

## 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25年5月13日現在

機関番号：90101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590754

研究課題名（和文） 膵がん自然発症マウスによる「骨髄攪乱」を介した  
悪性化機構の解明とその制御

研究課題名（英文） Role of bone marrow-derived cells during pancreatic tumorigenesis

研究代表者

水上 裕輔（MIZUKAMI YUSUKE）

医療法人 徳洲会 札幌東徳州会病院附属臨床研究センター・再生医療研究部・部門長

研究者番号：30400089

研究成果の概要（和文）：

膵癌でみられる特徴的な間質は、その難治性に影響を及ぼす。我々は、膵癌の新しい診断・治療体系および創薬スクリーニング系の構築を目指し、膵癌を自然発症する遺伝子改変マウスを用い、悪性間質の成り立ちを「原発巣による骨髄攪乱」という観点から検証した。膵癌およびその初期病変 PanIN 由来の異形膵管（初代培養細胞）と骨髄を得て、PanIN から浸潤癌に至る過程で生じる「骨髄攪乱」とこれに引き続く腫瘍局所での「間質前駆細胞の教育」を解析した。その結果、腫瘍を有する個体では肉眼的腫瘍を形成する以前より骨髄前駆細胞の初期活性化がみられ、これらが腫瘍に局在した際にみられるシグナルの一部を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Tumor-derived factors affect the stroma of cancer tissue. One of the key components of this response is the mobilization of the progenitors from the bone marrow (BM), which contribute toward the development of desmoplastic stroma. These BM-derived cells are involved in normal physiological processes such as tissue repair and wound healing; however, in cancer bearing hosts, these cells actively contribute toward the chaotic microenvironment. Using genetically engineered mice models for pancreatic cancer, we found that BM-progenitors are passively activated by even early stage tumors. We have identified the signaling pathways by which BM-derived cells are recruited and activated to establish malignant stroma in later stages of tumor development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：消化器内科学、腫瘍学

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、間質、骨髄、遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

膵発癌を考える上で、前駆病変である PanIN がどのような過程を経て浸潤癌となるかが重要である。しかし、早期膵癌の診断は未だ困難であり、悪性化の過程を「臨床的」に捉えることは困難である。このため膵癌の予後改善には、病態解明のため適切なモデルを用いて診断や治療、さらに創薬スクリーニングに関わる知見を得ることが必要である。

膵発癌の初期イベントとして、KRAS の点突然変異は重要な役割を担う。我々はこれまでに、変異型 KRAS シグナルが低酸素応答と血管新生を誘導する重要な分子メカニズムを見だし (Mizukami Y, Cancer Res 2004, Gastroenterol 2005, J Biol Chem 2006)、また、KRAS 癌遺伝子が血管新生経路の障害下での代償経路を誘導する key molecule であることを明らかにしてきた (Mizukami Y, Nat Med 2005)。膵管上皮特異的にこの癌遺伝子を発現する Pdx1-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup> マウスでは非浸潤性の異形膵管上皮が見られ、これはヒト膵癌の初期病変 PanIN に類似する。これらのヒト、およびマウスの初期病変には器官形成因子である Sonic hedgehog (Shh) の過剰発現が観察され、Hedgehog 経路は KRAS による膵発癌の重要な下流経路と考えられる (Theyer S, Nature 2005)。膵前癌病変あるいは膵癌細胞の産生する Shh は腫瘍細胞の自律性増殖を促進すると考えられてきたが、我々は、ヒト膵癌では Hedgehog リガンドが骨髄由来細胞の動態制御を介して血管新生に関わること (Yamazaki M, Cancer Sci 2008)、マウス移植腫瘍モデルにおいてこの経路を阻害すると、骨髄由来細胞の新生血管への局在障害、機能異常を介して、腫瘍血管が不安定化することを明らかにした (Nakamura K, PLoS One 2010)。すなわち、Shh は間質に対する paracrine 効果を介して、自らの生存に適した微小環境を構築すると考えられる。

それでは、このような paracrine 効果は、膵発癌のどの時点で活性化するのであろうか？また、その標的細胞となる骨髄由来細胞は、どのようにして胎生期にみられる器官形成シグナルへの応答性を獲得するのであろうか？

この疑問に取り組む上で、発癌のステージを段階的に再現する必要があった。そこで、KRAS 癌遺伝子を発現する、上記マウスモデルに加え、浸潤・転移を来す管状腺癌を自然発症する Pdx1-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup>;p53<sup>lox/+</sup> マウスを導入し、膵癌進展の時間軸を得た。これまでに発癌、癌の進展における原発巣と骨髄との関連をみた報告がいくつかあった。代表的なものとして、「骨髄攪乱」の結果として、

