

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 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590871

研究課題名（和文） 膵癌組織中に存在する骨髄由来細胞の網羅的発現解析とそれを標的とする治療法の開発

研究課題名（英文） Bone marrow derived cells in the experimental mouse pancreatic cancer.

研究代表者

廣田 衛久 (HIROTA MORIHISA)

東北大学・病院・助教

研究者番号：70400364

研究成果の概要（和文）：化学発癌物質 DMBA を膵に注入することによりマウス膵癌モデルを作成した。このマウス膵癌モデルにおいて、癌組織の全細胞の約 50%が骨髄由来の細胞で占められていた。それらの細胞を免疫染色にて解析したところ、膵星細胞マーカーの α SMA や上皮マーカーCK19、間質マーカーVimentin は陰性であり、血管内皮細胞マーカーである CD31 やマクロファージのマーカーCD68 が一部の細胞で陽性であった。これらの骨髄由来細胞は癌の浸潤部に多く認められ、癌の進展機序に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced murine pancreatic cancer model was established, which mimicked undifferentiated human pancreatic cancer. Bone marrow derived cells were incorporated in tumor tissue in this model. Almost half of cells in the tumor tissue were derived from bone marrow, which were spindle like morphology resembling cancer cells in this model. By the immunohistochemical analysis, CK19, α -smooth muscle actin (α -SMA) and vimentin were negative in these cells, whereas vascular endothelial marker CD31 and macrophage marker CD68 were positive in a part of these cells. Because the bone marrow derived cells were found in abundant in the invasive edge of cancer, it is possible that these cells play an important role to facilitate the invasion of the cancer cells into the host pancreas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：消化器内科学

キーワード：胆道学、膵臓学

1. 研究開始当初の背景

膵疾患への骨髄由来細胞の関与について、

報告はまだ少ない。最近マウス慢性膵炎モデルを用いた解析で膵組織の線維化に骨髄

由来細胞が関与することが示された。しかし、それがどの様に膵組織の修復、再生に関与するかは依然明らかにされていない。一方膵癌は、組織中に慢性膵炎と類似した多量の線維組織を含んでいるが、これまでところ骨髄由来細胞が癌関連の線維化及び、癌組織中の血管新生の一部に関与していることが報告されているが、膵癌と骨髄由来細胞の関係について全体像は明らかでない。

癌における骨髄由来細胞の役割についてこれまで様々な報告がある。胃癌においては骨髄由来細胞そのものが **Cancer initiating cells**—癌組織における幹細胞；癌幹細胞—として機能しうることが報告されている。マクロファージや形質細胞のような骨髄由来細胞が癌細胞に融合—fusion—することは以前より **in vitro** 実験系で観察されていたことであるが、最近生体内においてもこの機構が成立し、癌細胞の転移などの機序に関与することが報告されている。骨髄由来細胞が癌組織における血管新生に関与することについては多くの報告があるが、最近特に癌幹細胞の **niche** 形成との関連が取り上げられており、癌幹細胞を標的とした治療への応用が注目されている。さらに、骨髄由来の形質細胞などと癌細胞との間の相互関係が注目されている。例えば、癌細胞が発現するケモカインにより癌組織中に遊走、集積した形質細胞が **MMP** を発現し、癌細胞の浸潤を促進することなどが報告されている。このように、骨髄由来細胞は多様な機序で癌進展を促進しうることが考えられている。

慢性炎症が癌の発生母地であることは胃、食道、肝、大腸などの消化器癌では広く認められており、慢性炎症により障害組織中に集積した骨髄由来細胞が発癌機序に何らかの役割を担っている可能性がある。膵における慢性炎症性疾患—慢性膵炎—は年々増加傾向にある難治性疾患であり、日本における慢性膵炎の膵癌発生率は一般人口と比較し 10~20 倍高いことが報告されている。膵癌高発癌群である慢性膵炎患者に対し、膵癌予防医療を行うことができれば膵癌診療に大きなブレイクスルーとなる。

膵癌や慢性膵炎における骨髄由来細胞の関与について網羅的に解析し全体像を明らかにすることにより、病態への理解を深め予防や治療へ結びつける試みが必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では最も予後の悪い癌のひとつである膵癌及びその発生母地である慢性膵炎組織中の骨髄由来細胞がどの様に疾患の発生進展に関与するのか、疾患モデル動物を用いた **in vivo** 実験系で膵組織中の骨髄由来細胞の網羅的発現解析を行い、その結果を治療に応用する試みを行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス膵癌モデルの作成

- 化学発癌モデル：8 週齢の **C57BL/6** にペントバルビタールを腹腔内投与することにより全身麻酔し、開腹、膵尾部を露出し化学発癌物質 **7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)** 1mg を膵尾部の被膜下に注入する。我々が以前に報告しているように、注入後 2 週間で **Tubular complex** が 100% のマウスで観察され、2 ヶ月では 60% のマウスに **carcinoma** が観察される(1)。
- 同所移植モデル：8 週齢のヌードマウス (**BALBnuF6 BALB/c-nu Crj**) を全身麻酔し、膵尾部にヒト膵癌細胞 **Panc1**、**AsPc1**、**Bxpc3** 等を $1-5 \times 10^6$ 個を被膜下に注入することにより同所移植を行う。腫瘍の生着率は細胞の性質により異なる (約 50~100%)。

(2) グリーンマウス骨髄の移植

グリーンマウスは β アクチンプロモーターにより全身の細胞で **EGFP** を発現するトランスジェニックマウスである(2)。生後 5-8 週齢のグリーンマウスの大腿骨、頸骨より骨髄細胞を抽出する。骨髄細胞はメッシュを通すことにより骨片等を除く。**PBS** に懸濁した骨髄細胞 1×10^7 個を、その日に放射線照射 (7Gray/body) した 6 週齢の **C57BL/6** マウスに尾静注により移植する。約 2 ヶ月で骨髄はグリーンマウス由来に置き換わり、その効率は 90~99% である。

(3) マウス慢性膵炎モデルの作成

C57BL/6 に一週間に 5 日間、1 日 1 回 $5 \mu\text{g}$ のセルレインを腹腔内投与し慢性膵炎を誘導する。セルレインは膵に浮腫性膵炎を誘導するが、壊死性膵炎は誘導しない。約 4 週間セルレインを投与することにより

膵臓は著明に萎縮し、線維化が誘導され、慢性膵炎の病態となる。セルレイン注入開始5週以降は週2回投与にて慢性膵炎の状態を維持することができる。

(4) 膵癌組織における骨髄由来細胞の組織学的検討

グリーンマウスの骨髄を移植8週後に、レシピエント C57BL/6 マウスの膵臓には DMBA を、ヌードマウスの膵臓にはヒト膵癌細胞を同所移植する。コントロールとして、生理食塩水を注入したレシピエント C57BL/6 マウスを用いる。注入2週間後、1ヶ月後、2ヶ月後でマウスを解剖。膵組織と形成された膵腫瘍を摘出、パラフィン包埋切片と新鮮凍結切片を作製する。HE染色にて組織を確認、組織中の GFP 陽性細胞を観察する。場合によって、上皮マーカー、血管内皮マーカー、リンパ上皮マーカー、血球系マーカーなどとの二重染色も行い、病理組織学的に GFP 陽性細胞と癌細胞の関連について解析する。

(5) 慢性膵炎を背景とした膵癌組織における骨髄由来細胞の組織学的検討

グリーンマウスの骨髄を移植8週後より、レシピエント C57BL/6 マウスの腹腔内にセルレインを注入し慢性膵炎を形成する。注入4週後にマウスをペントバルビタールで全身麻酔し開腹、DMBA を膵尾部の被膜下に注入する。DMBA 注入後はセルレインを週2回投与に切り替え、DMBA 注入2週後、1ヶ月後、2ヶ月後にマウスを解剖し、1と同様組織学的に解析する。コントロールは DMBA の代わりに生理食塩水を注入するレシピエント C57BL/6 マウスである。このマウスを解析することにより、慢性膵炎における骨髄由来細胞の役割も同時に解析できる。

(6) 膵組織からの骨髄細胞の抽出

グリーンマウスから抽出した骨髄細胞に、細胞内ドメインを短縮したマウス MHC クラス I 分子 H-2K^k (発現はマウス ALR/J あるいは CBA/J 系統に限られる) 発現ベクター (MACSelect™K^k System) をエレクトロポレーション法にて遺伝子移入する。その骨髄を放射線照射した C57BL/6 マウス、BALBc ヌードマウスに移植する。その後前年と同様に DMBA 発癌法あるいはヒト膵癌同所移植法により膵癌を作成する。膵組織を摘出し、コラゲナーゼで処理した後 27G 注射針で注入排出を繰り返し十分に懸濁する。細胞懸濁液をメッシュで濾過した後 MACS システムにより H-2K^k 蛋白を発現している細胞＝骨髄由来細胞を抽出

する。

(7) 網羅的解析

MACS システムを用いて収集した癌組織中の骨髄由来細胞から RNA を抽出する。cDNA マイクロアレイを外注する。コントロールは、マウス H-2K^k 発現ベクターをトランスフェクトし、MACS システムにて収集したグリーンマウス骨髄細胞から抽出した RNA を用いる。

(8) 膵癌組織での骨髄由来細胞特異的なターゲッティング

網羅的な解析により、膵発癌進展機序に関係すると考えられる遺伝子について、shRNA を作製、テトラサイクリンにより発現誘導されるシステムのレンチウイルスベクターに組み込んで、マウス骨髄細胞に感染させる。この骨髄を移植したマウスに DMBA を注入あるいはヒト膵癌同所移植を行った後、テトラサイクリンを投与、shRNA を発現させ目的遺伝子をターゲッティングする。

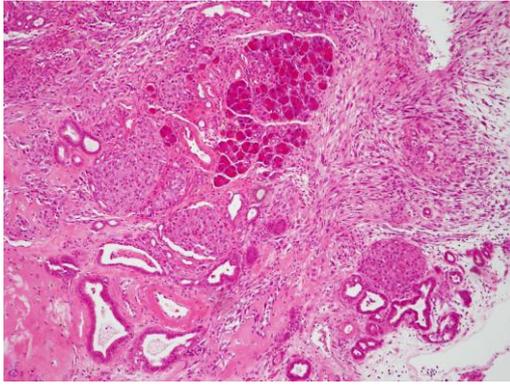
(9) 骨髄由来細胞が発現し、膵組織内で膵癌進展を促進する因子の同定

上記方法にてマウス膵癌組織中における骨髄細胞を抽出し、網羅的解析を行う。コントロールの RNA はグリーンマウス骨髄に H-2K^k 発現ベクターをトランスフェクトし、MACS システムにより収集した骨髄細胞から抽出する。実験対象は 1) DMBA 発癌モデルから抽出した骨髄由来細胞の RNA。2) ヒト膵癌同所移植モデルから抽出した骨髄由来細胞の RNA。3) セルレイン投与により作製したマウス慢性膵炎モデルの膵臓から抽出した骨髄由来細胞の RNA。4) 慢性膵炎の膵臓に DMBA を注入した慢性膵炎発癌モデルの RNA。これらの RNA を網羅的に発現解析する。コントロールに比較し膵癌(あるいは慢性膵炎)組織で特異的に発現が亢進している遺伝子については定量的 RT-PCR にて発現を確認する。

4. 研究成果

(1) マウスモデルの樹立

7週齢の C58BL/6J マウスの膵尾側に、DMBA 1mg を注入することで、注入3ヶ月後には脾臓等周囲の臓器に浸潤する膵腫瘍の形成を認めた。この腫瘍を組織学的に検討すると、腫瘍細胞は紡錘形の肉腫様変化をした低分化な癌 (Sarcomatoid carcinoma) で、癌細胞を取り巻く線維化を認めた。また、膵組織には癌のみならず、異形腺管や過形成病変といった前癌病変の像も多数認めた (図1)。

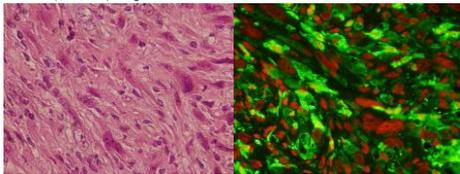


同時にセルレインを週5回、8週間投与することによるマウス慢性膵炎モデルも作成に成功した。しかし、DMBAモデルによる膵癌モデルにおいても、相当な炎症の影響が組織内に同定されたため、以後はDMB膵癌モデルを用いて実験を行った。

