

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09207

研究課題名(和文) 膵癌の癌幹細胞特異的糖鎖による早期診断法と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of early diagnosis and new treatments for pancreatic cancer using cancer stem cell-specific glycans

研究代表者

石渡 俊行 (Ishiwata, Toshiyuki)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：90203041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は極めて予後が悪く、早期発見と画期的な新規治療法の開発が必須である。糖脂質の1群であるガングリオシドは細胞表面マーカーとしての役割だけでなく、細胞機能にも関わる重要な細胞表面分子である。ガングリオシドのGM2の発現と役割の解析を行ない、膵癌の早期診断法の開発や、光免疫療法などの細胞表面抗原を利用した新たな膵癌治療にGM2が利用できる可能性があることを解明した。ヒト膵癌の癌幹細胞マーカーとして知られ、癌の増殖、浸潤、転移を促進させるnestinの発現調節には、プロモーター領域だけでなくエピジェネティックな制御やmiRNAなどが強く関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は60歳以上に好発することから、高齢化社会の到来により本邦はもとより世界的に患者数が急増している。細胞表面に存在する糖脂質の1群であるガングリオシドのGM2が、膵癌の一部で高発現しており、新たな早期診断マーカーや、光免疫療法などの細胞表面抗原を利用した膵癌治療の標的となる可能性があることを解明した。膵癌の癌幹細胞マーカーで、癌の増殖、浸潤、転移を促進することが報告されている中間径フィラメントのnestinについて、その発現制御機構の研究を行った。膵癌細胞では、nestinの発現がプロモーター領域に加えて、エピジェネティックな制御やmiRNAなどによっても調節されていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer has an extremely poor prognosis, and early diagnosis and development of novel therapies are needed. Gangliosides, a group of glycolipids, are important cell surface molecules that play a role not only as cell surface markers but also in cell functions. We analyzed the expression and role of ganglioside GM2 and elucidated the possibility that GM2 could be used for the development of early diagnosis of pancreatic cancer and new pancreatic cancer therapies using cell surface antigens such as photoimmunotherapy.

Nestin is known as a cancer stem cell marker for human pancreatic cancer and has a role in promoting cancer proliferation, invasion, and metastasis. It was clarified that not only the promoter region but also epigenetic regulation and miRNA may be involved in the regulation of nestin expression in human pancreatic cancer.

研究分野：実験病理学

キーワード：癌幹細胞 膵癌 糖鎖 Nestin SNP エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

膵癌は抗癌剤の開発や投与方法の改良にも関わらず、5年生存率は約10%と極めて予後が悪い。膵癌の70~80%が発見時には手術不能の進行した状態であり、手術が可能であった症例も、術後に高率に再発や転移がおこる。膵癌は60歳以上に好発することから、高齢化社会の到来により本邦はもとより世界的に患者数が急増している。膵癌は高齢者に好発し、早期診断が困難で著効を示す治療法がない極めて重篤な疾患で、このままの状態が続けば社会問題にもなると考えられる。実際に米国では、このままの状態が続くと2030年には膵癌が肺癌について癌死の第2位(消化器癌で最多)になると予想されている。膵癌の早期発見と画期的な治療法の開発が重要な課題である。

現在までに糖鎖が癌細胞や幹細胞の動態に関わるだけでなく、特異的なマーカーとなりうる有用な分子であることは良く知られている。膵癌において最も高感度の腫瘍マーカーのCA19-9も糖鎖マーカーである。しかしCA19-9は膵癌特異的とは言えず、さらに膵癌の早期検出に有用とは言えないのが現状である。細胞表面に存在する糖脂質の1群であるガングリオシドは、細胞の種類や細胞の状態によって発現が異なることから、表面マーカーとしての役割を担うだけでなく、シグナル伝達を制御するなど、細胞機能にも関わる重要な表面分子である。多様性を示す膵癌細胞における、ガングリオシドの発現とその役割は明らかでない。

膵癌に高発現する癌幹細胞マーカーは、CD133, CD24, CD44, CXCR4, EpCAM, ABCG2, c-Met, ALDH-1, nestinなどが報告されている。Nestinは中間径フィラメントの一種で、膵癌の癌幹細胞性や増殖、転移に関与することが知られている。抗がん剤の投与とともに、nestinを抑制することで、相乗的な膵癌細胞の殺細胞効果がみられることも明らかとなっている。Nestinの制御により動物実験レベルで癌の増殖、転移抑制に著効を示すことが報告されている。しかし、nestinは細胞内タンパクのため、これを標的とした治療法の開発は困難であり、nestin陽性膵癌細胞に特異的な細胞表面分子も未だ不明である。このため、膵癌、特に膵癌の癌幹細胞における糖鎖などの細胞表面分子の発現とその役割の解明が重要な課題である。

2. 研究の目的

膵癌培養細胞株およびヒト膵癌組織における糖鎖の発現と、その役割を明らかにする。特に膵癌の転移や抗癌剤耐性に重要な役割を果たしていると考えられている、癌幹細胞と糖鎖の関係を解明し、糖鎖を標的とした新規治療法の開発に向けた研究成果を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

8種類のヒト膵癌培養細胞株(PANC-1, T3M-4, PK-59, PK-45P, MIA PaCa-2, PK-8, PK-1, KP4)におけるガングリオシドのGM2発現をFACS解析で検討した。さらにGM2発現と癌幹細胞の関係をMIA PaCa-2細胞を用いてin vitroで検討し、GM2陽性と陰性細胞をヌードマウスの皮下に移植し腫瘍形成能を比較した。さらに、ヒト膵癌組織標本におけるGM2発現と、臨床病理学的因子との関連を解析した。

次にヒト膵癌培養細胞株のPANC-1細胞を用いて、膵癌の癌幹細胞マーカーの中で機能解析の進んでいるnestinについてレポーターベクターを作成したのちレポーター細胞を作成した。まず、nestinのプロモーター領域の下流で安定的なGFPを発現するベクターを膵癌細胞株に導入し、G418で1ヶ月程セクションを行い、安定的にnestinプロモーターGFPがゲノムに組

み込まれた細胞を樹立した。セレクションされたコロニーをクローニングして、複数のクローンを得た。得られたクローンについて、フローサイトメトリー解析で GFP の発現を確認し、セルソーターで GFP 陽性と陰性に分離した。Nestin 遺伝子発現量について Q-PCR 解析を行い、タンパク発現量についてウェスタンブロット解析を行った。さらに、幹細胞の指標の一つであるスフェア形成能について、低吸着プレートに FGF2 と EGF を添加した血清フリー培地で 1 週間培養し、写真撮影を行った。また、nestin のプロモーター領域の下流で不安定的な蛍光タンパクを発現するベクターを PANC-1 細胞および PK-45P 細胞に導入し、Zeocin でセレクションを行い、安定導入株を作成した。

また、日本人の 2,206 名の剖検例を用いた検討で、nestin の SNP (p.A1199P) が膵癌と関連しているとの報告を基に、nestin の wild type と変異ベクターを作成し、ヒト膵癌培養細胞株の PK-8 細胞にそれぞれ遺伝子導入し細胞動態と次世代シーケンス法によるエクソーム解析を行なった。

4. 研究成果

検討した 8 種類の膵癌培養細胞株の中で、MIA PaCa-2 細胞にガングリオシドの GM2 が最も高発現していた。MIA PaCa-2 細胞の中で、細胞膜上の GM2 陽性の細胞と陰性の細胞をセルソーターで分離しその性質を比較検討した。GM2 陽性の MIA PaCa-2 細胞は GM2 陰性細胞よりも増殖が速く、低接着プレートを用いて 3 次元培養すると浮遊細胞塊 (スフェア) が形成され、GM2 陰性細胞を 3 次元培養すると、大部分の細胞が GM2 陽性に変化した。MIA PaCa-2 細胞の 3 次元培養細胞では、ALDH1, Oct4, Nanog, CD24, CD44v9 などの各種幹細胞マーカーの発現が高く、幹細胞の特徴である高い薬剤排出能を示したことから、GM2 陽性の 3 次元培養細胞が癌幹細胞の性質を有する細胞である可能性が示唆された。糖脂質合成阻害剤 (AMP-dNM) により 3 次元培養細胞で GM2 の発現を抑制すると、TGF- β 1 シグナルと上皮間葉転換様分化が抑制され、膵癌細胞の浸潤も阻害されることがわかった。また、ヌードマウスに移植した GM2 陽性の MIA PaCa-2 細胞は、GM2 陰性細胞よりも高い発生率で、より大きな皮下腫瘍を形成した。ヒト組織での発現を検討した結果、発症年齢が若く、腫瘍径が大きく、病期が進行し、組織学的な悪性度が高いヒト膵癌患者で、有意に

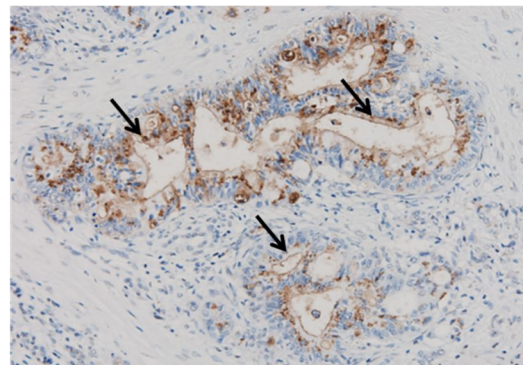


図1 ヒト膵癌手術組織におけるGM2発現

GM2 の発現が増加していた (図 1、矢印)。GM2 を標的とした膵癌の早期診断法の開発や光免疫療法などの細胞表面抗原を利用した新たな膵癌治療にも GM2 の有用性が期待される。

ヒト膵癌培養細胞株の PANC-1 細胞に nestin のプロモーター支配下で蛍光を発するベクターを導入することで、蛍光を発現する細胞を指標にして nestin 陽性細胞をセルソーターで分離した。蛍光タンパクについては、通常の GFP と不安定的 (短期間) に発現する GFP の 2 種類で検討した。いずれの場合も、GFP の発現量 (nestin の転写活性) に応じた nestin の遺伝子レベルでの発現を確認することはできなかった。Nestin プロモーター-GFP 安定発現細胞について、フローサイトメトリー解析を行い、GFP の発現を確認したところ、クローンごとに GFP の陽性率が異なっていた。PANC-1 細胞での nestin の発現が数パーセントであることが知られていることから、10%以内で GFP を発現しているクローンについて GFP 陽性または陰性細胞をセルソーターで分離し、Q-PCR 解析で nestin の遺伝子レベルの発現を確認したが、nestin の発現と

GFP 陽性との相関はほとんどみられなかった。さらに、GFP 陽性 PANC-1 細胞を再度培養し、GFP の発現性を検討した結果、1 週間培養しても、GFP の陽性率は高く保たれていた。一方で、nestin のプロモーター領域の下流で不安定な蛍光タンパクを発現するベクターを PANC-1 細胞および nestin を高発現している膵癌培養細胞株の PK-45P 細胞に導入し、セレクションを行い安定導入株を得た。フローサイトメトリー解析の結果、すべての細胞で GFP が陽性であった。GFP 陽性集団の中で、高発現と低発現についてセルソーターで分離し、Q-PCR 解析で nestin の遺伝子レベルの発現を確認したが、GFP の発現と nestin の遺伝子レベルの発現に相関はみられなかった。さらに nestin プロモーター-GFP 安定細胞株の一つ(クローニング前)について、GFP 陽性と陰性細胞においてウェスタンプロット解析を行った結果、遺伝子発現とは異なり、GFP 陽性細胞で nestin のタンパク量が高いことがわかった。GFP 陽性細胞のほうが陰性細胞よりもスフェア形成能が高いことが明らかとなった。以上の結果からヒト膵癌培養細胞の nestin の発現には、エピジェネティックな制御や miRNA などがより効果的に関与していることが示唆された。

SNPs と同様の変異を加えた nestin 発現ベクターを遺伝子導入したヒト膵癌培養細胞株の PK-8 細胞では、wild type の nestin 導入 PK-8 細胞と細胞増殖能、遊走能、浸潤能に差はみられなかった。次世代シーケンスによるエクソーム解析の結果、変異を加えた nestin を遺伝子導入した PK-8 細胞は、wild type の nestin 導入 PK-8 細胞に比べて、NF B が顕著に減少していた。膵癌培養細胞とヒト膵癌組織における NF B の周囲の関連分子の変化と、糖鎖の発現変化などについて今後検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sasaki Norihiko , Toyoda Masashi , Ishiwata Toshiyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Gangliosides as signaling regulators in cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22105076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Minami Fuuka, Sasaki Norihiko, Shichi Yuuki, Gomi Fujiya, Michishita Masaki, Ohkusu-Tsakada Kozo, Toyoda Masashi, Takahashi Kimimasa, Ishiwata Toshiyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Morphofunctional analysis of human pancreatic cancer cell lines in 2- and 3-dimensional cultures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86028-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujiya Gomi, Norihiko Sasaki, Yuuki Shichi, Fuuka Minami, Seiichi Shinji, Masashi Toyoda, Toshiyuki Ishiwata	4. 巻 7
2. 論文標題 Polyvinyl alcohol increased growth, migration, invasion, and sphere size in the PK-8 pancreatic ductal adenocarcinoma cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e06182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e06182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki Norihiko, Gomi Fujiya, Yoshimura Hisashi, Yamamoto Masami, Matsuda Yoko, Michishita Masaki, Hatakeyama Hitoshi, Kawano Yoichi, Toyoda Masashi, Korc Murray, Ishiwata Toshiyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 FGFR4 inhibitor BLU9931 attenuates pancreatic cancer cell proliferation and invasion while inducing senescence: Evidence for senolytic therapy potential in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12102976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasaki Norihiko, Hirabayashi Kenichi, Michishita Masaki, Takahashi Kimimasa, Hasegawa Fumio, Gomi Fujiya, Itakura Yoko, Nakamura Naoya, Toyoda Masashi, Ishiwata Toshiyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Ganglioside GM2, highly expressed in the MIA PaCa-2 pancreatic ductal adenocarcinoma cell line, is correlated with growth, invasion, and advanced stage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19363 ~ 19363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55867-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Norihiko, Gomi Fujiya, Hasegawa Fumio, Hirano Kazumi, Fujiwara Masakazu, Toyoda Masashi, Ishiwata Toshiyuki	4. 巻 522
2. 論文標題 Characterization of the metastatic potential of the floating cell component of MIA PaCa-2, a human pancreatic cancer cell line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 881 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター研究所 老年病学研究チーム 公式ホームページ https://www.tmg Hig.jp/research/team/rounenbyorigaku/ 東京都健康長寿医療センター研究所 老年病理学研究チーム 高齢者がん研究 ホームページ https://ttaggg-rtgp.org/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 紀彦 (Sasaki Norihiko) (80639063)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所) ・東京都健康長寿医療センター研究所 ・研究員 (82674)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------