間質誘導能と転移能を獲得するという報告 (McAllister SS, Cell 2008)、骨髄細胞の活性化を介した薬剤抵抗機構などの重要な知見 (Shojaei F, Nature 2007) があげられる。しかし、これらの多くが免疫不全マウスを用いた移植腫瘍により得られた結果に基づく。正常の免疫監視機構のもとで悪性形質獲得への過程を再現できるモデルを用いることで、癌細胞と間質構成要素 (前駆細胞) を供給する骨髄を介したクロストークの解明を試みることにした。

## 2. 研究の目的

第一に、膵癌初期病変が、浸潤能をはじめとする生物学的な悪性度を獲得する過程で、骨髄において癌間質に供給される前駆細胞の活性化がみられるという仮説を検証する。このために、膵前癌病変 PanIN および浸潤性膵管癌を発症した遺伝子改変マウスの骨髄細胞を用いて、癌間質へ供給される Lin 陰性 cKit 陽性の前駆細胞分画 (Lin-cKit+) における遺伝子発現の変化、細胞機能の変化を比較する。

第二に、PanIN および浸潤性膵管癌の初代上皮培養細胞を樹立し、これらを用いてオミクスデータベースを作成する。このなかから、骨髄から供給される間質細胞の活性化に関わる因子を割り出す。さらに、これらの因子が、ヒト膵癌の進展過程において認められるか、切除組織ならびに血液検体を用いて検証し、そのバイオマーカーとしての意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

膵癌およびその前駆病変 PanIN を有する個体を得るため、以下の 2 種類の遺伝子改変マウスを用いる。

- Pdx1-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup>; PanIN モデル
- Pdx1-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup>;p53<sup>lox/+</sup>; 膵癌モデル

PanIN モデルでは 7 週齢頃より膵に focal な軽度異型病変 PanIN-1 を認め、12 週齢には中等度異型病変 PanIN-2 の出現を広範にみる。一方、膵癌モデルでは 12 週齢までに浸潤性管状腺癌を自然発症し、その後、肝や腹膜に転移性病変を生じる。これらのマウスを用いることで、前癌病変から上皮内癌への過程、さらに浸潤・転移に至る「がん進展の時間軸」を再現する。

各 strain より、骨髄細胞を採取し、密度勾配遠心法により得た単核球分画から磁気

ビーズ付着抗体を用いて Lin-cKit+陰性分画を純化する。これらの骨髄前駆細胞より RNA を抽出し、遺伝子解析を行う。同時に、基質への接着性や各種増殖因子への応答を原発巣におけるグレードと比較検証する。

また、各膝腫瘍組織より異形膝管上皮の初代培養細胞を得て、マイクロアレイ解析を行う。この中から、骨髄前駆細胞 (Lin-cKit+細胞) の活性化に関わる因子を抽出し、膝管間質 (desmoplasia) の形成のモニタリングが可能かを検証する。

また、インフォームドコンセントのもと、外科切除標本ならびに血液試料を用いて、上記遺伝子改変マウスから得られた結果が、ヒト膝癌において再現されるかを検証する。

#### 4. 研究成果

1 2 週齢の Pdx-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup> マウス、Pdx-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup>;p53<sup>lox/+</sup> マウスは、それぞれ PanIN および浸潤性膝管癌を自然発症することを組織学的に確認した。実際に腫瘍病変が確認された個体より採取した骨髄 Lin-cKit+単核球 (前駆細胞) を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、コントロールマウス (Pdx-Cre マウスおよび LSL-Kras<sup>G12D</sup> マウス) との間に顕著な差を認めた。この中から細胞外基質への接着性に関わる遺伝子が抽出されたため、*in vitro* での機能的な評価を行った。Collegen への接着性が健常個体に比較して PanIN 病変を有する個体、浸潤癌を有する個体と段階的に亢進することが確認された。

さらに、これまでに明らかにしてきたように、膝癌に局在する骨髄前駆細胞に Hedgehog 経路の活性化がみられることから、骨髄における前駆細胞において、同系路に関わる遺伝子発現に変化がみられるかを定量的 RT-PCR により解析した。その結果、PanIN および膝癌を有する個体由来の細胞において、Gli 転写メディエーターの活性化に必要な遺伝子発現が健常マウスに比較して高いことが確認された。Gli1 および Gli2 の mRNA 発現レベルは、健常マウス、PanIN マウス、膝癌マウスにおいて差は認められなかったが、リコンビナント Shh および Smoothed Agonist (SAG) による、Gli1 mRNA の誘導は、PanIN、膝癌由来の骨髄前駆細胞においてのみ確認された。このことから、膝癌発症の早期段階において、既に骨髄前駆細胞の活性化がみられることが示唆された。

