

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 4 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590870

研究課題名（和文）進行膵癌の幹細胞ならびに EMT 化癌細胞を特異的に老化誘導させる治療法の開発
 研究課題名（英文）Development of the new therapy targeted for pancreatic cancer stem cell and cancer cells with EMT status via induction of cellular senescence.

研究代表者

佐藤 賢一（SATO KENNICHI）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん幹細胞研究部・部長

研究者番号：10282055

研究成果の概要（和文）：EMT 化癌細胞の老化を特異的に誘導する治療法を開発することを最終目的として、期間中に以下のことを行った：1)膵癌の EMT に関連する分子を同定する；2) EMT 関連分子発現値測定による膵癌診断への有用性を検討する；3)EMT が誘導された膵癌細胞が癌幹細胞形質を獲得するか否か検討する。その結果、1) マイクロダイゼクションで分離した浸潤性膵癌細胞で非浸潤 IPMN 細胞に比べ miR126 の発現低下を認めた。膵癌細胞株に miR126 を強制発現させると EMT が抑制されることから、miR126 は EMT 制御分子であることが判明した；2) 膵癌の EMT 誘導分子である MSX2 は、臨床検体でその発現量を解析することによって膵癌診断へ有用であることが示唆されるとともに；3) 膵癌細胞に強制発現させると癌幹細胞形質の一つである抗がん剤耐性を示した。これらの結果は EMT 関連分子の測定が診断に有用であり、EMT 化癌細胞が癌幹細胞と同義の効果的な治療標的となる可能性を示唆するものであった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify the molecules to regulate EMT and the mechanism to control cellular senescence in pancreatic cancer. We revealed that miR 126 was down-regulated in invasive pancreatic cancer compared to non-invasive IPMN. In addition, the expression level of MSX2, inducer of EMT in pancreatic cancer, was found to be utilized for diagnosis of pancreatic cancer. Moreover, MSX2 expressing pancreatic cancer showed the chemoresistance, suggesting that EMT related molecules could be therapeutic target for pancreatic cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵癌、EMT、マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、癌の転移や抗癌剤耐性は癌幹細胞といわれる癌細胞の中でもごくわずか（1%程度）の細胞によってもたらされていることが示唆されている。膵癌においては CD44、CD24、ESA の 3 分子陽性分画や CD133 陽性分画に癌幹細胞が濃縮されているとする報告があるが、未だ結論を得ていない。ごく、最近、乳癌の癌幹細胞として選別される細胞は上皮-間葉形質転換:epithelial to mesenchymal transition (EMT)が誘導されている状態にあること、逆に癌幹細胞以外の癌細胞に対して EMT を誘導すると癌幹細胞の性格を獲得すること、が明らかにされた。すなわち、EMT が起こっている細胞は癌幹細胞と同じ働きをする可能性があるということになり、治療の標的として、癌幹細胞と EMT が誘導された癌細胞は同義ということになる。

一方、哺乳動物から正常な体細胞を取り出し生体外で培養すると、ある一定の回数 of 細胞分裂を繰り返した後に分裂増殖を停止して不可逆的な増殖停止状態に入る。この現象は細胞老化と呼ばれ、古くから正常細胞において発癌に必要な遺伝子変異が起こることを防ぐ安全装置として機能している可能性が指摘されてきた。さらに最近、ras やそのシグナリング経路の下流因子である raf や MEK などの癌遺伝子が活性化した場合、それらの発癌シグナルにより細胞分裂を繰り返すことなく速やかに細胞老化と類似の現象が誘導されることが明らかになってきた。膵癌は K-ras 遺伝子変異を 90%の高頻度で認めることから、通常 ras 遺伝子によって誘導される老化シグナルが膵癌化の際に不活性化

されてしまう機構が存在する可能性がある。そのように、膵癌に特異的に存在する老化阻止機構を明確にすることによって新しい治療法が開発できる可能性がある。

2. 研究の目的

1)膵癌の EMT を特異的に誘導する分子やそれを制御する microRNA(miRNA)を同定する；2)膵癌化において抑制されている細胞老化誘導シグナル機構を解明する；3)最終的に膵癌幹細胞特異的に細胞老化を誘導する治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) EMT 関連 microRNA の同定

IPMA6 例、IPMC6 例、浸潤性膵癌 5 例よりマイクロダイゼクションにて採集した腫瘍腺管と、ヒト膵癌細胞株 5 種より total RNA を抽出し、Agilent 社のマイクロ RNA アレイを用いて発現プロファイルを比較した。クラスター解析により、有意な発現変動を呈するマイクロ RNA を抽出した。

(2)EMT 誘導分子と膵癌診断、治療への応用性の検討

我々が膵癌の EMT 誘導分子として同定した MSX2 の発現値が膵癌診断に有用であるかを、膵管狭窄部に対する擦過細胞診施行時に採取した細胞中の MSX2 mRNA 量を測定することで検討した。また、MSX2 発現細胞の抗がん剤耐性機構について MSX2 強制発現膵癌細胞株を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) EMT 関連 microRNA の同定：マイクロ RNA アレイの結果、浸潤癌において、IPMN と比べ

miR126 の発現が有意に低下していた。miR-126 を膵癌細胞株 Panc-1 および ASPC-1 に強制発現させると細胞遊走能・浸潤能の抑制が確認された。また、これらの細胞では E-cadherin の発現上昇がみられ、EMT が抑制された状態であった。データベース解析により、miR-126 の標的遺伝子として CRK (v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog) やアミノ酸トランスポーターである SLC7A5、細胞接着に関わる ADAM9 が同定された。ADAM9 は miR-126 の強制発現によりその発現が低下していた。

