

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11日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790652

研究課題名（和文）膵癌 Desmoplasia を制御する薬剤の同定と間質制御による新規膵癌治療の開発

研究課題名（英文） Establishment of newly treatment strategies for suppressing desmoplastic reactions in pancreatic cancer

研究代表者

清水 祐紀子 (SHIMIZU YUKIKO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10404021

研究成果の概要（和文）：

我々は、特発性肺線維症治療薬であるピルフェニドンが、膵癌における desmoplasia を抑制する効果を持つことが示唆されることを世界で初めて示した。膵癌の癌間質相互作用の中心を担うヒト膵星細胞を膵癌手術組織標本より樹立し、ピルフェニドンが濃度依存性にヒト膵星細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を有意の抑制することを明らかとした。ピルフェニドンは癌間質相互作用の影響下にあっても、ヒト膵星細胞の増殖、浸潤能を抑制できた。その機序として、ピルフェニドンがヒト膵星細胞における PDGFA、HGF、ペリオスチン、コラーゲンI、フィブロネクチンの蛋白産生を抑制していることを明らかとした。ヒト膵癌皮下移植マウスモデルではピルフェニドン投与群で有意に腫瘍形成が抑制され、組織学的にもコラーゲンI、ペリオスチン、 α -SMA 陽性細胞数が抑制されていた。ピルフェニドンとジェムザールの併用療法はマウスモデルでの腫瘍形成をそれぞれの単独群に比較して著明に抑制した。以上の研究成果より、ピルフェニドンが膵癌の癌間質相互作用の中心を担うヒト膵星細胞を標的とした新しい膵癌治療薬となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether the antifibrotic agent, pirfenidone (PF), suppress desmoplasia and exert anti-tumor effects for pancreatic cancer. PF inhibited proliferation, invasiveness and migration of PSCs in the dose-dependent manner. The supernatants of PSCs treated with PF attenuated capacity to promote proliferation, invasiveness and migration of pancreatic cancer cells. The supernatants of pancreatic cancer cells increased production of PDGF-A, HGF, collagen type I, Fibronectin, and periostin in PSCs, and the increase were significantly reduced by PF. *In vivo*, PF significantly suppressed the tumor growth only when pancreatic cancer cells were co-transplanted with PSCs and decreased numbers of PSCs and deposition of collagen type I and periostin in tumors. Combination treatment with gemcitabine and PF more effectively suppressed *in vivo* tumor growth than gemcitabine alone and PF alone groups. These results indicate that PF could be promising agents targeting desmoplasia by suppression of PSCs and production of growth factors and stromal components related to tumor-stromal interactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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：胆道学、膵臓学、膵癌、間質細胞

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、早期診断の難しさや早期の遠隔転移・播種、化学療法や放射線療法への高い治療抵抗性などにより予後不良な腫瘍の一つである。これまで腫瘍細胞自体に関する研究が進められてきたが、画期的治療法の確立には至っていない。膵癌を他の癌腫から異にする病理組織学的特徴は *Desmoplesia* を呼ばれる過剰な間質増生であり、*Desmoplesia* が膵癌の化学療法や放射線療法への治療抵抗性を高めていると考えられる。近年、腫瘍関連間質組織の増生を抑制する事で、膵癌への薬剤到達濃度が上昇し、化学療法の抗腫瘍効果が増強する事が報告された (Science, 2009, K Olive)。膵癌の治療抵抗性改善のため、*desmoplasia* を標的とした新たな治療戦略の確立が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、膵癌治療抵抗性に関与する膵癌細胞と膵星細胞の相互作用および膵星細胞による *desmoplasia* の形成を抑制する薬剤を同定し、今までの膵癌細胞自体を標的とした治療法との併用で、膵癌治療抵抗性を克服するべく新たな治療戦略を開発する。本研究においては下記の4つを研究期間内に明らかにする。

- (1) 切除膵癌組織より膵星細胞を樹立し、膵星細胞を抑制する薬剤を同定(抗繊維化薬)、膵星細胞に与える分子生物学的作用を明らかにする。
- (2) 膵癌細胞および膵星細胞の共培養モデルに抗繊維化薬を投与し、両細胞における相互作用の *in vitro* での分子生物学的变化を明らかにする。
- (3) 膵癌細胞と膵星細胞の同所移植マウスモデルを用いて、抗繊維化薬投与による膵癌組織の変化を検討する。
- (4) さらに、抗繊維化薬の併用が膵癌の治療抵抗性を改善し、従来の抗癌剤の抗腫瘍効果を高めることができるか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵星細胞株の作成とその同定。

