

## 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 3 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2013

課題番号：22689038

研究課題名（和文） 幹細胞マーカーNestin を標的とした膵癌新規治療の開発

研究課題名（英文） Stem cell marker, nestin-targeting therapy in pancreatic cancer

研究代表者

松田 陽子 (MATSUDA YOKO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20363187

研究成果の概要（和文）：

幹細胞マーカーである nestin の膵癌における抑制効果とその機序について検討した。膵癌培養細胞の nestin の発現を抑制すると、遊走、浸潤、スフェア形成能、肝転移が抑制された。Nestin 抑制効果の機序には、F-actin、E-cadherin、transcription factor 4 の発現が関与した。また、nestin の発現を制御する上流の機序として、nestin 遺伝子のメチル化、および PKR や AKT といった細胞内シグナル系の関与が確認された。また、膵癌移植マウスに nestin に対する small interfering RNA (siRNA) を尾静脈注射したところ、nestin siRNA を投与した群では、原発巣腫瘍、及び腹腔内転移巣の抑制が認められた。今後さらに検討を進め、nestin を効果的に抑制する方法の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we have studied the effects and mechanisms of nestin-targeting therapy in pancreatic cancers. Inhibition of nestin in pancreatic cancer cell lines suppressed cell migration, invasion, sphere-forming ability and liver metastasis. The inhibitory effects of nestin were involved in the expression levels of F-actin, E-cadherin and transcription factor 4. We found that nestin expression was regulated by the methylation of the nestin gene and by the activation of cell signaling pathway proteins such as PKR and AKT. Tail vein injections of siRNA-targeting nestin into immunodeficient mice in which human pancreatic cancer had been transplanted suppressed both primary and metastatic tumor formation. Nestin is considered a promising target for pancreatic cancers, and further studies are needed to develop nestin-targeting therapy for 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	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2012年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	7,900,000	2,370,000	10,270,000

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：nestin, 膵癌, 分子標的治療薬, 浸潤, 転移, 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

膵癌の予後はきわめて不良で、5年生存率は5%にも満たないため、膵癌に対する新たな治療手段の開発が待ち望まれている状況であった。

Nestinは、ClassVIに分類される中間径フィラメントの一つで、神経幹細胞のマーカーとして広く知られていた。さらに nestin は神経系だけでなく、筋肉、精巣、歯、膵臓、心臓、血管の前駆細胞での発現が確認され、膵臓においては膵外分泌細胞の幹細胞マーカーであることも明らかとなっていた。中間径フィラメントは細胞の種類によって特異的な発現パターンを示し、細胞機能、特に細胞の運動性や細胞分裂に関与する。Nestinは組織修復に関与すると考えられていたが、その細胞内での役割は十分に解明されていなかった。

腫瘍分野では、中枢神経系腫瘍、特に膠芽腫や悪性黒色腫、消化管間葉性腫瘍（GIST）、乳癌、前立腺癌において nestin が発現し、その発現と悪性度、遊走、浸潤、転移との関連が報告されていた。今回の研究を開始する

以前に我々は、浸潤性膵管癌の約30%の症例で nestin の発現を認め、nestin 発現が膵癌の神経浸潤、及び切除断端浸潤と関連することを報告した（Kawamoto et al. Human Pathol: 2009）。

細胞の運動性には、細胞骨格を形成する中間径フィラメントや微小管、微小線維（マイクロフィラメント）が深く関与している。癌細胞においては、細胞の運動性は癌の間質への浸潤や転移といった予後につながる重大な因子となっている。中間径フィラメント nestin はヒト膵癌細胞の遊走・浸潤に深く関与している可能性が高く、治療標的として非常に有望であると考えられた。このため、本研究によって、nestin が浸潤性膵管癌細胞の運動性や浸潤に果たす役割、機序が解明できれば、極めて予後の悪い浸潤性膵管癌の浸潤・転移の抑制を目指した新たな治療法の開発、治療有効症例の選別・個別化が期待された。

さらに、nestin は神経幹細胞マーカーの一つであり、膵臓でも外分泌細胞の幹細胞に発現している。マウスにおいて nestin 陽性細

胞にK-ras 変異を生じさせると膵癌の前癌病変 (PanIN 病変) が発生すると報告も成されていた。しかし、ヒトの膵癌における nestin の役割に関する研究は我々の報告のみであり、不明な点が多く残されていた。また、膵癌における癌幹細胞の役割の解明に関する研究も、開始されたばかりであった。本研究によって、膵癌における nestin の役割が解明されれば、膵癌における癌幹細胞の役割の解明、及び膵癌の発生母地や病態の解明が前進する可能性があるという状況であった。さらに、癌幹細胞といった新しい視点から見た膵癌治療法の開発につながることも期待される状況であった。

## 2. 研究の目的

自己複製能・多分化能を有する癌幹細胞は、腫瘍の浸潤・転移や治療抵抗性、治療後再発に関与することが解明され、癌幹細胞を標的とした治療の開発が注目を浴びている。膵癌における癌幹細胞マーカーとして CD133, CD44, ESA(epithelial-specific antigen)等が報告されているが、我々は新たな幹細胞マーカーとして nestin に注目した。Nestin は神経幹細胞マーカーとして最初に報告された class VI に分類される中間径フィラメントで、膵臓においては外分泌細胞の幹細胞マーカーである。我々は、以前にヒト膵癌細胞の一部に nestin が発現しており、膵癌の浸潤・転移に深く関与することを明らかにした。このことから、nestin を標的とした治療によって膵癌の浸潤・転移の制御が可能であると考へた。本研究では、膵癌の浸潤・転移における nestin の役割や作用機序を解明し、nestin の制御による膵癌の新たな治療戦略の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

膵癌培養細胞に、shRNA 発現ベクターおよび遺伝子発現ベクターを遺伝子導入し、nestin 発現抑制株と過剰発現株を作成した。Nestin の発現量変動がヒト膵癌細胞に与える影響を *in vitro* では細胞形態、増殖、遊走、浸潤、細胞外基質との接着について調べた。また、成体内での転移能に与える影響を検討するため、免疫不全マウスである NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic (NOG) マウスの脾臓内にヒト膵癌細胞を移植する肝転移モデルを用いた。このモデルでは、数週後に肝臓だけでなく、肺やその他の臓器に遠隔転移巣を形成する。肝転移モデルを用いて、nestin 発現量と肝転移との関連について検討した。

次に、膵癌幹細胞と nestin との関連を解明するため、スフェア形成法を行った。また、nestin によって変動する遺伝子発現の変化を網羅的に解析するため、DNA microarray および質量分析を行った。さらに、nestin を制御する機構の解明のため、メチル化特異的 PCR および Bisulfite シークエンスを行い、エピジェネティクスな変化について検討した。また、nestin 発現に関与する細胞内シグナル伝達系について検討した。

*In vivo* での nestin 抑制の効果を検討するため、ルシフェラーゼ遺伝子導入ヒト膵癌細胞をマウスの膵臓に同所移植した。このモデルでは、原発巣およびその後形成される転移巣について、マウスを屠殺することなく、経時的に観察することが可能である。同所移植モデルを用いて、nestin に対する siRNA の尾静脈注射の抗腫瘍効果を検討した。

## 4. 研究成果

Nestin 抑制ヒト膵癌細胞株では細胞遊走、浸潤が著明に抑制され、逆に nestin 過剰発現株では細胞遊走、浸潤が亢進した。Nestin

抑制株に nestin 遺伝子導入を行うと、細胞遊走、浸潤の抑制効果が回復した。Nestin 抑制株では、マウス転移モデルにおいて著明な転移抑制が確認された。また、nestin の機能には、細胞骨格タンパク質の F-actin や細胞間接着タンパク質 E-cadherin の発現が関与することが明らかになった (Matsuda, Cancer Biol Ther, 2011)。

癌幹細胞を検討する方法の一つであるスフェア形成法を用いて検討したところ、nestin 発現の程度がスフェア形成能に大きく関与することが分かった。以上より nestin は癌の遊走、浸潤、転移、および癌幹細胞制御において重要な役割を担うことが明らかとなった。

次に、nestin によって制御される遺伝子発現の変化について網羅的に解析を行った。その結果、nestin の発現が transcription factor 4 (TCF4) の発現制御に関与することを明らかにした。TCF4 は、幹細胞機能を制御する NANOG の転写を制御し、それによって nestin が幹細胞機能を制御する可能性が示された。

さらに、nestin の発現を制御する機構について、検討を行ったところ、nestin 遺伝子のメチル化、および PKR や AKT といった細胞内シグナル系の関与が確認された。

最後に、マウス同所移植モデルを用い、nestin に対する siRNA の尾静脈注射の効果を検討した。その結果、nestin siRNA を投与した群では、コントロール群に比べて、原発巣の腫瘍は小さく、腹腔内転移巣の形成の抑制も認められた (AACR, 2013)。

今後さらに、nestin タンパク質の活性化機序(リン酸化)の解明に向けた研究を行い、nestin の機能を効果的に抑制する方法の開発を目指す。

## 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 12 件)

1. Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. Inhibition of the stem cell marker nestin reduces tumor growth and invasion of malignant melanoma. J Invest Dermatol. 133: 1384-7, 2013. doi: 10.1038/jid.2012.508.
2. Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. Nestin is highly expressed in advanced-stage melanomas and neurotized nevi. Oncol Rep. 29: 1595-9, 2013. doi: 10.3892/or.2013.2287.
3. Matsuda Y, Hagio M, Ishiwata T. Nestin: a novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis. World J Gastroenterol. 19: 42-8, 2013. doi: 10.3748/wjg.v19.i1.42.
4. Yoshimura H, Matsuda Y, Naito Z, Murase M, Kawamoto Y, Ishiwata T. Ultra-high-resolution images of nestin and vimentin in pancreatic carcinoma cells using 2 novel microscopy systems. J Nippon Med Sch. 79: 392-3, 2012.
5. Kure S, Matsuda Y, Hagio M, Ueda J, Naito Z, Ishiwata T. Expression of cancer stem cell markers in pancreatic intraepithelial neoplasias and pancreatic ductal adenocarcinomas.

- Int J Oncol. in press. doi:  
10.3892/ijo.2012.1565.
6. Matsuda Y, Hagio M, Seya T, Ishiwata T. Fibroblast growth factor receptor 2 IIIc as a therapeutic target for colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 11: 2010-20, 2012. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0243.
  7. Matsuda Y, Kure S, Ishiwata T. Nestin and other putative cancer stem cell markers in pancreatic cancer. *Med Mol Morphol.* 45: 59-65, 2012. doi: 10.1007/s00795-012-0571-x.
  8. Ishiwata T, Matsuda Y, Yamamoto T, Uchida E, Korc M, Naito Z. Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation. *Am J Pathol*, 180: 1928-41, 2012. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.01.020.
  9. Yamahatsu K, Matsuda Y, Ishiwata T, Uchida E, Naito Z. Nestin as a novel therapeutic target for pancreatic cancer via tumor angiogenesis. *Int J Oncol*, 40: 1345-57, 2012. doi: 10.3892/ijo.2012.1333.
  10. Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z. Nestin in gastrointestinal and other cancers: Effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 17: 409-418, 2011 doi: 10.3748/wjg.v17.i4.409.
  11. Matsuda Y, Naito Z, Kawahara K, Nakazawa N, Korc M, Ishiwata T. Nestin is a novel target for suppressing pancreatic cancer cell migration, invasion and metastasis. *Cancer Biol Ther.* 11: 512-523, 2011
  12. Matsuda Y, Fujii T, Suzuki T, Yamahatsu K, Kawahara K, Teduka K, Kawamoto Y, Yamamoto T, Ishiwata T, Naito Z. Comparison of fixation methods for preservation of morphology, RNAs, and proteins from paraffin-embedded human cancer cell-implanted mouse models. *J Histochem Cytochem.* 59: 68-75, 2011 doi: 10.1369/jhc.2010.957217.
- [学会発表] (計 8 件)
1. Matsuda Y, et al. Inhibition of phosphorylation of nestin decrease pancreatic cancer cell growth. 104th annual meeting 2013, 2013 年 4 月 6-10 日, Washington
  2. Matsuda Y, et al. Nestin regulating molecule network in pancreatic cancer. Pancreas Cancer 2012 in Kyoto / 国際膵癌シンポジウム 2012, 2012 年 10 月 4-6 日, 京都
  3. 松田 陽子. 膵癌転移巣における癌幹細胞および上皮間葉転換マーカーの発現. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2012 年 9 月 19 -21 日, 札幌
  4. Matsuda Y, et al. EMT and stemness in human pancreatic cancer cells derived from metastatic foci of NOD/Shi-scid, IL-2 $\gamma$  null (NOG) mice. 18th International Heidelberger Symposium on Cancer Research, 2012 年 6 月 28-30 日, Ulm, Germany
  5. Matsuda Y, et al. Nestin regulates stem cell functions of pancreatic cancer cells. 103th annual meeting 2012, 2012 年 4 月 1-4 日, Chicago

6. Matsuda Y, et al. Nestin regulates pancreatic cancer stem cell functions. American association for cancer research, 102th annual meeting 2011, 2011年4月4日, Orlando
7. Matsuda Y, et al. Stem cell marker Nestin regulated the migration and invasion of pancreatic cancer cells. American association for cancer research, 101th annual meeting 2010, 2010年4月18日, Washington
8. Matsuda Y, et al. Nestin modulates the migration and invasion of pancreatic cancer cells by regulating actin and E-cadherin expression. 第14回国際膵臓学会・第41回日本膵臓学会大会合同会議 2010年7月12日, 福岡

研究者番号：

[図書] (計1件)

Matsuda Y, et al. Evolution of the molecular biology of brain tumors and the therapeutic implications. Nestin: Neural stem/ progenitor marker in brain tumors. INTECH, 623-638, 2013

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 陽子 (MATSUDA YOKO)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20363187

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )