

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390327

研究課題名(和文) 癌間質ニッチに存在する膵癌浸潤/転移責任間質細胞同定とその制御による新規治療開発

研究課題名(英文) Identification of the specific stromal cells in microenvironment for pancreatic cancer invasion and metastases and the development of its regulation

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は現在も有効な治療がなく癌死の上位を占める。特に癌間質相互作用により高い浸潤・転移能、治療抵抗性を有することから、癌間質ニッチに存在する膵癌浸潤/転移責任間質細胞を同定し、その成果を基盤にして間葉系細胞や内皮性幹細胞のマーカーを用い、切除癌組織より樹立した間質細胞集団のprospective isolationを進め、その機能解析により更に詳細なphenotypingを行い、癌細胞増殖・浸潤・転移・EMT・治療抵抗性に深く関わる癌間質細胞集団を特定、癌間質を制御する薬剤を同定し、治療効果を明らかにした。また細胞選択的ドラッグデリバリーシステムを開発するため人工ウイルスの改変を進めた。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is one of the most deadly malignancies. Especially, the prognosis of the patients with pancreatic cancer is extremely poor. Recently, we identified the specific stromal cells responsible for invasion and/or metastasis of pancreatic cancer. In the present study, based on our previous data, we used the several stromal and endothelial markers and performed the prospective isolation of cell population derived from the resected pancreatic cancer tissues. Furthermore, we performed the functional analyses for the functional phenotyping and identified the several specific cell populations, which are significantly involved in cell proliferation, invasion, migration, EMT and metastasis of pancreatic cancer cells. We also identified the small molecules to regulate the cancer stroma and found the effect of one of the molecules in the treatment of pancreatic cancer.

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：膵がん 癌間質相互作用 ニッチ

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は癌死の5位を占めながら、100人中3人しか根治しない疾患である。すでに診断時に7-8割は切除不能であり、既存の治療法は極めて限定的である。そのため膵癌の新規治療戦略の開発は社会的な要望が高く、また緊急性があり、近年では、膵癌患者/遺族による患者団体の活動も活発になるなど更にその重要性は高まっている。近年、癌幹細胞の概念が提唱され、多くの癌腫でその存在が示唆されている。癌幹細胞研究を牽引する白血病領域での研究では癌幹細胞の存在、機能が明らかになっているが、固形癌においては限られた報告しかない(Sharma, Cell, 2010)。膵癌においてもその高い治療抵抗性への癌幹細胞の関与が報告されているが、かならずしもコンセンサスを得ている状況ではない。固形癌、特に膵癌では、真にその特性を明らかにするには癌細胞周囲の間質細胞からなる特有の微小環境を含めた検討が必要であり(Singh, Nature biotechnology, 2010)、現在、世界の多くの施設でこの微小環境に着目した研究が進められている(Vermeulen, Nature cell biology, 2010)。これまでに癌の浸潤および転移に深く関わるある特定の癌細胞集団に加えて癌細胞の悪性度を増長させるある特定の間質細胞集団を明らかにできた。一般的に癌組織がヘテロな細胞集団の集まりであることはよく知られており、同じ組織中の癌細胞であっても癌幹細胞などのように悪性度の異なる細胞集団からなることはよく研究されている。一方、癌細胞を支持するニッチ中に存在する間質細胞、とくにその中心を担う myofibroblast はその重要性を認識されていながら、その細胞集団がヘテロな集団であることは注目されてこなかった。申請者はこれまでの検討で癌細胞だけでなく(Cancer, 2010, Moriyama & Ohuchida et al)、このニッチ中の間質細胞にもヘテロな細胞集団からなっており、ある特定の細胞集団が特に強い癌間質相互作用を発揮して癌細胞をより浸潤、転移させることを明らかにした(PLoS ONE, 2010, Cui & Ohuchida, et al)。特に膵癌においては癌間質相互の担い手として膵星細胞が注目されているが、申請者はこの膵星細胞にも数多くの Phenotype があり、ある特定の Phenotype の膵星細胞が特に膵癌の浸潤を強く誘導することを Gastroenterology 誌に2010年8月に世界に先駆けて報告した。これらの成果に基づき、今後はより間質細胞に標的を絞って、癌細胞の悪性度に深く関わる特定のニッチ間質細胞集団のさらなる特定化とその機能、機序の解明およびその制御による新規治療法の開発を目的とする本研究を構想するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌の進展に影響を与える癌間質ニッチ中に存在する膵癌細胞の浸潤、転移など悪性度の促進に深く関わるある特定の間質細胞集団を同定し、それを標的としたドラッグデリバリーシステムを開発する。膵癌は固形癌の中でも特に desmoplasia として知られており多種多様な間質細胞と癌細胞から構成されている。そのような間質細胞から真に癌細胞に作用し転移・浸潤や治療抵抗性など悪性化の原因となっている細胞を純化するために、本研究では、多色の蛍光を駆使し、癌細胞と間質細胞を選別、さらに特徴的な間質細胞を同定する。膵癌が desmoplasia として豊富な間質を含んでいることに重点を置いて、固形癌に特有な周囲微小環境も含めて解析を行う。本研究は今までの膵癌研究とは明らかに着眼点が異なっており、これまでに治療標的とされたことが無い細胞をターゲットに据えたものである。

