

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(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591015

研究課題名(和文) 膵癌早期診断に有用なMRI造影剤内包ナノ粒子の開発

研究課題名(英文) Development of nanocapsule containing MRI contrast agent effective for early diagnosis of pancreatic cancer

研究代表者

坂井 寛 (SAKAI, Hiroshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：80611665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌細胞に特異的に集積する造影剤内包ナノカプセルを開発し、膵癌の早期診断に有用な新規診断法を開発することを目的とした。まず膵癌細胞に特異的に発現する分子の同定を目指し、表面抗原であるCD74とCD110の発現や機能について解析した。免疫組織化学染色ではCD74およびCD110の発現は正常組織に比べ、膵癌細胞で発現が高かった。また、CD74のノックダウンにより、膵癌細胞の増殖、遊走、浸潤が抑制された。さらに、CD110のノックダウンにより、膵癌細胞の遊走、浸潤が抑制され、トロンボポエチン投与下での増殖も抑制された。CD74やCD110は早期診断のマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to create a new image analysis for early detection of pancreatic cancer, we planned to make a nanocapsule containing contrast medium for MRI which could specifically accumulate for pancreatic cancer cells. First, we aimed to identify specific molecules for pancreatic cancer cells and analyzed about surface proteins, CD74 and CD110. In human tissue samples, immunohistochemistry analysis revealed that expression of CD74 and CD110 in pancreatic cancer cells was stronger than in normal pancreatic ductal cells. Knock down of CD74 decreased proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer cells. In addition, knock down of CD110 decreased migration and invasion, and decreased proliferation of pancreatic cancer cells in the presence of thrombopoietin. CD74 and CD110 could be a diagnostic marker of pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 早期診断 ナノカプセル

1. 研究開始当初の背景

膵癌は我が国における癌死の5位を占め、5年生存率4%と予後不良の疾患である。現在のところ、手術による切除が唯一の根治治療とされるが、早期に局所浸潤や遠隔転移をきたすため、診断時には手術による切除不能である症例が多い。また、放射線治療や化学療法といった集学的治療に抵抗性を示すため、その予後は極めて不良である。そのため、その**治療法・診断法の開発は、社会的要請度・緊急性が高い**。近年、CTやMRIといった画像診断技術の向上により、微細な病変についても描出可能となった。一方、ヒトの膵癌細胞では、正常細胞にKras, p16, p53, Smad4等の遺伝子異常が蓄積するにつれ前癌病変のPanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) が出現し、その段階が進行し、浸潤癌となるという多段階発癌仮説が臨床的にコンセンサスを得ている (Am. J. Surg. Pathol., 2001, Hruban)。このことより、膵癌を前癌病変の段階で診断し得る方法が開発されれば、早期診断/スクリーニング、早期治療が可能となり、膵癌患者の予後の改善に大きく貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、手術切除標本を用いて膵癌細胞に特異的に発現している分子を同定してきた。一方、抗癌剤等の薬剤の内包を可能とした古細菌由来のheat shock protein (Mj285)を用いたナノカプセルの開発に成功した。さらに、このナノカプセルに癌細胞特異的に発現する分子に親和性の高い分子を付加することにより癌細胞選択性をもつ新規ナノカプセルの開発に成功した。これらの技術を用いることにより、膵癌前癌病変細胞に特異的に発現する分子を同定し、この分子に親和性の高い分子をMRI造影剤内包新規ナノカプセルに付加することにより、膵癌の早期診断への新たな画像診断法の開発が可能になると考えた。

