

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591503  
 研究課題名(和文) 消化器癌における癌細胞－間葉細胞間の相互作用機構の解明と新規抗腫瘍療法の開発  
 研究課題名(英文) Mechanisms of the interaction between cancer cells and mesenchymal cells in gastrointestinal cancer.  
 研究代表者  
 氏名(ローマ字)：吉富 秀幸(YOSHITOMI HIDEYUKI)  
 所属機関・部局・職：千葉大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：60375631

研究成果の概要： 膵臓癌における癌－間質細胞の相互作用に注目した。膵癌細胞が Fibroblast growth factor Receptor (FGFR)2を、周囲間質細胞が FGF10を発現していた。FGFR2を強発現する膵癌では予後が不良であった。また、FGF10はFGFR2発現膵癌細胞株の細胞遊走、浸潤能を誘導した。このことから、間質細胞が FGF10-FGFR2を介し、膵癌の悪性化の一助をになっていると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：実験外科学・消化器癌・膵臓癌・FGF10・FGFR2・間質細胞・細胞遊走能・細胞浸潤能

## 1. 研究開始当初の背景

消化器悪性腫瘍は悪性腫瘍の中でも罹患率、死亡率の多くの部分を占めており、新しい治療方法の開発が重要である。特に、膵臓癌は依然予後不良の疾患であり、日本における癌死の第5位を占めている。また、その発生件数も年々増加している。膵臓癌の治療としては外科切除が第一選択となるが、早期発見の難しさから外科切除が可能な症例は限られており、加えて、根治切除がなされたとしても早期に再発を来す事が多い。加えて、膵臓癌は化学療法などの他の治療法に極め

て強い耐性を示す。近年、ようやく抗癌剤である Gemcitabine が膵臓癌の治療に一定の効果を持つ事が示されたが、切除不能膵臓癌における予後改善効果は2ヶ月程度と十分なものとは言えない(Burris HA, J Clin Oncol (1997) 15:2403-)。よって、新しい治療法の実現が急務である。

近年の分子生物学の発達により、癌の分子機構が少しずつ解明され、癌の増殖などに関わる特定の分子を標的とした治療法が新たに開発され、臨床応用されている。膵臓癌においても EGF 受容体阻害剤である Erlotinib

が Gemcitabine との併用で効果がある事が確認されている (Moore MJ et al. 2005 ASCO Annual meeting)。すなわち、癌の分子機構のより詳細な解明により、より効果のある治療法が開発できると考えられる。

特に、本研究では癌細胞の発育、浸潤における microenvironment の果たす役割に注目した。中でも、近年、癌組織内の間葉細胞、すなわち線維芽細胞、血管内皮細胞などが癌細胞と相互作用を持つことで、癌の進展に関わっていることが注目されている (Kalluri R and Zeiberg M, Fibroblasts in cancer Nature Rev Cancer (2006) 6:392-)。間葉の線維芽細胞はこれまでは単に癌組織におけるマトリックスの生成に関わっており、癌細胞が生存していくための足場を作っているとされていた。しかし、近年、線維芽細胞の中でも癌組織内で活性化された細胞群 (Cancer-associated fibroblasts (CAFs)) はケモカインの一つである CXCL12 (stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)) を分泌することで受容体である CXCR4 を発現する乳癌細胞の増殖を促進し、一方で癌組織内の血管新生も促進することで癌組織の発育を促していることが示された (Orimo A et al. Cell (2005) 121:335-)。このような間葉系細胞と癌細胞の相互関係は種々の癌に共通したメカニズムであると考えられる。

一方で、癌の発生、発育メカニズムは臓器発生メカニズムと共通する点が多いことが知られている。発生では、内胚葉、中胚葉、外胚葉細胞がお互いに cross talk することにより種々の臓器に分化、増殖していくことが知られている。肝臓、膵臓は共に内胚葉由来の原腸細胞より発生するが、この発生には周囲の脊索、間葉系細胞、血管内皮細胞といった中胚葉、外胚葉由来の細胞が重要な役割を果たしてきたことが知られている。特に、研究代表者は、世界で始めて血管内皮細胞と原腸細胞の相互作用により初期の肝臓の増殖が起こることを報告した (Matsumoto K, Yoshitomi H et al. Science (2001) 294:559-)。また、続いて、血管内皮細胞が膵臓の発生に果たす役割についても報告し、この分野での最先端の研究を進めてきた (Yoshitomi H and Zaret K, Development (2004) 131:807-, Jacquemin P and Yoshitomi H et al., Dev Biol (2006) 290:189-)。特に、背側膵の発生においては血管内皮細胞からのシグナルが周囲の間葉系細胞における fibroblast growth factor-10 (FGF10) の発現を促すことで、原腸から膵芽細胞が増殖し形態学的に膵芽を形成していく事を解明した。このことは癌の発育においても同様に周囲の間質細胞からのシグナルが癌細胞自身の増殖や形質転換に影響を与えている可能性を示唆している。このような背景から、

我々は癌細胞と周囲の間質細胞との相互作用を FGF10 シグナルに注目して解明することを発想した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、消化器癌、特に膵臓癌の分子メカニズムを明らかにして、新しい治療法の開発に役立てる事にある。特に、癌組織における微小環境に注目し、まず、癌細胞が周囲の間質系細胞とどのような相互作用を持つかを検討し、このような相互作用を阻害する事により癌の発育、進展を抑制する治療法の開発に役立っていないかを検討する。

前述のような背景より、本研究ではまず、消化器癌、特に膵臓癌における癌細胞と周囲の間葉細胞の相互作用がどのような物質を介して、どのような作用を引き起こしているかを解明する。これまでに知られている FGF10、FGF 受容体などの間葉細胞と実質細胞の相互作用に関与していると思われる因子の遺伝子、蛋白の細胞特異的な発現を検討する。また、加えて microarray 法や proteomics 解析などの遺伝子、蛋白の mass analysis 法を用いて、癌組織中と正常組織中の線維芽細胞や血管内皮細胞をはじめとした間葉細胞の遺伝子、蛋白発現の違いを検討し、これまで言われていないような因子が関与していないかを検討する。また、これらの因子が癌-間葉細胞間の相互作用をどのように制御しているかを、細胞株や primary culture により得られた細胞を使用し、共培養などにより検討する。特に、siRNA による遺伝子のノックダウン法といった最新技術を用い各遺伝子の発現抑制を行い、生体内での相互作用がどのようになっているかを検討する。最終的にはこれらで得られた知見を生かし、間葉細胞と癌細胞の相互作用を阻害する様な遺伝子治療法、もしくは抗体投与による治療、シグナル伝達阻害薬による治療法を開発していく。このような研究により、予後不良な疾患である膵臓癌をはじめとした消化器癌に対する画期的な新規治療法の開発を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

① 癌組織における癌細胞-間葉細胞相互作用に関係する因子の発現、特に FGF10 関連因子を中心として

癌-間葉細胞相互作用に関連する因子に対する抗体を使用して免疫組織染色を行い、これらの因子を発現している細胞の同定を試みる。サンプルとしては、膵臓癌を中心に、肝胆道系腫瘍について主として検討する。発現を検討する項目については FGF10 とその受容体である FGF receptor-2 (FGFR2) の染色を行う。また、FGF10 を発現している細胞がどのような細胞なのかを種々の繊維芽

細胞のマーカーを使用して検討する。特に、CAFs のマーカーである smooth muscle  $\beta$ -actin と 2 重染色を施行する。加えて、FGF10 と非常に近い相同性を持ち、そのノックダウンマウスにおいてはやはり膵臓の発生が障害される FGF7 についても発現を検討する。また、間質のもう一つの重要な構成細胞である血管内皮細胞をそのマーカーである platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) や我々がすでに膵臓癌における腫瘍特異的な内皮細胞のマーカーである事を見出している endoglin の発現も検討し、新生血管、CAFs、癌細胞がどのような 3 次元構造を形成しているか観察する。

#### ②細胞株を使った検討

間質細胞に発現する因子が癌細胞にどのような作用をもたらすかを細胞株を使用して *in vitro* で検討する。膵癌細胞株としては Mia PaCa2, CFPAC-1, PANC-1, AsPC-1 を使用した。これらの細胞株を培養し、これに FGF10 等の因子を添加することで、細胞の増殖速度、遊走能、浸潤能にどのような変化が起きるかを検討する。加えて、これらの因子の添加により、癌細胞株にどのような遺伝子や蛋白の発現の変化が起こるかを RT-PCR 法や ELISA 法を用いて検討する。

#### ③膵癌組織特異的発現因子の網羅的検索

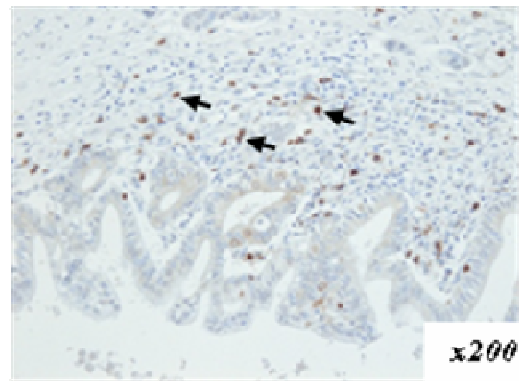
癌細胞-間質細胞相互作用を媒介する因子は、正常組織での発現は少なく、特に癌組織においてその発現が上昇すると考えられる。そこで、膵癌組織で発現が上昇しているタンパク質を発見することで、これらの相互作用の解明に寄与する可能性がある。近年、血清や組織標本などにおける発現蛋白を網羅的に検索する手法が注目を集めている。これらの中で、我々は特に SELDI-TOF MS 法に注目した。本法は再現性を持って生物学的サンプルの蛋白発現を比較することができる。そこで、膵癌患者より手術前後で採取した血清を比較することで、膵癌に特異的に上昇している血清蛋白の発見を目指し、これが膵癌の進展にどのように関わっているかを検討した。

### 4. 研究成果

#### ①膵癌組織における FGF10 とその受容体である FGFR2 発現

千葉大学附属病院において膵癌に対する切除手術を行った 76 症例の切除標本における FGF10 と FGFR2 の発現を免疫染色法により検討した。FGF10 は膵癌細胞自体の発現はほとんど認めないが、極軽度に染色される程度であったが、膵癌細胞周囲に強く染色される細胞が散在していた。この細胞はやや紡錘状の形態をしており、線維芽細胞用のものと思われた。リンパ球、活性線維芽細胞、マクロファージのマーカーを用いて、隣接切

片の免疫染色を行い、FGF10 陽性細胞の同定を試みたが、明らかなものは認めなかった (図 1)。



一方、FGFR2 は膵癌細胞そのものに発現が認められた (図 2)。各症例ごとにその染色の強度が違ったため、76 症例をその染色の強度により強発現群 (n=39) と弱から無発現群 (n=37) の 2 群に分けた。両群の生存期間を比較すると、有意に強発現群の予後が不良であった。

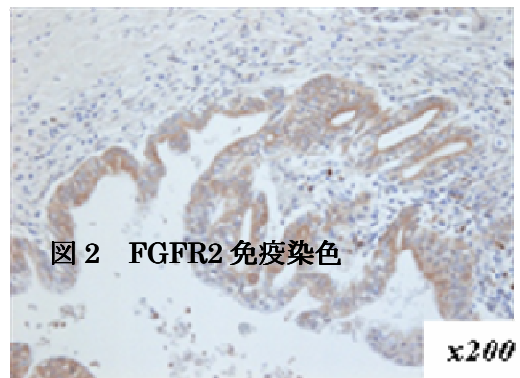


図 2 FGFR2 免疫染色

以上の結果から、FGF10-FGFR2 を介した間質細胞-癌細胞の相互作用が膵癌の進展に関わっていると考えられた。そこで、膵癌細胞株を使用して、これらのシグナルがどのような癌細胞にどのような作用をきたすかを検討した。

まず、各細胞株における FGF10, FGFR2 の発現を RT-PCR 法で検討した。FGF10 は免疫染色における結果と同様に、すべての膵癌細胞株で発現を認めなかった。一方、FGFR2 はすべての細胞株で発現を認めた。FGFR2 には isoform が存在することが知られている。加えて、FGF10 に対する結合能を持つものはその中で FGFR2-IIIb isoform であることから、本 isoform に特異的に反応する PCR プライマーを作成して検討したところ、CFPAC-1 と AsPC-1 にのみ、この isoform が発現していた。

そこで、これらの細胞株の培養上清中に

FGF10を100ng/mlの濃度で添加したところ、すべての細胞株で細胞増殖には変化を認めなかったが、FGFR2-IIIb isoformを発現するCFPAC-1, AsPC-1では細胞遊走能、および浸潤能が誘導された。このことから、FGF10は膵癌細胞に発現するFGFR2-IIIbを介して細胞遊走能、浸潤能を誘導することで、膵癌の悪性化に関与していることが示された。

一方、膵癌患者血清発現蛋白を手術前後で比較検討を行うと、SELDI-TOF-MS法による解析で6630Daの分子量の血清蛋白が手術前に高く、術後低下することを見出した。そこで、この蛋白質のアミノ酸配列を検討するとApolipoprotein C-1であることが判明した。加えて、この蛋白質の発現量で患者を2群に分けると、術前に本蛋白質の発現が高値であった症例では予後が不良であることを見出した。また、本蛋白質の膵癌組織における発現を免疫染色法で検討したところ、膵癌細胞に発現しており、また、本蛋白質の発現をsiRNAで抑制することで、膵癌細胞株の増殖が抑制されることを見出した。よって、Apolipoprotein C-1が膵癌の増殖に関わっていることが示され、現在、どのような間質細胞からのシグナルが膵癌細胞における本蛋白質の発現を誘導するかを検討している。

以上のような研究成果を通し、本研究期間において、我々は膵癌細胞が周囲の間質細胞との相互作用を持ち、この作用によって膵癌の進展が促されている可能性を示した。現在、どのような細胞内シグナルが関与しているのか、血管内皮細胞などの他の間質細胞との関係はどうなっているのかを検討している段階である。このような分子機構を解明することを通し、これらの相互作用を阻害する物質、たとえばFGFR2へのFGF10の結合を阻害する可溶性FGFR2などが膵癌の進展、特に浸潤や転移を阻害する治療法へ応用できないかを現在、検討している。

## 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8件)

- ① 吉富秀幸, Zaret KS, 木村文夫, 清水宏明, 吉留博之, 大塚将之, 宮崎勝 肝臓膵臓組織発生における血管内皮細胞と実質細胞の相互作用 肝胆膵 in press 2009 査読無し
- ② Hideyuki Yoshitomi<sup>1</sup>, So-ichi Kobayashi<sup>1</sup>, Masayuki Otsuka, Fumio Kimura, Hiroaki Shimizu, Hiroyuki Yoshidome, and Masaru Miyazaki (1: These authors contributed equally to this work), Specific Expression of

Endoglin (CD105) in Endothelial Cells of Intratumoral Blood and Lymphatic Vessels in Pancreatic Cancer. *Pancreas* 37:275-281, 2008 査読有り