膵癌患者より得られる手術切除標本を用いて、BachemやApteらにより報告された方法によりヒト膵星細胞株を作成する (Gastroenterology, 1998, Max G. Bachem, Gut, 1998, M V Apte)。

(2) 膵星細胞を抑制する薬剤の同定とその分子生物学的作用の解析。

これまでに得られている膵癌での *desmoplasia* 形成機序に関する知見に基づいて、その癌間質相互作用を抑制する薬剤を文

献より網羅的に検索し、候補となる薬剤のヒト膵星細胞への作用を *in vitro* で分子生物学的に検討する。

(3) 膵癌細胞株とヒト膵星細胞株の共培養モデルにおける抗繊維化薬の細胞間相互作用に及ぼす *in vitro* での分子生物学的作用の解析。 直接間接共培養モデルを用いて、抗繊維化薬が膵癌細胞株の増殖能、遊走能、浸潤能、治療抵抗性の変化を *in vitro* で解析する。また、共培養モデルにおける膵星細胞の働きを解析するため、膵星細胞の増殖能、増殖因子産生能 (TGF- β 、PDGF)、細胞外器質産生能 (コラーゲン I、III、フィブロネクチン) の変化を RNA、たんぱく質レベルで解析する。

(4) 膵癌細胞株とヒト膵星細胞株の同所移植による膵癌マウスモデルへの抗繊維化薬投与による膵癌の組織学的変化の検討。

In vitro で膵星細胞を抑制する薬剤を同定したのちに、ヌードマウスを用いた膵癌細胞株とヒト膵星細胞株の同所移植膵癌モデルに対して抗繊維化薬を投与し、形成される膵癌組織の形態的評価や *desmoplasia* などの組織学的変化の評価、肝転移、肺転移および腹膜播種の頻度に与える影響の検討を行う。

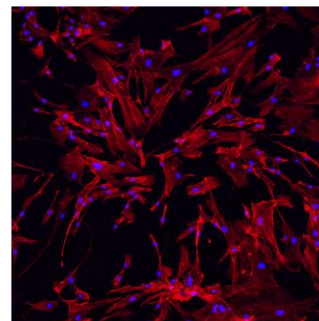
(5) 膵癌マウスモデルにおける抗繊維化薬および Gemcitabine 併用による膵癌治療効果の解析。

抗繊維化薬の投与により膵癌組織での *desmoplasia* 形成が抑制されることで、Gemcitabine の治療効果が増強されることが予想される。*Desmoplasia* 抑制作用が確認された薬剤を Gemcitabine と併用投与し、その治療効果を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト膵星細胞株の作成とその同定。

膵癌患者より得られる手術切除標本より、30種以上のヒト膵星細胞株を作成 (α -SMA 陽性を確認) に成功し、実験に使用した。

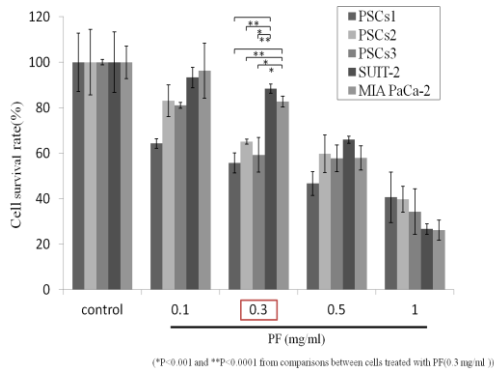


蛍光免疫染色 (α -SMA)

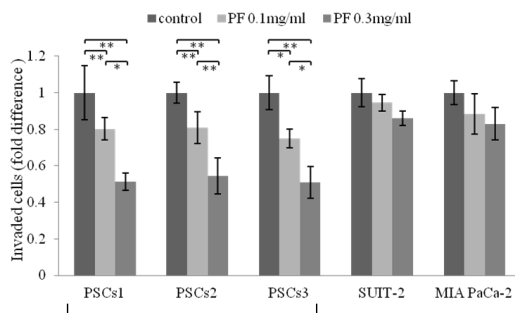
(2) 膵星細胞を抑制する薬剤の同定とその分子生物学的作用の解析。

特発性肺線維症治療薬である、ピルフェニドン (pirfenidone, PF) を *desmoplasia* 抑制候補薬として同定し実験を行った。PF による膵癌

細胞株の抑制効果は軽微であったが、PSCsは濃度依存性に増殖能、遊走能、浸潤能が有意に抑制された。



PFに浸潤能抑制効果

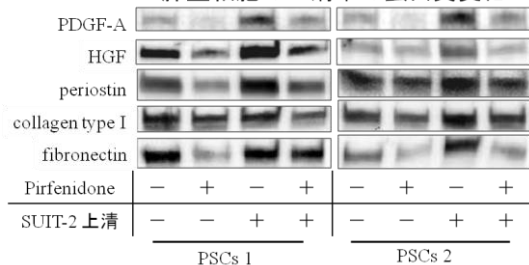


PSCsに有意な浸潤抑制効果を示した。

(3) 膵癌細胞株とヒト膵星細胞株の共培養モデルにおける抗繊維化薬の細胞間相互作用に及ぼすin vitroでの分子生物学的作用の解析

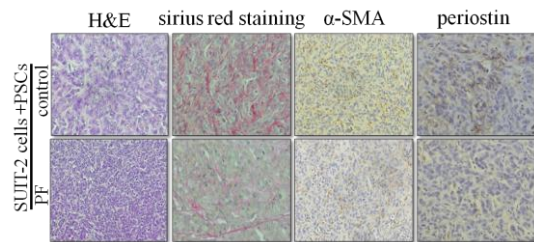
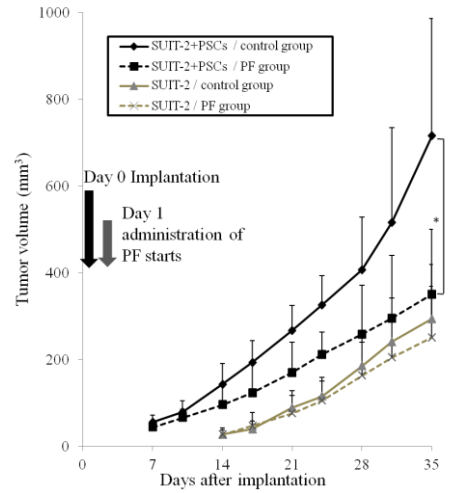
PFで処理したヒト膵星細胞の上清は、非処理群と比較して癌細胞の増殖能、浸潤能および遊走能増強作用が有意に低下した。PFで処理したヒト膵星細胞ではcontrol群と比較して、上清中のTGF- β 1、PDGF-A、periostinの蛋白量が減少した。SUIIT-2の上清をPSCsに添加すると同源性因子とcollagen-1産生が増加するが、PFはこれを抑制することを明らかとした。

膵星細胞の上清中の蛋白質変化



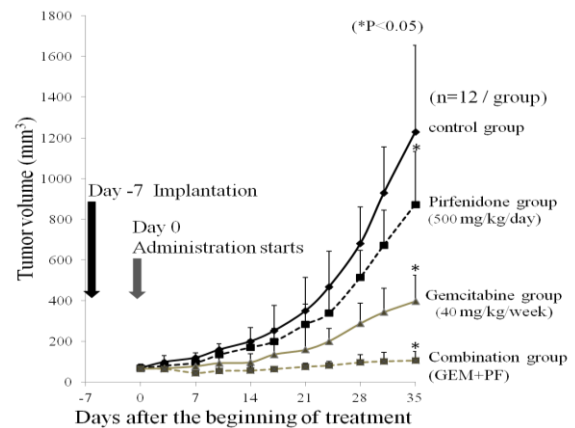
(4) 膵癌細胞株とヒト膵星細胞株の同所移植による膵癌マウスモデルへの抗繊維化薬投与による膵癌の組織学的変化の検討。

マウスモデルではSUIIT-2とヒト膵星細胞を共移植した場合のみ、PF投与群で有意に腫瘍形成が抑制され、組織学的にもcollagen-1、 α -SMA、periostinの抑制を認めた。SUIIT-2のみの移植ではcontrol群とPF群で有意な腫瘍形成抑制は認めなかった。



(5) 膵癌マウスモデルにおける抗繊維化薬およびGemcitabine併用による膵癌治療効果の解析。

PFとGemcitabineの併用によりヒト膵星細胞とSUIIT-2共移植膵癌マウスモデルにておいて、それぞれの単独投与群と比較して、腫瘍増殖が著名に抑制されることを明らかとした。



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)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 祐紀子 (SHIMIZU YUKIKO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10404021

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし