

## 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 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591519

研究課題名（和文） 膵癌における内分泌系転写因子の発現意義と癌幹細胞との関係

研究課題名（英文） Correlation between expression of exocrine progenitor genes and cancer stem cells in pancreatic cancer.

研究代表者

和田 浩志（WADA HIROSHI）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00572554

研究成果の概要（和文）：

膵癌における膵内分泌系 progenitor gene と膵癌幹細胞マーカーの発現について検討した。術前放射線化学療法を施行した症例では、CD44 陽性を示す癌細胞が多く存在し、Pdx1 陽性のものは、周囲への浸潤傾向が乏しかった。Pdx1 と CD44 の発現に相関は認めなかったが、Pdx1 陰性かつ CD44 陽性の症例では、無再発生存率、全生存率ともに不良であった。膵癌において Pdx1 の発現は直接的な悪性度を示唆する因子ではなかったが、Pdx1 発現を認めず、さらに膵癌幹細胞マーカーを発現している症例では、悪性度が高い可能性が示唆された。すなわち、Pdx1 などの内分泌系 Progenitor Gene を遺伝子導入することで、膵癌の悪性度を低下させる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the expression of exocrine progenitor genes and cancer stem cells markers in pancreatic cancer. CD44-positive cells were enriched after preoperative chemo-radiation therapy (CRT). Pdx1 positive tumors tended to limit to pancreas after CRT. There was no correlation between expression of Pdx1 and CD44. CD44-positive tumors without expression of Pdx1 were poor prognosis. These results suggested that transfection of exocrine progenitor genes may decrease its malignant behavior in pancreatic cancer.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，消化器外科学

キーワード：膵臓外科学，膵癌，癌幹細胞，膵内分泌腫瘍，progenitor gene，転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は消化器癌の中でも非常に予後が悪く、根治切除を施行しても 5 年生存率は 20%

に満たない。そのため抗癌剤をはじめ、分子標的治療薬など様々な集学的治療が試みられているが、多くの膵癌は治療抵抗性であり

奏効率 は 20-30%程度と良好な結果とは言えない。膵癌における治療抵抗性の解明と、膵癌の持つ生物学的悪性度のコントロールは、治療成績向上の為には非常に重要な課題である。教室では、これまで膵癌の治療抵抗性や悪性度について研究を行い、DNA 合成遺伝子である RRM1 が膵癌において gemcitabine 抵抗性と生物学的悪性度の双方に關与していることを見出した (Akita et al. Oncogene2009)。また近年、癌は一部の多分化能を有する癌により支配され、それらを中心に癌の heterogeneity を形成するという癌幹細胞仮説が提唱されており (Reya T et al. Nature2001)、癌幹細胞は正常のどのような細胞から発生しているのかという研究も最近盛んに行われている。Barker らは大腸癌は大腸粘膜の陰窩に存在する正常幹細胞から発生したと報告した (Barker et al. Nature2009)。膵臓においては、膵芽細胞から膵外分泌系細胞と膵内分泌系細胞に分化することが分かっており、各段階における転写因子などもある程度解明されている。Pdx1 は膵臓の幹細胞である膵芽細胞の段階から高発現し、Pdx1 ノックアウトマウスでは膵臓の形成が行われず、膵形成に不可欠な遺伝子である。膵癌においては Pdx1 の発現が予後に関係するとの報告もあり、癌幹細胞と関係している可能性も示唆されている。また preliminary に行った免疫染色では、一部の膵癌において膵内分泌系の progenitor gene の一つである NeuroD1 の発現が認められた。通常外分泌系細胞においては発現のない内分泌系 progenitor gene が膵癌において発現しているとすれば、それらを発現している細胞は、癌細胞の中でも未分化なもの、すなわち癌幹細胞である可能性が示唆される。現在まで報告されている癌幹細胞マーカーにおいては、機能が解明されているものは少なく、Pdx1 の様に直接、分化に関係するような遺伝子が幹細胞マーカーであることが証明されれば、癌の発生の仕組みが解明される。

膵発生における転写因子さらにこれらの progenitor gene を癌に遺伝子導入することにより未分化性の獲得や内分泌系細胞への形質転換がなされれば、遺伝子治療による新たな治療の開発の可能性が広がると考えられる。

## 2. 研究の目的

膵癌における膵内分泌系 progenitor gene (Pdx1, Ngn3, NeuroD1, Mafa など) の発現意義と癌幹細胞との関係性の解明し、さらにこれら progenitor gene を遺伝子導入することによる膵癌の形質転換の可能性を検証することにより、遺伝子導入による膵癌の新規治療開発の可能性を模索する。

## 3. 研究の方法

まず膵癌における内分泌系転写因子の発現程度を検討するため、膵癌細胞株および膵癌切除サンプルを用いてこれら内分泌系マーカーの発現を RT-PCR 法, Western blot 法, 免疫組織学的染色法を用いて検索する。

次に未分化性との関連を検討するため、既知の膵癌幹細胞マーカーとの発現相関や膵癌幹細胞でのこれら内分泌系 progenitor gene の発現状況を調べる。さらに抗癌剤感受性、増殖能、浸潤能について MTT assay 法, invasion assay 法などを用いて検討する。

更に膵癌細胞株においてこれら Pdx1, Ngn3, Mafa 遺伝子などを導入することにより未分化性の獲得、さらには内分泌系腫瘍への形質転換が可能かを膵癌幹細胞マーカー (CD24, CD44, CD133), ホルモン分泌能 (Insulin, Glucagon) および膵島特異的表面マーカー (Isl1) を用いて検討する。最後に臨床膵癌サンプルを NOD/SCID マウスに生着させ、これらに Pdx1 等を遺伝子導入することで膵癌の形態および機能、抗癌剤感受性などがどのように変化するかを検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 膵癌臨床サンプルにおける Pdx1 発現意義

教室で切除した浸潤性膵管癌 48 例を対象として、Pdx1 の発現を切除標本パラフィン包埋切片を用いて免疫組織化学染色法にて検討した。平均年齢は 66 歳 (38-84 歳)、男女比は 28:20。術前治療として放射線化学療法を 28 例に施行。20 例が術前治療なしであった。Pdx1 の発現は、膵癌細胞の核内に局在しており、48 例中 45 例 (94%) に発現を認めた。核内染色の程度では、強発現 16 例 (33%)、弱発現 29 例 (60%) であった。強発現の 16 例を Pdx1 陽性として、陰性 32 例の 2 群間で、臨床病理学的因子について比較検討した。年齢・性別・腫瘍径・腫瘍分化度などに差を認めなかったが、術前治療を施行した 27 例では、Pdx1 陽性では、T1-2 が 6 例、T3-4 が 3 例であり、陰性群と比較して有意に T1-2 が多かった ( $p=0.006$ )。全生存率、無再発生存率に関しては 2 群間で有意差を認めなかった。治療前の腫瘍因子は、27 例全例が T3-4 であったことから、Pdx1 陽性例では、放射線化学療法に感受性を示して腫瘍縮小効果が得られた可能性があると考えられる。

### (2) 膵癌切除標本における癌幹細胞マーカー CD24/CD44 発現に関する検討

膵癌切除標本を用いて免疫組織染色にて膵癌幹細胞マーカーである CD24 および CD44 の発現について検討した。CD24 は、ほとんどの症例で発現を認めなかったのに対して、CD44 は、43 例中 25 例 (58.1%) で陽性、18 例 (41.9%)

で陰性であった。2 群間で比較では、年齢、性別、腫瘍径、分化度、リンパ節転移の有無には有意差を認めなかった。CD44(+)群では、T3 症例が 22 例 (88%) であったのに対して、CD44(-)では、11 例 (61%) と有意に T3 症例が多く (p=0.0395)、前治療として、放射線化学療法を施行した症例の割合は、CD44(+)群で 17 例 (68%)、CD44(-)群で 6 例 (33%) と、CD44(+) 群で有意に高率であった (p=0.0246)。また、CD44(+) 群は(-)群と比較して、無再発生存率、全生存率ともに不良であったが有意な差は認めなかった。術前放射線化学療法を施行した 23 例では、CD44 の発現と予後に有意な相関は認めなかったが、術前治療なしの 20 例では、CD44(+)8 例は、CD44(-)12 例と比較して、有意に無再発生存率および全生存率ともに不良であった。

### (3) 内分泌転写因子 Pdx1 と膵癌幹細胞マーカー CD44 の関係

膵癌切除標本において、Pdx1 発現と CD44 発現の相関について検討すると、Pdx1(-)/CD44(-): 9 例 (25%)、Pdx1(-)/CD44(+): 15 例 (41.7%)、Pdx1(+)/CD44(-): 7 例 (19.4%)、Pdx1(+)/CD44(+): 5 例 (13.9%) であったが、有意な相関は認めなかった。Pdx1 が陽性の症例では、CD44 発現の有無により生存率に差を認めなかったが、Pdx1(-) 症例のうち、CD44(+) 症例は、有意に無再発生存率、全生存率ともに不良であった。

これらの結果より、膵癌において Pdx1 の発現は直接的な悪性度を示唆する因子ではなかったが、癌幹細胞マーカーである CD44 と組み合わせることにより Pdx1 発現がなくさらに膵癌幹細胞マーカーを発現している症例では、予後が不良であり、悪性度が高い可能性が示唆された。すなわち、Pdx1 などの内分泌系 Progenitor Gene を遺伝子導入することで、膵癌の悪性度を低下させる可能性があると考えられた。

### 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 7 件)

1. Eguchi H, Nagano H, Tanemura M, Takeda Y, Marubashi S, Kobayashi S, Kawamoto K, Wada H, Hama N, Akita H, Mori M, Doki Y. Preoperative Chemoradiotherapy, Surgery and Adjuvant Therapy for Resectable Pancreatic Cancer. *Hepatogastroenterology*. 2013; 60(126).

2. Eguchi H, Tanemura M, Marubashi S, Kobayashi S, Wada H, Okita K, Iwahashi H, Imagawa A, Shimomura I, Osuga K, Umeshita K, Wakasa K, Mori M, Doki Y, Nagano H. Arterial stimulation and venous sampling for glucagonomas of the pancreas. *Hepatogastroenterology*. 2012; 59(113):276-9
3. Okubo K, Hama N, Kobayashi S, Eguchi H, Akita H, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Tanemura M, Umeshita K, Mori M, Doki Y, Nagano H. A case report of total remnant pancreatectomy for ductal carcinoma after distal pancreatectomy for invasive intraductal papillary mucinous carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2012; 39(12):2140-2.
4. Akita H, Nagano H, Takeda Y, Eguchi H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Takahashi H, Ohigashi H, Tomita Y, Ishikawa O, Mori M, Doki Y. Ep-CAM is a significant prognostic factor in pancreatic cancer patients by suppressing cell activity. *Oncogene*. 2011; 30(31):3468-76
5. Tomimaru Y, Eguchi H, Wada H, Tomokuni A, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Mori M, Doki Y, Nagano H. Synergistic antitumor effect of interferon- $\beta$  with gemcitabine in interferon- $\alpha$ -non-responsive pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*. 2011; 38(5):1237-43
6. Koga C, Tanemura M, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Mori M, Doki Y, Nagano H. A case report of port-site metastasis of pancreatic cancer after laparoscope assisted distal pancreatectomy. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2011; 38(12):2454-6.
7. 向井 亮太, 秋田 裕史, 江口 英利, 永野 浩昭, 土岐 祐一郎, 森 正樹. 腫瘍をめぐる Q&A(Question 53) c-MET と膵癌幹細胞(Q&A). *Surgery Frontier* 20 巻 1 号 94-96

[学会発表] (計 1 件)

- 1) 瀧内 大輔, 江口 英利, 和田 浩志, 川本 弘一, 小林 省吾, 丸橋 繁, 種村 匡弘, 永野 浩昭, 森 正樹, 土岐 祐一郎. 膵癌細

胞株における gemcitabine 耐性と  
microRNA-181bとの検討. 第70回日本癌学会  
総会 (2011.09)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 浩志 (WADA HIROSHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00572554

### (2) 研究分担者

永野 浩昭 (NAGANO HIROAKI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：10294050

江口 英利 (EGUCHI HIDETOSHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90542118

瀧内 大輔 (TAKIUCHI DAISUKE)  
大阪大学・大学院医学系研究科・医員  
研究者番号：30571351  
(H23 まで分担者として参画)

山田 大作 (YAMADA DAISAKU)  
大阪大学・大学院医学系研究科・医員  
研究者番号：60571396