

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10183

研究課題名(和文) 膵癌幹細胞の肝転移阻害を標的とした創薬開発に関する研究

研究課題名(英文) Targeting strategy to inhibit liver metastasis for pancreatic cancer

研究代表者

堀 裕一 (HORI, YUICHI)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：80248004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌は、がん死亡率の第5位にあり、早期診断が困難で予後不良であり、特に肝臓転移は予後を左右する。本研究では我々が樹立したマウス膵癌幹細胞株やヒト患者由来の膵癌幹細胞株を使って、初期の肝臓転移モデルを再構築し、転移機構の分子機構を解明し、新規治療法の開発を目指した。その結果、初期の肝臓転移においてマウス膵癌幹細胞やヒト膵癌幹細胞が分泌する微小な顆粒のエクソソームが重要な働きをしていることが明らかになった。今後はエクソソームを標的とする治療法の開発につながる重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer shows an aggressive phenotype with a dismal prognosis despite of multimodal therapy. Notably, remote organ metastasis such as liver metastasis is a life-threatening problem. Previously, we have already established several human pancreatic cancer cell line (Shimizu, Hori et al., PLoS One, 2013). In this study, we aimed to reconstruct early stage of liver metastasis by pancreatic cancer cells. First, we developed novel mouse pancreatic cancer stem cells by introducing mutated KRAS, mutated p53, and CDK4 oncogenes common in human pancreatic cancer to mouse pancreatic stem/progenitor cells. We found that micro-vesicles called as "exosome" from both mouse and human pancreatic cancer stem cells had a pivotal role in early stage of liver metastasis in vivo. These results indicate that this system might be potent strategy to inhibit liver metastasis for pancreatic cancer.

研究分野：膵臓外科学

キーワード：膵臓がん がん幹細胞 肝臓転移 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

手術治療、化学療法、放射線療法による集学的治療の進歩にも関わらず、膵臓がんは癌死亡率の第5位にあり、最新の5年生存率でも7.7%とがんの中で最も悪い。中でも肝臓などの遠隔転移を伴った膵癌患者は Stage4b となり手術不能例となる。標準治療として Gemcitabine(GEM)をはじめとする化学療法の対象となる。われわれはこれまでに幹細胞マーカーCD133を指標にして正常の組織幹細胞を同定した^[1]。また、我々は進行膵がん患者から20種類の膵癌幹細胞株を樹立し、CD133が癌幹細胞マーカーとなりうることを明らかにした^[2]。一方、がん細胞そのものとは別に、微小環境を標的にした治療戦略にも注目が集まっている。膵がんの特徴である間質形成、高率に起こる神経浸潤、早期に起こる肝転移を制御することはいずれも膵がんの予後を改善する可能性が期待されている。

[1] Hori Y, Fukumoto M, Kuroda Y.

Enrichment of putative pancreatic progenitor cells from mice by sorting for prominin1 (CD133) and PDGFR- β . *Stem Cells*. 26: 2912-2920, 2008.

[2] Shimizu K, Chiba S, Hori Y.

Identification of a novel subpopulation of tumor-initiating cells from gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *PLoS One* e81283, 2013

2. 研究の目的

本研究では、我々が樹立した初代ヒト膵癌幹細胞株やマウス膵癌幹細胞株を使って初期の肝転移モデルを再構築し、転移機構を分子レベルで解明し、新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス人工膵癌幹細胞の作成

初期の肝転移モデルの構築には免疫担当細胞の関与も不可欠であるため、従来の免疫不全マウスの利用では困難があった。そこで、syngenicなモデルを作成するために、マウスのCD133陽性stem/progenitor細胞にヒト膵癌に特徴的な変異型KRAS、変異型p53、CDK4を遺伝子導入してマウス人工膵癌幹細胞を作成した。さらに、その特性を解析した。

(2) 抗がん剤GEM耐性株の樹立

臨床的では抗がん剤投与により、一旦は腫瘍抑制効果を示すが、ほとんどの例で薬剤耐性を呈する。耐性を獲得すると癌細胞は悪性度

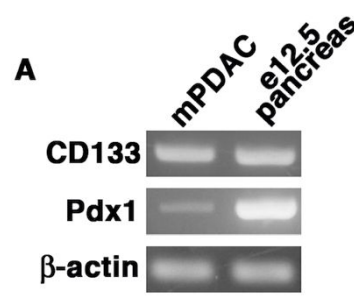
を増すと考えられている。我々は(1)のマウス人工膵癌幹細胞由来の皮下腫瘍に対してGEMを投与し、耐性株の樹立を試みた。

(3) マウス人工膵癌細胞からのエクソソームの分離と肝転移に及ぼす影響の検討
親株、GEM耐性株の培養上清から超遠心機を用いてエクソソームを分離し、PBSに溶解したものを実験まで冷凍保存した。

4. 研究成果

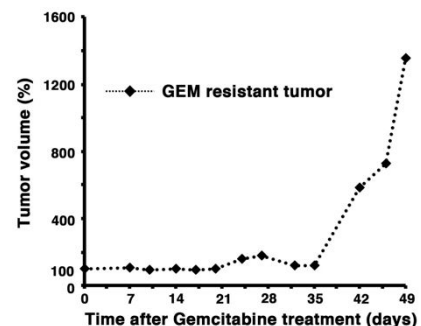
(1) マウス人工膵癌幹細胞の作成

今回、我々が樹立したマウス人工膵癌幹細胞は、RT-PCRによる遺伝子発現で検討すると、図に示すように、parentalのマウスCD133陽性stem/progenitor細胞と同様に幹細胞マーカーであるCD133や膵臓の初期発生に必須のPdx-1を発現保持していることがわかったのでこの細胞も幹細胞としての特性(自己複

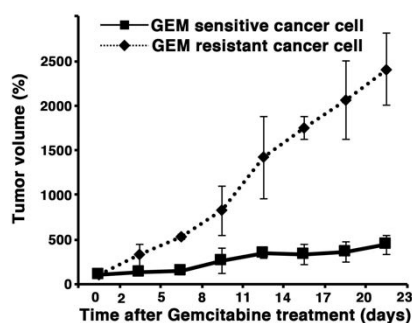


製能とヘテロな腫瘍形成能)をもつ可能性が示唆された。実際に、cell sortingしたCD133陽性細胞からin vitroやin vivoでCD133陰性細胞が出現することからも確認された。また、この細胞をin vivoで経脾臓的に投与すると約2ヶ月で肉眼的な肝転移を認めることから初期肝転移のモデルが再構築できた。

(2) 抗がん剤GEM耐性株の樹立



マウス人工膵癌幹細胞を野生型マウスの皮下移植してできた腫瘍に対し GEM 腹腔内投与をおこない、上段の図のように約 35 日目ころから腫瘍体積が再度増大する腫瘍を認めた。この腫瘍から細胞を分離培養して、GEM 耐性膵癌株を樹立した。GEM に対する IC50 を測定すると、親株マウス膵癌細胞の 0.08 μ M に対して耐性株マウス膵癌細胞では 30.0 μ M であり、GEM に対する耐性獲得を証明できた。また、下段の図のように耐性株由来の皮下腫



瘍には *in vivo* でも GEM が効かないことから、耐性株マウス膵癌細胞が GEM に対して耐性であることを証明できた。

(3) マウス人工膵癌細胞からのエクソソームの分離と肝転移に及ぼす影響の検討
親株と耐性株のマウス人工膵癌細胞からそれぞれエクソソームを分離した。耐性株由来のエクソソームを投与し、その後同一の癌細胞を移植したグループでは親株由来のエクソソーム投与群よりも肝転移能が亢進していた(論文作成中)。

本研究結果から、膵臓癌細胞の初期肝転移の再構築モデルができたと言える。また、転移や悪性度を癌細胞が分泌するエクソソームが決定する可能性が示された。類似の研究はこれまでになく、極めて独創的である。この成果が発展すれば、初期肝転移を標的とした創薬研究へと繋がり、難治性の膵臓がんの予後を改善することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shimizu K, Nishiyama T, Hori Y.
Gemcitabine enhances
Kras-MEK-induced matrix
metalloproteinase-10 expression via
histone acetylation in
gemcitabine-resistant pancreatic
tumor-initiating cells. *Pancreas* 査

読有 46: 268-275, 2018

Shinozaki K, Ajiki T, Murakami S,
Matsumoto T, Akita M, Shimizu K, Hori
Y. Novel cell line and animal model
for human biliary tract cancer.

Internal Medicine Review 査読有 1-6,
2016

〔学会発表〕(計 20 件)

角井祐介、清水一也、竹垣普惠、西村綾
乃、三好真琴、赤城剛、笹井研、堀裕一、
抗がん剤 Gemcitabine 耐性マウス膵癌
細胞の樹立と解析、第 40 回日本分子生
物学会 2017.12.7、神戸国際会議場(兵
庫県)

西村綾乃、清水一也、角井祐介、竹垣普
恵、三好真琴、堀裕一、抗がん剤耐性膵
癌細胞ではヒストンアセチル化を介し
た Kras-MEK-Matrix

Metalloproteinase-10 シグナルが

Gemcitabine 投与で増強する、第 40 回
日本分子生物学会 2017.12.7、神戸国際
会議場(兵庫県)

竹垣普惠、清水一也、角井祐介、西村綾
乃、三好真琴、赤城剛、笹井研、堀裕一、
がん遺伝子を導入したマウス膵臓組織
幹細胞はがん幹細胞様の表現型を示す
第 40 回日本分子生物学会 2017.12.7、
神戸国際会議場(兵庫県)

Kadoi Y, Shimizu K, Takegaki Y,
Nishimura A, Miyoshi M, Akagi T, Sasai
K, Hori Y. Establishment of novel
gemcitabine-resistant mouse
pancreatic cancer cell line. 48th
American Pancreatic Association,
2017.11.10、San Diego (USA)

Nishimura A, Shimizu K, Kadoi
Y, Takegaki Y, Miyoshi M, Hori Y.