次に 1 2 週齢の Pdx-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup> マウス (n=3)、Pdx-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup>;p53<sup>lox/+</sup> マウス (n=3) より既報に従い EpCAM+膝腫瘍腺管を organoid 単位で分離し、これらを用いてマイクロアレイ解析結果を行った。PanIN 病

変および膝癌 (浸潤癌) 由来の organoid では、異なった遺伝子発現プロファイルがみられた (未発表のため、遺伝子名は示さない)。Hedgehog 経路の活性化に関わる因子の有無を探索したところ、Shh リガンドの作用に関わる遺伝子発現に両群間に差を認めた。この遺伝子発現の差は、免疫組織学的にも確認され、浸潤癌に至る過程でこの分子の発現が Shh の骨髄由来前駆細胞への作用を調製している可能性が示唆された。この分子の発現の差は、ヒト膝腫瘍、すなわち非浸潤性の膝管内乳頭粘液性腫瘍と浸潤性膝管癌との間にも確認された。

#### 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 15 件; すべて査読あり)

- 1) Moriichi K, Fujiya M, Sato R, Nata T, Nomura Y, Ueno N, Ishikawa C, Inaba Y, Ito T, Okamoto K, Tanabe H, Mizukami Y, Watari J, Saitoh Y, Kohgo Y. Autofluorescence imaging and the quantitative intensity of fluorescence for evaluating the dysplastic grade of colonic neoplasms. *International Journal of Colorectal Disease* 27, 325-30 (2012) DOI: 10.1007/s00384-011-1311-8.
- 2) Okamoto K, Fujiya M, Nata T, Ueno N, Inaba Y, Ishikawa C, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Chang EB, Kohgo Y. Competence and sporulation factor derived from *Bacillus subtilis* improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *International Journal of Colorectal Disease* 27; 1039-1046 (2012) DOI: 10.1007/s00384-012-1416-8.
- 3) Duerr EM, Mizukami Y, Moriichi K, Gala M, Jo WS, Kikuchi H, Xavier RJ, Chung DC. Oncogenic KRAS regulates BMP4 expression in colon cancer cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 302 (10); G1223-30 (2012) DOI: 10.1152/ajpgi.00047. 2011.
- 4) Motomura W, Yoshizaki T, Takahashi N, Kumei S, Mizukami Y, Jang SJ, Kohgo Y. Analysis of vanin-1 upregulation and lipid accumulation in hepatocytes in response to a high-fat diet and free fatty acids. *J Clin Biochem Nutr* 51:163-9 (2012) DOI:

- 10.3164/jcbrn.12-06.
- 5) Mizukami Y. Bone marrow-derived proangiogenic cells in pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol. Suppl* 2:23-6 (2012) DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.07012.x.
  - 6) Mizukami Y, Sasajima J, Ashida T, Kohgo Y. Abnormal tumor vasculatures and bone marrow-derived pro-angiogenic cells in cancer. *International Journal of Hematology* 95, 125-30 (2012) DOI: 10.1007/s12185-012-1017-x. Karasaki H, Mizukami Y, Tokusashi Y, Koizumi K, Ishizaki A, Imai K, Yoshikawa D, Kino S, Sasajima J, Tanno S, Matsumoto K, Miyokawa N, Kono T, Kohgo Y, Furukawa H. Localization of the most severely dysplastic/ invasive lesions and mucin phenotypes in intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas. *Pancreas* 40: 588-94 (2011) DOI: 10.1097/MPA.0b013e31820d1a03
  - 7) Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Nata T, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Kobayashi N, Ito K, Kohgo Y. Heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. *Inflamm Bowel Dis* 17: 2235-50 (2011) DOI: 10.1002/ibd.21597
  - 8) Sato K, Torimoto Y, Hosoki T, Ikuta K, Takahashi H, Yamamoto M, Ito S, Okamura N, Ichiki K, Tanaka H, Shindo M, Hirai K, Mizukami Y, Otake T, Fujiya M, Sasaki K, Kohgo Y. Loss of ABCB7 gene: pathogenesis of mitochondrial iron accumulation in erythroblasts in refractory anemia with ringed sideroblast with isodicentric (X)(q13). *Int J Hematol* 93:311-8 (2011) DOI: 10.1007/s12185-011-0786-y
  - 9) Sato R, Fujiya M, Watari J, Ueno N, Moriichi K, Kashima S, Maeda S, Ando K, Kawabata H, Sugiyama R, Nomura Y, Nata T, Itabashi K, Inaba Y, Okamoto K, Mizukami Y, Saitoh Y, Kohgo Y. The diagnostic accuracy of high-resolution endoscopy, autofluorescence imaging and narrow-band imaging for differentially diagnosing colon adenoma. *Endoscopy* 43: 862-8 (2011) DOI: 10.1055/s-0030-1256510
  - 10) Nakamura K, Sasajima J, Mizukami Y, Sugiyama Y, Yamazaki M, Fujii R, Kawamoto T, Koizumi K, Sato K, Fujiya M, Sasaki K, Tanno S, Okumura T, Shimizu N, Kawabe J, Karasaki H, Kono T, Ii M, Bardeesy N, Chung DC, Kohgo Y. Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells. *PLoS One* 5; e8824 (2010) DOI: 10.1371/journal.pone.0008824
  - 11) Sakamoto J, Fujiya M, Okamoto K, Nata T, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Watari J, Ashida T, Kohgo Y. Immunoprecipitation of nucleosomal DNA is a novel procedure to improve the sensitivity of serum screening for the p16 hypermethylation associated with colon cancer. *Cancer Epidemiology* 34; 194-9 (2010) DOI: 10.1016/j.canep.2010.01.004
  - 12) Inaba Y, Ashida T, Ito T, Ishikawa C, Tanabe H, Maemoto A, Watari J, Ayabe T, Mizukami Y, Fujiya M, Kohgo Y. Expression of the antimicrobial peptide alpha-defensin/cryptidins in intestinal crypts decreases at the initial phase of intestinal inflammation in a model of inflammatory bowel disease, IL-10-deficient mice. *Inflammatory Bowel Disease* 16: 1488-95 (2010) DOI: 10.1002/ibd.21253
  - 13) Tanno S, Nakano Y, Sugiyama Y, Nakamura K, Sasajima J, Koizumi K, Yamazaki M, Nishikawa T, Mizukami Y, Yanagawa N, Fujii T, Obara T, Okumura T, Kohgo Y. Incidence of synchronous and metachronous pancreatic carcinoma in 168 patients with branch duct intraductal papillary mucinous neoplasm. *Pancreatology* 10: 173-8 (2010) DOI: 10.1159/000231982
  - 14) Tanno S, Nakano Y, Koizumi K, Yamazaki M, Nakamura K, Sasajima J, Nishikawa T, Mizukami Y, Yanagawa N, Fujii T, Obara T, Okumura T, Kohgo Y. Pancreatic ductal adenocarcinomas in patients with branch duct intraductal papillary-mucinous neoplasms. *Pancreas* 39; 36-40 (2010) DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181b91cd0
  - 15) Sasajima J, Mizukami Y, Sugiyama Y, Nakamura K, Kawamoto T, Koizumi K, Fujii R, Motomura W, Sato K, Suzuki Y, Tanno S, Fujiya M, Sasaki K, Shimizu N,

Karasaki H, Kono T, Kawabe JI, Ii M, Yoshiara H, Kamiyama N, Ashida T, Bardeesy N, Chung DC, Kohgo Y. Transplanting normal vascular proangiogenic cells to tumor-bearing mice triggers vascular remodeling and reduces hypoxia in tumors. *Cancer Research* 70; 6283-92 (2010) DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0412

[学会発表] (計 13 件)