(2) EMT 誘導分子と膵癌診断、治療への応用性の検討：膵管擦過細胞診を施行した 82 例（膵癌 57 例、慢性膵炎 25 例）を対象として MSX2 mRNA 発現値を測定した。ERP 施行時、膵管狭窄部位までガイドワイヤー誘導下に細胞診用ブラシを狭窄部位に挿入し、細胞を採取した。採取した細胞を細胞診用と RNA 量測定用に分け、それぞれの解析を行った。トータル RNA を抽出後、 $2\text{ng}/\mu\text{l}$ に調整した RNA を用い、one-step real-time RT-PCR を施行することにより MSX2 mRNA 発現量を測定した。GAPDH, MSX2 の発現ベクターをスタンダードとして使用し、MSX2 コピー数を GAPDH コピー数で補正した値を発現値とした。その結果、MSX2 は慢性膵炎に比べ膵癌において有意に発現が高いことが確認された。ROC 解析から求めた cut off 値を用いた場合、MSX2 発現値による膵癌診断感度は 73.7%、特異度は 84% であり、細胞診による診断感度 (47.4%) を大きく上回っていた。これらのことから、擦過細胞中の MSX2 発現量測定による膵癌診断に対する臨床応用の可能性が示された。

MSX2 強制発現細胞では癌幹細胞において高発現が報告されているトランスポーター遺伝子、ABCG2 の発現が上昇しており、MSX2 ノックダウン細胞においてはその発現低下

が見られた。MSX2 強制発現細胞においてはゲムシタビンによる 72 時間処理後の細胞増殖抑制効果が 50-70% 減弱していた。これに対し、MSX2 ノックダウン細胞ではゲムシタビンによる細胞増殖抑制効果が 50-100% 増加していた。ABCG2 遺伝子の転写開始点より上流 2kb までに 5 つの MSX2 consensus binding element が確認されたが、それら全てを欠いた deletion mutant でも MSX2 発現ベクターとの co-transfection により reporter 活性の上昇が認められた。転写開始点近傍に存在する SP1 binding element を mutagenesis により除去したところ、reporter 活性の上昇が 50% 抑制された。以上より、MSX2 は ABCG2 発現レベルの制御を介して癌幹細胞形質の一つである抗癌剤耐性を規定している可能性が示された。

以上、我々は、本研究期間中、膵癌における新しい EMT 関連分子を同定した。また EMT 関連分子発現測定による膵癌診断への有用性を示した。さらに、膵癌においても EMT が誘導された癌細胞は抗がん剤耐性などの癌幹細胞形質を獲得することも明らかにした。今後は、これら EMT 化膵癌細胞における老化制御機構の解明による新しい治療法の開発が期待される。

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 5 件)

① Hamada S, Satoh K, Fujibuchi W, Hirota M, Kanno A, Unno J, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Shimosegawa T. MiR-126 acts as a tumor suppressor in pancreatic cancer cells via the regulation of ADM9. Mol Cancer Res 10; 3-10, 2012. 査読有 S

② Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A,

Umino J, Ito H, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Shimosegawa T. The homeobox gene MSX2 determines chemosensitivity of pancreatic cancer cells via the regulation of transporter gene ABCG2. *J Cell Physiol* 227: 729-38, 2011. 査読有

③ Satoh K, Hamada S, Kanno A, Ishida K, Ito H, Hirota M, Masamune A, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T. Evaluation of MSX2 mRNA in brush cytology specimens distinguished pancreatic carcinoma from chronic pancreatitis. *Cancer Sci* 102: 157-61, 2011. 査読有

④ Satoh K, Hamada S, Kanno A, Hirota M, Umino J, Ito H, Masamune A, Egawa S, Motoi F, Unno F, Shimosegawa T. Expression of MSX2 predicts malignancy of branch duct intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *J Gastroenterol* 2010 45: 763-70. 査読有

⑤ Shimosegawa T, Kume K, Satoh K. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer: prediction and mechanism. *Clin Gastroenterol Hepatol*. S23-8, 2009. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① Satoh K, Hamada S, Hirota M, Kanno A, Ito H, Shimosegawa T. The expression level of MSX2 and S100P in brushing samples during ERCP differentiates pancreatic carcinoma from chronic pancreatitis.

DIGESTIVE DISEASE WEEK 2010. 2010 年 5 月 3 日. New Orleans, LA

② Satoh K, Hamada S, Hirota M, Kanno A, Ito H, Shimosegawa T. The application of homeobox gene MSX2 down-regulation as a

therapeutic strategy for pancreatic cancer. Joint meeting of the international association of pancreatology and the Japan pancreas society 2010. 2010 年 7 月 11 日. Fukuoka

③ 佐藤賢一、濱田晋、廣田衛久 miR126 の発現低下は膵癌細胞の浸潤を促進する. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011 年 10 月 5 日. 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 賢一 (SATO KENNICHI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん幹細胞研究部・部長

研究者番号: 10282055

(2) 研究分担者

濱田 晋 (HAMADA SHIN) 2009-2010

東北大学・病院・医員

研究者番号: 20451560

(3) 連携研究者

無