胞を共培養することで、膵癌細胞のコラーゲン取り込み能が増強されることが明らかとなった。

(6) 三次元共培養モデルで、膵星細胞が膵癌細胞の浸潤を先導する

膵癌におけるリーディングセルを明らかにするために、コラーゲンゲルの上に膵癌細胞株と初代培養膵星細胞を培養する三次元共培養モデルを作製した。癌細胞と膵星細胞の単独培養では、コラーゲンゲルの中に浸潤する細胞を認めなかったが、共培養系では優位にコラーゲンゲルの中に浸潤する細胞が増加した。コラーゲンゲルの HE 染色を行うと、紡錘形の細胞が癌細胞の浸潤を先導している像を認め、膵星細胞が浸潤のリーディングセルと考えられた。活性型膵星細胞のマーカーである α-SMA の蛍光免疫染色も行い、リーディングセルが膵星細胞であることを確認した(下図)。また、膵星細胞が浸潤を先導しているコラーゲンゲルの厚みは有意に増加し、コラーゲンゲルの線維方向が浸潤方向に改変されていることが認められた。

今回の検討で、膵癌の浸潤を先導するリーディングセルの役割を膵星細胞が担っていることが示唆された。リーディングセルである膵星細胞を制御することで、膵癌の浸潤が抑制されることが期待される。



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 4 件)

全て査読有

1. Mizuuchi Y, Aishima S, Ohuchida K, Shindo K, Fujino M, Hattori M, Miyazaki T, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y. Anterior gradient 2 downregulation in a subset of pancreatic ductal adenocarcinoma is a prognostic factor indicative of epithelial-mesenchymal transition. Lab Invest, 2015, 95(2):193-206.
Doi: 10.1038/labinvest.2014.138
2. Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Hashidume M, Tanaka M Pancreatic Cancer: Clinical Significance of Biomarkers Gastrointestinal tumor, 2014; 1:33-40
Doi:10.1159/000354996
3. Ikenga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Akagawa S, Fujiwara K, Eguchi D, Kozono S, Ohtsuka T, Takahata S, Tanaka M Pancreatic cancer cells enhance the ability of collagen internalization during epithelial-mesenchymal transition. PLoS One. 2012;7(7):e4034.

Doi: 10.1371/journal.pone.0040434

4. Ohuchida K, Mizumoto K, Lin C, Yamaguchi H, Ohtsuka T, Sato N, Toma H, Nakamura M, Nagai E, Hashizume M, Tanaka M MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the HOXA1 gene. Ann Surg Oncol. 19(7):2394-2402 2012
Doi: 10.1245/s10434-012-2252-3

[学会発表] (計 4 件)

1. 佐田政史、大内田研宙、堀岡宏平、田中友晴、鄭彪、Cases AI、赤川進、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、大塚隆生、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 膵癌間質の線維配列が癌細胞の形態と浸潤方向に与える影響 第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月
2. 水内祐介、相島慎一、進藤幸治、服部正見、藤野稔、大内田研宙、水元一博、田中雅夫、小田義直 膵癌において Anterior gradient 2 発現低下は予後不良マーカーであり、上皮間葉移行によって引き起こされる 第 72 回日本癌学会総会、横浜、2013 年 10 月
3. Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M Regulation of Pancreatic Stellate cells for Treatment of Pancreatic cancer The 6th International Conference and Commemorative Lecture of Pin-Wen Lin of Pancreatic Cancer Tainan, Taiwan, 2013/6/15
4. Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M Clinical value of molecular analysis for screening, diagnosis, and treatment of

pancreatic cancer the 5th International
Conference for Treatment of Pancreatic
Cancer Tainan, Taiwan, 2012/7/7

〔図書〕(計1件)

1. 佐田政史、水元一博、大内田研宙、大塚隆生、田中雅夫 「Annual Review 2014 消化器」 . 胆膵-膵臓- 9.膵癌の個別化治療を探る p252-257 ,中外医学社、東京、2014年

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 雅夫 (TANAKA Masao)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：30163570

(2)研究分担者

永井 英司 (NAGAI Eishi)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：30264021

大塚 隆生 (OHTSUKA Takao)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20372766

江上 拓哉 (EGAMI Takuya)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：40507787

森山 大樹 (MORIYAMA Taiki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：70586859
(2012~2013年)

富永 洋平 (TOMINAGA Yohei)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：90304823
(2012年)

大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20452708
(2012年、2014年)

白羽根 健吾 (SHIRAHANE Kengo)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10529803
(2012年)

(3)連携研究者

なし