Gemcitabine Enhances

Kras-MEK-induced Matrix

Metalloproteinase-10 Expression in

Gemcitabine-resistant Pancreatic

Tumor-initiating Cells. 48th American

Pancreatic Association, 2017.11.10、
San Diego (USA)

Takegaki Y, Shimizu K, Kadoi Y,
Nishimura A, Miyoshi M, Akagi T, Ken
Sasai, Hori Y. Oncogene transduced
mouse pancreatic stem/progenitor
cells show phenotypes similar to
tumor-initiating cell. 48th American
Pancreatic Association, 2017.11.10、

San Diego (USA)

堀裕一、癌遺伝子導入した膵臓組織幹細胞は tumor-initiating cell としての表現型を示す、第 14 回日本消化器外科学会、2016.11.3、神戸国際会議場(兵庫県)

Kojima N, Miyoshi M, Nishiyama S, Tsuchida Y, Hori Y. Gemcitabine Enhances Kras-MEK-induced matrix metalloproteinase-10 expression in gemcitabine-resistant pancreatic tumor-initiating cells、第 75 回日本癌学会、2016.10.7、パシフィコ横浜(神奈川県)

Osaka S, Miyoshi M, Nishiyama S, Tsuchida Y, Kojima N, Hori Y Pancreatic ductal adenocarcinoma primes the adjacent normal ducts to a precancerous phenotype、第 75 回日本癌学会、2016.10.7、パシフィコ横浜(神奈川県)

井瀬悠希、清水一也、上野山恭平、西山悟史、土田悠加、堀裕一、癌遺伝子を導入した膵臓組織幹細胞は、癌幹細胞様の表現型を示す、第 47 回日本膵臓学会大会、2016.8.4 仙台国際会議場(宮城県)

西山悟史、清水一也、上野山恭平、井瀬悠希、土田悠加、堀裕一、膵腫瘍は隣接する正常膵管に異型性を誘導する、第 47 回日本膵臓学会大会、2016.8.4 仙台国際会議場(宮城県)

土田悠加、清水一也、上野山恭平、井瀬悠希、西山悟史、堀裕一、膵癌細胞においてゲムシタピンは Kras シグナル依存性に MMP-10 の発現を増強する、第 47 回日本膵臓学会大会、2016.8.4 仙台国際会議場(宮城県)

堀裕一、膵腫瘍は隣接する正常膵管に異型性を誘導する、第 116 回日本外科学会、2016.4.16 大阪国際会議場(大阪府) Tsuchida Y, Nishiyama T, Nishiyama S, Hori Y, Novel therapeutic approach for gemcitabine-resistant human pancreatic cancer、第 74 回日本癌学会、2015.10.8、名古屋国際会議場(愛知県) Nishiyama S, Nishiyama T, Tsuchida Y, Hori Y, Interaction between laminin and Notch pathway in the microenvironment of pancreatic cancer cells、第 74 回日本癌学会、2015.10.8、名古屋国際会議場(愛知県)

上野山恭平、清水一也、井瀬悠希、山崎千寛、西山嵩晃、西山悟史、土田悠加、堀裕一、膵腫瘍は隣接する正常膵管に異型性を誘導する、第 47 回日本臨床分子形態学会、2015.9.18、長崎大学(長崎県)

西山嵩晃、清水一也、井瀬悠希、上野山恭平、山崎千寛、西山悟史、土田悠加、堀裕一、がん遺伝子を導入した膵臓組織幹細胞はがん幹細胞様の表現型を示す、第 47 回日本臨床分子形態学会、2015.9.18、長崎大学(長崎県)

Yamasaki C, Shimizu K, Uenoyama K, Nishiyama T, Hori Y,

Insulin-producing cells derived from the immortalized pancreatic stem cells、第 19 回 International Association of Pancreatology、2015.8.27、Shanghai (China)

Uenoyama K, Shimizu K, Nishiyama T, Yamasaki C, Hori Y, Pancreatic ductal adenocarcinoma primes the adjacent normal ducts for a precancerous phenotype、第 19 回 International Association of Pancreatology、2015.8.27、Shanghai (China)

Nishiyama T, Shimizu K, Uenoyama K, Yamasaki C, Hori Y, Oncogene-mediated mouse pancreatic stem cell shows pancreatic cancer stem cell phenotype 第 19 回 International Association of Pancreatology、2015.8.27、Shanghai (China)

[図書](計1件)

堀裕一、南光堂、新膵臓病学、402-404、2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 裕一 (HORI, Yuichi)
神戸大学・保健学研究科・教授
研究者番号：80248004

(2) 研究分担者

清水 一也 (SHIMIZU, Kazuya)
神戸大学・保健学研究科・保健学研究員
研究者番号：50335353