- ③ Shigetugu Takano, Akira Togawa, Hideyuki Yoshitomi, Takashi Shida, Fumio Kimura, Hiroaki Shimizu, Hiroyuki Yoshidome, Masayuki Ohtsuka, Atsushi Kato, Takeshi Tomonaga, Fumio Nomura, and Masaru Miyazaki Annexin II overexpression predicts rapid recurrence after surgery in pancreatic cancer patients undergoing gemcitabine-adjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 15:3157-68, 2008 査読有り
- ④ Kawamoto J, Kimura F, Yoshitomi H, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Nozawa S, Furukawa K, Mitsuhashi N, Takeuchi D, Miyazaki M Preoperative GATA3 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells is up-regulated in patients with postoperative infection following hepatobiliary pancreatic surgery. *J Surg Res* 2008 (Epub ahead of print) 査読有り
- ⑤ Mitsuhashi N, Kobayashi S, Doki T, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Nozawa S, Furukawa K, Takeuchi D, Suda K, Miura S, Miyazaki M. Clinical significance of  $\alpha$ -Fetoprotein; involvement on proliferation, angiogenesis, and apoptosis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 23:e189-197, 2008 査読有り
- ⑥ S Nomura, H Yoshitomi, S Takano, T Shida, S Kobayashi, M Ohtsuka, F Kimura, H Shimizu, H Yoshidome, A Kato, and M Miyazaki FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 99:305-13, 2008 査読有り
- ⑦ S Takano, H Yoshitomi, A Togawa, K Sogawa, T Shida, F Kimura, H Shimizu, T Tomonaga, F Nomura, and M Miyazaki Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer. *Oncogene* 27:2810-22, 2008 査読有り
- ⑧ Kuboki S, Shimizu H, Mitsuhashi N, Kusashio K, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M. Angiopoietin-2 levels in

the hepatic vein as a useful predictor of tumor invasiveness and prognosis in human hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol 23:e157-164, 2008 査読有り

〔学会発表〕(計 6件)

- ① 野村悟、吉富秀幸、高野重紹、志田崇、小林壮一、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤厚、野澤聡志、古川勝規、三橋登、竹内男、高屋敷吏、須田浩介、宮崎勝 FGF10 およびFGFR2-IIIbのシグナルを介した膵癌における細胞遊走浸潤能の誘導 第63回日本消化器外科学会 2008年7月17日 札幌
- ② 野村悟、吉富秀幸、高野重紹、志田崇、小林壮一、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤厚、野澤聡志、古川勝規、三橋登、竹内男、高屋敷吏、須田浩介、宮崎勝 FGF10/FGFR2-IIIb signalを介した膵癌細胞遊走浸潤能の誘導 第108回日本外科学会定期学術集会 2008年5月18日 長崎
- ③ 高野重紹、吉富秀幸、外川明、志田崇、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤厚、野澤聡志、古川勝規、三橋登、竹内男、高屋敷吏、須田浩介、野村文夫、宮崎勝 膵癌分子標的治療薬としてのAnnexin II臨床応用への挑戦 第108回日本外科学会定期学術集会 2008年5月18日 長崎
- ④ 高野重紹、吉富秀幸、外川明、志田崇、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤厚、野村文夫、宮崎勝 膵癌術後補助療法の個別化を目指したgemcitabine耐性因子の同定と臨床応用 第45回日本癌治療学会 2007年10月25日 京都
- ⑤ 高野重紹、吉富秀幸、外川明、曾川一幸、志田崇、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、朝長毅、野村文夫、宮崎勝 膵癌血清マーカーであるApoC-1の予後と再発との相関および膵癌細胞における機能解析 第38回日本膵臓学会大会 2007年6月28日 福岡
- ⑥ 吉富秀幸、高野重紹、外川明、志田崇、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、野村文夫、宮崎勝 プロテオミクスを用いた膵癌GEM耐性因子としてのAnnexin IIの同定とその臨床的意義の解明 第38回日本膵臓学会大会 2007年6月28日 福岡

〔図書〕(計 0件)  
該当無し

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)  
該当無し

○取得状況(計 0件)  
該当無し

〔その他〕

無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 60375631

### (2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 70166156  
大塚 将之 (OHTSUKA MASAYUKI)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 90334185  
三橋 登 (MITSUHASHI NOBORU)  
千葉大学・フロンティアメディカルセンター・准教授  
研究者番号: 80400985  
須田 浩介 (SUDA KOSUKE)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50400908  
高野 重紹 (TAKANO SHIGETSUGU)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 20436380

### (3) 連携研究者

無し