

## 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17日現在

機関番号：17102  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591523  
 研究課題名（和文） 膵癌間質細胞の腫瘍免疫における新しい役割の解明とその応用による膵癌治療の新基軸  
 研究課題名（英文） Evaluating of a new role of mesenchymal cells for immunity in pancreatic cancer and new standard for treatment of pancreatic cancer by using the immunity.  
 研究代表者  
 井上 重隆（INOUE SHIGETAKA）  
 九州大学・医学研究院・共同研究員  
 研究者番号：00529802

### 研究成果の概要（和文）：

膵星細胞(PSCs)において、Toll Like Receptor のいくつかのサブタイプが発現していることを確認した。また膵癌バルク組織からの mRNA 解析で、FAS 高発現群では術後補助療法を行っていない場合予後不良となることを認めた。さらにPSCにおいてリンパ球の分化を示す抗原CD10を発現している subtype は、腫瘍の悪性度に寄与していることを明らかにした。このPSCsの subtype 探求はさらに進み、CD271を発現しているPSCsが癌細胞への抵抗性因子である可能性と、CD146を発現しているPSCsが癌細胞の浸潤を抑制している可能性を見出した。また、腫瘍からのマクロファージ分取を磁気分離装置を用いて行い、将来的にこのマクロファージと間質細胞による癌細胞の制御機構解明によって、間質標的的特異的新規治療へと進んでいくことが期待できた。

### 研究成果の概要（英文）：

In pancreatic stellate cells (PSCs), we revealed that some subtypes of Toll Like Receptor were found. Moreover, in the mRNA analysis for mRNA derived from a pancreatic cancer bulk organization, it became a bad prognosis in the FAS high quantity group, when the postoperative adjunct therapy was not being performed. Furthermore, we revealed that PSCs subpopulation which expressed CD10 antigen, which shows specialization of a lymphocyte, has contributed to the malignant behaviors of a tumor. This evaluation for PSCs subtyping further progressed and found out a possibility that CD271 expression was related to a resistance factor to cancer cells, and a possibility that CD146 expression had controlled invasion of cancer cells. Moreover, macrophage preparative isolation from a tumor was performed by using magnetic-separation equipment, and it has expected to progress to the control mechanism elucidation of a cancer cell and stroma targeting specific new medical treatment by the macrophages and mesenchymal cells in the future.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：膵癌、腫瘍免疫、間質細胞、癌間質相互作用、膵星細胞、マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌は癌死の 5 位を占めながら現在でも 100 人中 3 人しか根治しない難治性疾患であり、その治療法の開発は、社会的要請度・緊急性が高い。膵癌は固形癌の中でもとりわけ豊富な間質構造を有し、癌間質相互作用が膵癌の高い浸潤能、転移能、治療抵抗性に強く影響を与えていと考えられる (Nature, 2004, Bhowmick)。最近、膵間質に存在する膵星細胞 (pancreatic stellate cells; PSC) が同定され、膵線維化および膵癌細胞の増殖、浸潤、転移を促進することが示された (Cancer Res, 2008, Vonlaufen)。

(2) 癌細胞は制御性 T 細胞 (regulatory T cells; Treg) を癌周囲に誘導することで腫瘍免疫を抑制し (Immunol res, 2005, Linehan)、癌細胞の生存に適した環境を作り出していると考えられる。これまで癌細胞と免疫細胞との関係は広く研究されてきたが、その作用にさらに免疫細胞以外の PSC などの間質細胞が関与するか否かは今まで調べられてこなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 癌の進展に影響を及ぼす免疫細胞の機能制御に関して、間質細胞がどのように働き、作用しているのかを *in vitro*、*in vivo* に明らかにする。

(2) 間質細胞と免疫機構との相互作用を標的とした、これまでにない膵癌新規治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

以下のステップに従い研究を進めた。

① 樹立済みの 20 種類の膵癌由来ヒト PSC における免疫関連分子 (chemokine, cytokines, growth factor 等) の発現プロファイリングを行い、免疫システムにおける PSC の役割を推定する。