3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞の表面マーカーの解析

膵癌細胞に発現する表面マーカーについて、複数ピックアップし、ヒト膵癌切除標本において免疫組織化学染色や定量的RT-PCRで発現を検討する。

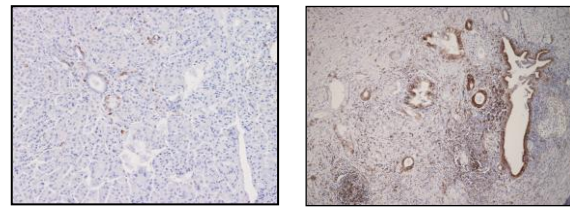
(2) 表面マーカーのノックダウンによる機能的解析

(1)で解析した表面マーカーのノックダウンにより、増殖能実験、遊走能実験、マトリゲル浸潤能の変化を調べ、その表面マーカーが膵癌細胞にどのような機能をもたらしているかを検討する。

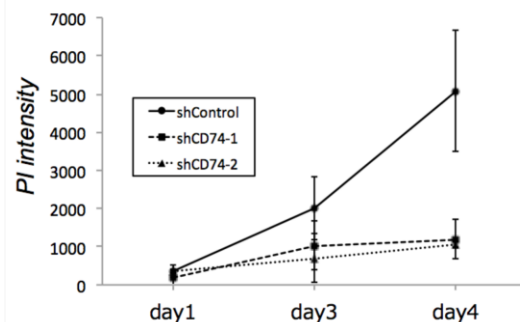
4. 研究成果

(1) 膵癌細胞におけるCD74発現とその機能

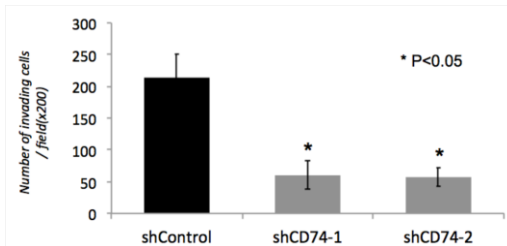
膵癌高転移株におけるマイクロアレイによる遺伝子発現解析で高発現であった表面抗原であるCD74の発現解析を免疫組織化学染色を用いて行ったところ、多くの症例で、膵癌細胞で陽性であり、正常膵では発現は低かった。また、膵癌細胞株においてCD74をノックダウンすると増殖能・遊走能・浸潤能が低下した。膵癌においてCD74は早期診断への新たな画像診断法の標的となる可能性があると思われ、かつ新たな治療標的としても有効である可能性が示唆される。



上左図：正常膵 x200 上右図：膵癌 x100



膵癌細胞の CD74 ノックダウンによる増殖能実験 (上図)

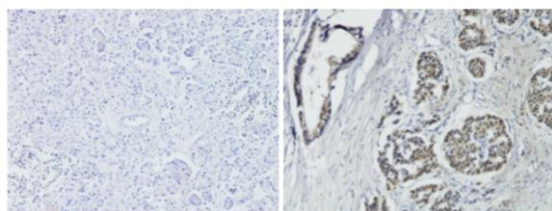


膵癌細胞の CD74 ノックダウンによる浸潤能実験 (上図)

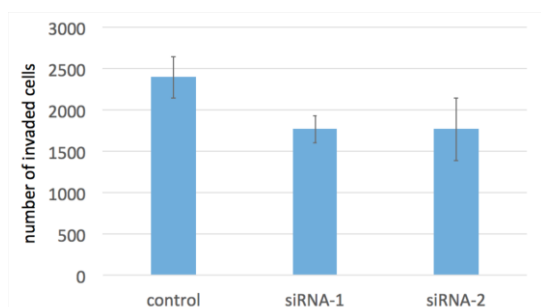
(2) 膵癌細胞におけるCD110発現とその機能

転移癌幹細胞 (metastasis initiating cell) のマーカーとして報告があるCD110に注目し検討を行った。免疫組織化学染色を行い、CD110は半数以上の膵癌で発現を認め、正常膵管には発現しておらず、膵癌に特異性が高かった。また、機能についても検討し、CD110ノックダウンした膵癌細胞株では遊走能・浸潤能が低下することを明らかにした。CD110はトロンボポエチンの受容体としても知られ、CD110ノックダウン群ではトロンボ

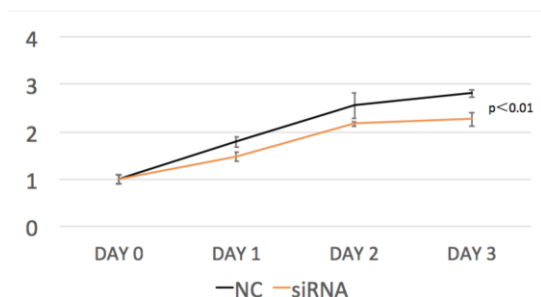
ポエチン投与に対する増殖能が対象群に比べ低下した。CD110 は膵癌で発現していることが多く、早期診断のための分子標的マーカーとなりうること、さらに治療標的としても有用である可能性が示唆された。



上左図：正常膵 x200 上右図：膵癌 x200



膵癌細胞の CD110 ノックダウンによる浸潤能実験 (上図)



トロンボポエチン投与下での膵癌細胞の CD110 ノックダウンによる増殖能実験 (上図)

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 3 件) すべて査読あり

1. Akagawa S, Ohuchida K, Torata N, Hattori M, Eguchi D, Fujiwara K, Kozono S, Cui L, Ikenaga N, Ohtsuka T, Oishima S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M, Peritoneal myofibroblasts at metastatic foci promote dissemination of pancreatic cancer. , *Int J Oncol* , 45: 113-120 , 2014 , DOI: 10.3892/ijo.2014.2391
2. Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Aishima S, Oda Y, Nagai E, Tanaka M , Micro RNA-373 is Down-regulated in Pancreatic Cancer and Inhibits Cancer

Cell Invasion , *Ann Surg Oncol* , 21: S564-S574 , 2014 , DOI: 10.1245/s10434-014-3676-8

3. Fujiwara K, Ohuchida K, Sada S, Horioka K, Ulrich CD 3rd, Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M , CD166/ALCAM expression is characteristic of tumorigenicity and invasive and migratory activities of pancreatic cancer cells , *PLoS ONE* , 9: e107247 , 2014 , DOI: 10.1371/journal.pone.0107247

[学会発表] (計 29 件)

1. Tamura K, Ohtsuka T, Matsunaga T, Date K, Fujimoto T, Kimura H, Watanabe Y, Miyazaki T, Ohuchida K, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M, Assessment of Clonality of Multisegmental Main Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas Based on GNAS Mutation Analysis , 45th Annual Meeting of the American Pancreatic Association (APA) and Japan Pancreas Society (JPS) , 2014/11/5-8 , Hawaii (United States of America)
2. Matsunaga T, Ohtsuka T, Asano K, Fujimoto T, Date K, Kimura H, Watanabe Y, Tamura K, Ohuchida K, Takahata S, Mizumoto K, Guha S, Raimondo M, Tanaka M, A minimally invasive screening test to detect pancreatic ductal adenocarcinoma using biomarkers in the duodenal fluid; an up-to-date reports , 45th Annual Meeting of the American Pancreatic Association (APA) and Japan Pancreas Society (JPS) , 2014/11/5-8 , Hawaii (United States of America)
3. Yang J, Guha S, Matsunaga T, Ohtsuka T, Asano K, Fujimoto T, Date K, Kimura H, Watanabe Y, Tamura K, Ohuchida K, Takahata S, Mizumoto K, Skinner V, Wallace M, Woodward T, Li M, Tanaka M, Raimondo M , NGAL in Pancreatic Juice (PJ) Helps to Discriminate Pancreatic Cancer (PC) Patients from HealthyControls (HC): Report From a Prospective Trial , 45th Annual Meeting of the American Pancreatic Association (APA) and Japan Pancreas Society (JPS) , 2014/11/5-8 , Hawaii (United States of America)
4. Tamura K, Ohtsuka T, Matsunaga T, Date K, Fujimoto T, Kimura H, Watanabe Y, Miyazaki T, Miyasaka Y, Ohuchida K,

- Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M , Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Concomitant with Main Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm: Report of 3 Cases , International Symposium on Pancreas Cancer 2014 , 2014/7/3-5 , Verona(Italy)
5. Tamura K, Ohtsuka T, Ideno N, Matsunaga T, Kimura H, Watanabe Y, Aso T, Ohuchida K, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M , Challenge to Early Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Focused on Surveillance of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN) of the Pancreas , The 100th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology - The 4th International Forum , 2014/4/23-26 , Tokyo(Japan)
 6. Fujiwara K, Ohuchida K, Akagawa S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M , CD166 Expression Characterized Tumorigenicity, and Invasive and Migratory Activities of Pancreatic Cancer Cell Lines , American Pancreatic Association 44th Annual Meeting , 2013/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
 7. Ideno N, Ohtsuka T, Tamura K, Aso T, Ohuchida K, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M , Clinical significance of GNAS mutation for invasive pancreatic carcinoma distinct from/derived from intraductal papillary mucinous neoplasm(IPMN) of the pancreas , American Pancreatic Association 44th Annual Meeting , 2013/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
 8. Cases A. I., Ohtsuka T, Fujino M, Ideno N, Kozono S, Zhao M, Ikenaga N, Ohuchida K, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M , Expression of Glucagon-like Peptide 1 Receptor and Biological Behavior in Pancreatic Neuroendocrine Tumors , American Pancreatic Association 44th Annual Meeting , 2013/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
 9. Nakata K, Zhao M, Ohuchida K, Miyasaka Y, Maeyama R, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Tanaka M , Salinomycin induced Autophagy and is Related with its Killing Effect for Pancreatic Cells , American Pancreatic Association 44th Annual Meeting , 2013/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
 10. Mizuuchi Y, Aishima S, Ohuchida K, Shindo S, Mizumoto K, Tanaka M , Reduced Anterior Gradient 2 Expression is Induced by EMT and Correlated with Poor Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma , American Pancreatic Association 44th Annual Meeting , 2013/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
 11. Tanaka T, Ohuchida K, Mizumoto K, Kozono S, Tanaka M , Histone Deacetylase 1 is Responsible for Radioresistance of Pancreatic Cancer cells , American Pancreatic Association 44th Annual Meeting , 2013/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
 12. Akagawa S, Ohuchida K, Torada N, Eguchi D, Kozono S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M , Comparisons of Characteristics of Peritoneal Fibroblasts in Dissemination with those of Mesothelial Cells and Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Cancer , American Pancreatic Association 44th Annual Meeting , 2013/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
 13. Horioka K, Ohuchida K, Eguchi D, Fujiwara K, Akagawa S, Tanaka T, Sada M, Mizumoto K, Tanaka M , Follistatin-like 1 Regulates Epithelial to Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer , American Pancreatic Association 44th Annual Meeting , 2013/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
 14. Tamura K, Ohtsuka T, Ideno N, Aso T, Shindo K, Oda Y, Ohuchida K, Takahata S, Mizumoto K, Tanaka M , Treatment Strategy for Main Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas Based on the Assessment of Recurrence in the Remnant Pancreas after Resection: A Retrospective Review , American Pancreatic Association 44th Annual Meeting , 2013/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
 15. Sada M, Ohuchida K, Fujiwara K, Horioka K, Tanaka T, Zheng B, Cases AI, Akagawa S, Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M , Clinical