- 1) Mizukami Y, Kawamoto T, Sugiyama Y, Sasajima J, Koizumi K, Moriichi K, Fujiya M, Bardeesy N, Chung DC, Kohgo K. Transplantation of pro-angiogenic monocytes to pancreatic cancer-bearing mice attenuates resistance to chemotherapy/radiotherapy. 2011 Gastrointestinal Cancers Symposium (January 20 - 22, 2011 in San Francisco, CA.)
- 2) 水上裕輔. 腫瘍血管「修復」による低酸素の解除 第8回がんとハイポキシア研究会 シンポジウム (2011年1月29日; 札幌)
- 3) Sugiyama Y, Mizukami Y, Kawamoto T, Sasajima J, Koizumi K, Nomura Y, Moriichi K, Fujiya M, Bardeesy N, Chung DC, Kohgo Y. The paracrine effect of hedgehog on bone marrow-derived stromal cells occurs at later stages of pancreatic tumorigenesis. *Digestive Disease Week 2010, Topic Forum: Biology of the Pancreas* (May 10, 2011; Chicago, IL)
- 4) 水上裕輔. Angiogenesis & Stemness in Pancreatic Cancer: Role of Bone Marrow-derived Cells. 第63回日本細胞生物学会大会 MS5 血管の多様性～組織発生から疾患におけるダイナミクス (2011年6月29日; 札幌)
- 5) Mizukami Y. Bone marrow-derived proangiogenic cells in pancreatic cancer. The 6th International Symposium on ALPD and Cirrhosis; Session-1: Stem cells in ALD, liver and pancreatic cancer. (October 20 and 21, 2011; Fukuoka, Japan)
- 6) Sasajima J, Mizukami Y, Nakamura K, Sugiyama Y, Kawamoto T, Koizumi K, Sato K, Tanno S, Karasaki H, Kono T, Ii M, Chung DC, Bardessy N, and Kohgo Y. Activation of Hedgehog pathway in tumor vasculature is a late event of pancreatic tumorigenesis. AACR Annual Meeting 2010, Poster Session 19 (April 20, 2010 in Washington DC)
- 7) Sugiyama Y, Mizukami Y, Sasajima J, Kawamoto T, Koizumi K, Fujiya M, Tanno S, Karasaki H, Kono T, Bardessy N, Chung DC, and Kohgo Y. The Tumor Vasculature is a Paracrine Target of Hedgehog in Pancreatic Cancer. Distinguished Abstract Plenary, NOTCH AND SHH SIGNALING IN GASTROINTESTINAL HOMEOSTASIS (May 4, 2010 in New Orleans, LA); *Gastroenterology* Vol. 138, Issue 5, Supplement 1, Pages S-116-S-117
- 8) Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Nata T, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Kobayashi N, Ito K, Kohgo Y. Heat-Killed Body of *Lactobacillus brevis* Sbc8803 Contributes to Maintain Intestinal Homeostasis and Improve Intestinal Injury in a Murine Model of Colitis. AGA Poster Session (May 4, 2010 in New Orleans, LA); *Gastroenterology* Vol. 138, Issue 5, Supplement 1, Page S-619
- 9) Mizukami Y. Transplanting normal vascular proangiogenic cells to tumor-bearing mice triggers vascular remodeling and reduced hypoxia in tumors. 16th International Vascular Biology Meeting. Plenary session: Status quo in Tumor Angiogenesis (June 24, 2010 in Los Angeles, CA)
- 10) 水上裕輔, 笹島順平、杉山祥晃、河本 徹、伊井正明、高後 裕. 膵癌間質における Hedgehog の paracrine 経路は自然発症膵発癌の後期段階で活性化する. 第19回日本がん転移学会学術集会 ポスター発表 (2010年6月19日; 金沢)
- 11) Mizukami Y, Sasajima J, Sugiyama Y, Nakamura K, Kawamoto T, Koizumi K, Sato K, Suzuki Y, Fujiya M, Sasaki K, Torimoto Y, Karasaki H, Kono T, Kohgo K. Transplanting normal vascular proangiogenic cells to tumor-bearing mice triggers vascular remodeling and reduced hypoxia in tumors. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society (ACOS), Mini Symposium 8; Recent advances in pancreatic cancer (Aug 26, 2010; Gifu)
- 12) 水上裕輔, 笹島順平、高後 裕. 腫瘍血管リモデリングは腫瘍低酸素を解除し、がん幹細胞様形質を軽減する. JDDW2010 S10 (日本消化器病学会) 消化器癌における幹細胞研究の現状 (2010年10月14日; 横浜)

- 13) Mizukami Y. ANGIOGENESIS & STEMNESS IN PANCREATIC CANCER: THERAPEUTIC IMPLICATIONS. The 1st JSGE International Topic Conference, Plenary Session III, Pancreas (1) (Oct 25, 2010; Kamakura)

[その他]

ホームページ等

[http://www.higashi-tokushukai.or.jp/clinical\\_study/index.php](http://www.higashi-tokushukai.or.jp/clinical_study/index.php)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水上 裕輔 (MIZUKAMI YUSUKE)

医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院附属  
臨床研究センター・再生医療研究部・部門長  
研究者番号：30400089

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

伊井 正明 (II MASA AKI)

大阪医科大学・薬理学・講師

研究者番号：10442922