② *in vitro* 共培養モデルにて、PSC が及ぼす免疫細胞の増殖・遊走・抗腫瘍機能への影響の検討を行い、それに関わる免疫分子を同定する。

③ *in vivo* マウス膵同所共移植モデル、尾注遠隔転移モデルを用いて、癌細胞の生存・成長・浸潤・遠隔転移における PSC の免疫学的関与につき検討する。

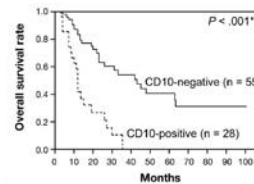
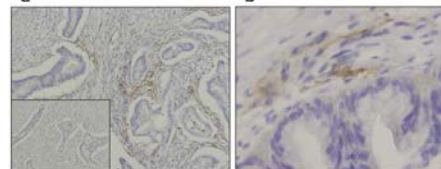
④ PSC/免疫細胞相互作用や PSC 特異的抗原表

面抗原をターゲットとした新規分子標的治療を開発する。また、既存の免疫療法 (樹状細胞・活性化感作リンパ球投与) との combination therapy の可能性を模索する。

## 4. 研究成果

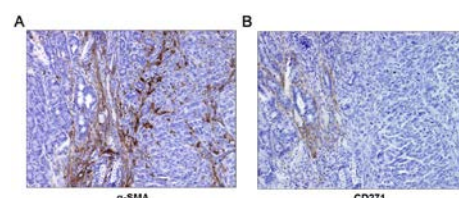
(1) まず膵星細胞において、Toll Like Receptor のいくつかのサブタイプが発現していることを確認した。また膵癌バルク組織から抽出した mRNA の発現解析で、免疫細胞・間質細胞間の相互アポトーシスにかかわる FAS の発現を確認し、さらに FAS 高発現群では、術後補助療法を行っていない場合予後不良となることを発見した。これは術後補助療法を行うことで低発現群と同程度の予後になることも判明した。また別に、“乳癌の間質に発現が認められその予後に関わるとされている炎症細胞マーカー” が、膵癌間質でも同様に、間質に浸潤する炎症細胞で発現していることを、免疫組織染色で明らかにした。これは炎症細胞が膵間質におよぼす影響により膵癌の進展が左右される可能性があり、非常に興味深い。

(2) 免疫組織化学染色によって、PSC におい



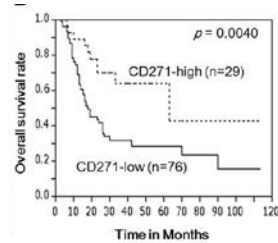
て表面抗原 CD10 を発現している subtype が僅かに存在し、予後不良因子であることを明らかとした (下図)。この CD10 陽性膵星

細胞は、*in vitro* 共培養モデルにて癌細胞の悪性度を増すことを明らかとし、報告した (Gastroenterology, 2010)。これはリンパ球の分化を示す抗原を発現している膵星細胞が腫瘍免疫を制御している可能性を示唆している。この PSC の subtype 探求はさらに進み、CD271 という神経成長因子受容体の膵星細胞における発現は、癌細胞との共培養に



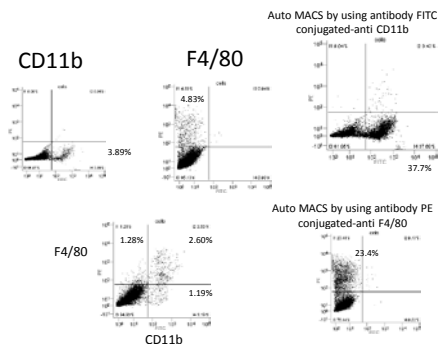
よって一時的に発現し、その後急速に減少することを証明した。また in vivo マウス膵同所共移植モデル (下図) においても同様の現象を証明しえた。免疫組織化学染色での CD271 陽性膵星細胞の存在が予後良好因子であることから (下図)、CD271 の発現は膵癌への抵抗性因子である可能性が示唆され、報告を行った

(PLoS One, 2012)。また、新たに CD146 陽性膵星細胞が癌細胞の浸潤を抑制している可能性を見出し、現在実験を進めている。



(3) 腫瘍からのマクロファージ分取を、磁気分離装置を用いて行った (下図)。現在のところ高純度の分離には至っていないが、我々がなした膵癌における間質細胞による癌細胞の制御機構解明と、この分離したマクロファージとの関係をさらに探求していくことで今後さらなる腫瘍免疫制御の観点から間質標的的特異的新規治療へと進んでいくことが期待できた。

#### 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) Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Lin Cui, Tadashi Kayashima, Katsuya Morimatsu, Taiki Moriyama, Kohei Nakata, Hayato Fujita, Masao Tanaka. CD10+ pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 査読有 139:1041-1051, 2010.

- (2) Kenji Fujiwara, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Koji Shindo, Daiki Eguchi, Shingo Kozono, Naoki Ikenaga, Takao Ohtsuka, Shunichi Takahata, Shinichi Aishima, Masao Tanaka. CD271<sup>+</sup> subpopulation of pancreatic stellate cells correlates with prognosis of pancreatic cancer and is regulated by interaction with cancer cells. *PLoS One* 査読有 12: 2012

[学会発表] (計 6 件)

- (1) Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Kenji Fujiwara, Shingo Kozono, Takao Ohtsuka, Masafumi Nakamura, Masao Tanaka. CD10 positive pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer. 42nd Annual Meeting of the American Pancreatic Association. 2011 年 11 月 2 日～5 日 Chicago, USA
- (2) 池永直樹, 大内田研宙, 水元一博, 崔林, 小藺真吾, 藤田逸人, 大塚隆生, 田中雅夫 CD10 陽性膵星細胞は膵癌の進展を促進する。第 111 回日本外科学会定期学術集会 2011
- (3) 藤原謙次, 大内田研宙, 進藤幸治, 赤川進, 江口大樹, 小藺真吾, 池永直樹, 崔林, 相島慎一, 大塚隆生, 高畑俊一, 水元一博, 小田義直, 田中雅夫 膵癌における CD271 陽性膵星細胞の意義 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012/04/13 千葉
- (4) Kenji Fujiwara, Kenoki Ohuchida, Koji Shindo, Shingo Kozono, Naoki Ikenaga, Lin Cui, Shinichi Aishima, Masafumi Nakamura, Kazuhiro Mizumoto, Yoshinao Oda, Masao Tanaka CD271+ pancreatic stellate cells are correlated with prognosis of patients with pancreatic cancer and regulated by interaction with cancer cells International Symposium on Pancreas Cancer 2012 in Kyoto 2012/10/6 京都
- (5) Koji Shindo et al. Fibroblasts expressing Podoplanin enhance the tumor progression of invasive ductal carcinoma of pancreas 2012 Joint Meeting of American Pancreatic Association and International Association of Pancreatology 2012/11/01 Miami, USA
- (6) 進藤幸治 他 Fibroblasts expressing Podoplanin enhance the tumor progression of invasive ductal carcinoma of pancreas 第 71 回日本癌学会 2012/9/21 札幌

(3)連携研究者  
なし

〔図書〕(計3件)

- (1) 【膵癌診療と研究の最先端】 膵癌における癌間質相互作用(解説/特集)  
Author: 大内田研宙, 大塚隆生, 水元一博, 田中雅夫  
Source: 胆と膵 (0388-9408)32 巻 9 号  
Page807-810(2011. 09)
- (2) 分子生物学的研究に基づく膵癌の診断と治療 臨床応用を目指して(総説)  
Author: 藤田逸人, 大内田研宙, 水元一博, 田中雅夫 福岡医学雑誌 102 巻 6 号  
Page203-214(2011. 06)
- (3) 【膵がん・膵内分泌腫瘍の最近の動向】膵がんの分子生物学的解析の現状(解説/特集)  
Author: 大内田研宙, 藤田逸人, 水元一博, 田中雅夫 腫瘍内科 7 巻 2 号  
Page131-136(2011. 02)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

井上 重隆 (INOUE SHIGETAKA)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号: 00529802

### (2)研究分担者

宮坂 義浩 (MIYASAKA YOSHIHIRO)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号: 40507795

水元 一博 (MIZUMOTO KAZUHIRO)  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号: 90253418  
(2010 年)

真鍋 達也 (MANABE TATSUYA)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号: 60546464  
(2010 年)

高畑 俊一 (TAKAHATA SHUNITI)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号: 50437779  
(2010 年)

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)  
九州大学・先端医療イノベーションセンター・講師  
研究者番号: 20452708  
(2012 年)