- significance of stromal CD90 and alpha-SMA expression in pancreatic cancer , American Pancreatic Association 44th Annual Meeting , 2013/10/30-11/2 , Miami (United States of America)
16. 小藪真吾、大内田研宙、水元一博、大塚隆生、赤川進、江口大樹、藤原謙次、Ana Ines Cases、趙茗、崔林、池永直樹、田中雅夫、Prifenidoneによる膵星細胞およびその癌間質相互作用を標的とした膵癌治療の可能性 , 第 43 回日本膵臓学会大会 , 2012/6/28-29 , 山形県山形市
 17. Ana Ines Cases、大塚隆生、藤野稔、池永直樹、藤原謙次、小藪真吾、井手野昇、Prawej Mahawithitwong、趙茗、大内田研宙、水元一博、田中雅夫 , PNET における GLP-1 の発現とその生物学的役割 , 第 43 回日本膵臓学会大会 , 2012/6/28-29 , 山形県山形市
 18. 寅田信博、大内田研宙、崔林、水元一博、相島慎一、小田義直、田中雅夫 , Tissue Tablet 法-新鮮凍結サンプルの新しい保存・管理法- , 第 49 回九州外科学会・第 49 回九州小児外科学会・第 48 回九州内分泌外科学会 , 2012/5/18-19 , 佐賀県佐賀市
 19. 森泰寿、大塚隆生、井手野昇、安藤鉄平、河野博、永吉洋介、小藪真吾、大内田研宙、上田純二、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 , 膵癌スクリーニングを目指した低侵襲な十二指腸液採取と蛋白マーカーの解析 , 第 83 回日本消化器内視鏡学会総会 , 2012/5/12-14 , 東京都港区
 20. 安藤鉄平、大塚隆生、井手野昇、河野博、永吉洋介、森泰寿、大内田研宙、上田純二、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 , 膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) における十二指腸乳頭開大所見の診断的意義 , 第 83 回日本消化器内視鏡学会総会 , 2012/5/12-14 , 東京都港区
 21. 崔林、大内田研宙、趙茗、池永直樹、小藪真吾、江口大樹、藤原謙次、赤川進、寅田信博、Mahawithitwong Prawej、水元一博、田中雅夫 , 浮遊条件で培養した膵癌由来線維芽細胞の癌間質相互作用における役割 , 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉市
 22. 藤原謙次、大内田研宙、進藤幸治、赤川進、江口大樹、小藪真吾、池永直樹、崔林、相島慎一、大塚隆生、高畑俊一、水元一博、小田義直、田中雅夫 , 膵癌における CD271 陽性膵星細胞の意義 , 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉市
 23. 江口大樹、池永直樹、小藪真吾、藤原謙次、趙茗、崔林、大内田研宙、大塚隆生、水元一博、田中雅夫 , 膵星細胞は低酸素下で connective tissue growth factor (CTGF) の分泌を介して膵癌の浸潤を促進する , 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉市
 24. 萱島理、大内田研宙、仲田興平、崔林、水元一博、田中雅夫 , Insig2 は膵癌で過剰発現しその発現は低酸素状態によって誘導される , 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉市
 25. 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、Mahawithitwong Prawej、高浪英樹、江口大樹、藤原謙次、小藪真吾、趙茗、崔林、池永直樹、水元一博、田中雅夫 , 膵癌に対する放射線治療と gemcitabine 治療の交叉耐性についての検討 , 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉市
 26. 寅田信博、大内田研宙、崔林、水元一博、相島慎一、小田義直、田中雅夫 , Tissue Tablet (組織タブレット) 法-手術切除組織の保存・管理のための新しいアプローチ- , 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉市
 27. 安藤鉄平、大塚隆生、井手野昇、河野博、永吉洋介、森泰寿、大内田研宙、高畑俊一、中村雅史、水元一博、田中雅夫 , 臨床因子解析による膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) サブタイプの術前予測 , 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉市
 28. 趙茗、大内田研宙、崔林、富永洋平、池永直樹、藤田逸人、Mahawithitwong Prawej、小藪真吾、江口大樹、水元一博、田中雅夫 , The effect of salinomycin on pancreatic cancer cell invasion and migration , 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉市
 29. 仲田興平、大内田研宙、貞苺良彦、萱島理、相島慎一、水元一博、田中雅夫 , 腸型膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 由来浸潤性膵臓癌の予後が良好な理由 , 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉市

[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：
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

坂井 寛 (SAKAI HIROSHI)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：80611665

(2) 研究分担者

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

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

森山 大樹 (MORIYAMA TAIKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：70586859

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

(3) 連携研究者

なし