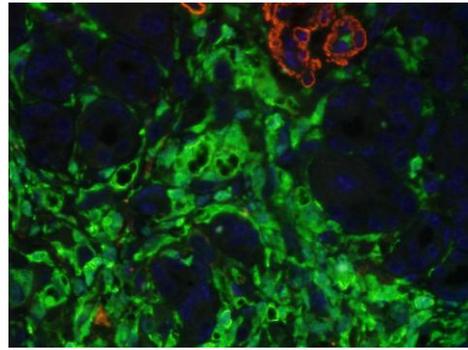
(2) 膵癌組織における骨髄由来細胞の組織学的検討

生後7週のグリーンマウスの骨髄細胞10,000,000個を抽出し、7Grayの放射線を照射した生後8週のC57BL6マウスに尾静注することにより移植した。FACS解析で骨髄が99%置換されたキメラマウスが作製されたことを確認した。骨髄移植から2ヶ月後、マウスを麻酔科に開腹し、DMBA 1mを膵尾部に注入し、その3か月後に解剖し膵尾部に形成した腫瘍を免疫組織学的に解析した。

まず、紡錘形の形態を示す癌組織を抗GFP抗体を用いて解析したところ、抗腫瘍組織の約50%の細胞がGFP陽性であった(図2)。

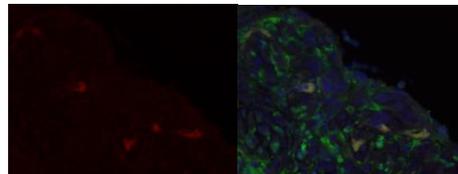


このような、紡錘形の腫瘍細胞に類似したGFP陽性の骨髄由来細胞は、腫瘍組織内だけでなく、metaplastic changeした腺管周囲の間質にも多数認めること、癌の膵内での浸潤部位に一致して特に多数認めること(図3)から、



特に発癌や浸潤機序において癌細胞とinteractionし、癌進展機序に重要な働きをしていると考えられた。

そこで次に、このGFP陽性骨髄由来細胞のキャラクターを免疫組織学的に解析した。その結果、抗CK19抗体は陰性、抗SMA抗体陰性、抗Vimentin抗体陰性、抗CD31抗体及び抗CD68抗体はごく一部で陽性であった(抗CD31抗体陽性は5%以下、抗CD68抗体陽性は約15%)(図4:左図、抗CD68抗体染色、右図、GFPとのmerge)。



従って、骨髄由来細胞の一部は血管内皮細胞として腫瘍血管内に取り込まれること、一部は骨髄由来のマクロファージとして腫瘍内に存在することが分かったが、依然として70%以上の癌組織中、骨髄由来細胞がどのようなキャラクターを有しているのかが不明である。

そのため、実験計画通り、癌組織中のGFP陽性細胞を抽出し、網羅的発現解析を行うために準備を進めていたが、2011年3月11日の東日本大震災により、当施設における動物実験施設が壊滅的な被害を受け、動物実験が行えなくなったこと、震災による停電のため自施設内の冷凍庫、冷蔵庫が使用不可となり、凍結組織をはじめとする検体などが全て失われたことにより、実質的にこれ以上の実験を継続することが不可能となった。

最終年は、研究分担者が行っている、本研究と関連する膵癌細胞株(液体室素の中で生

き延びた)を用いた、癌幹細胞関連の研究をおこない発表した。また、本研究でも骨髄由来細胞の一部が血管内皮の性格を持つことが明らかとなったが、慢性炎症や腫瘍形成に伴う膵の血流の変化を解析する目的で、膵の血流解析も行っているが、その臨床研究の成果を報告した。

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2件)

① 濱田晋, 佐藤賢一, 廣田衛久, 他. The homeobox gene *MSX2* determines chemosensitivity of pancreatic cancer cells via the regulation of transporter gene *ABCG2*. Journal of Cellular Physiology. 査読有, 227 巻, 2012 年, 729-738.

② 廣田衛久, 他. Perfusion computed tomography findings of autoimmune pancreas. Pancreas. 査読有, 49 巻, 2011 年, 1295-1301.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 衛久 (HIROTA MORIHISA)

東北大学・病院・助教

研究者番号：70400364

(2) 研究分担者

濱田 晋 (HAMADA SHIN)

東北大学・病院・医員

研究者番号：20451560

菅野 敦 (KANNO ATSUSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：70509190

(3) 連携研究者