### 3. 研究の方法

まず、CD34, CD44, CD54, CD90, CD105, CD133, CD308, CD309 など間葉系や内皮性幹細胞のマーカーを用い、切除組織より樹立した間質細胞集団の prospective isolation を進め、それに続く機能解析により更に詳細な phenotyping を行い、複数の有望なマーカーを同定し、そのマーカーにより特異的に分取した細胞集団の機能解析を進めた。また、純化した間質細胞集団を、膵癌細胞と共培養もしくはマウスに共移植することで、特定の癌間質細胞集団による癌細胞の増殖・浸潤・EMT への関与を検討し、特に in vivo 環境において癌間質相互作用に深く関わる細胞集団、標的分子の検討を行なった。

### 4. 研究成果

その結果、有望な分子を複数同定した。さらに同定したマーカーにより特異的に分取した細胞集団の機能解析を進め、ある特定の表面マーカーを発現する細胞が癌間質相互作用に深く関わるということが明らかになった。また、純化した間質細胞集団を、膵癌細胞と共培養し、癌の浸潤能に関する変化を検討した結果、マウスに共移植することで、特定の癌間質細胞集団による癌細胞の増殖・浸潤・EMT への関与を明らかにした。特に in vivo 環境において癌間質相互作用に深く関わる細胞集団、標的分子の検討を行い、有望な分子を複数同定した。

また、我々独自の人工ウイルスを改変することにより特定の細胞を標的とするドラッグデリバリーシステムを確立する基盤技術の精度と高め、薬剤や造影剤の封入効率を改善した。

さらに微小環境を制御するために抗線維化薬の一つであるピルフェニドンの効果を in vitro, in vivo において検討し、薬剤の送達効率と腫瘍効果を改善することを明らかにした。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 23 件)

すべて査読有

1. Zhao Ming, Tominaga Yohei, Ohuchida Kenoki, Mizumoto Kazuhiro, Cui Lin, Kozono Shingo, Fujita Hayato, Maeyama Ryo, Toma Hiroki, Tanaka Masao. Significance of combination therapy of zoledronic acid and gemcitabine on pancreatic cancer. *Cancer Science*, 103(1):58-66, 2012
2. Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Kaori Umezaki, Riki Toita, Shigekazu Tabata, Jing Shu Piao, Kana Abe, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida, Lin Cui, Makoto Hashizume. Liver cell specific targeting by the preS1 domain of hepatitis B virus surface antigen displayed on protein nanocages, *International Journal of Nanomedicine*, 7:4353-62, 2012
3. Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Shin Akagawa, Kenji Fujiwara, Daiki Eguchi, Shingo Kozono, Takao Ohtsuka, Shunichi Takahata and Masao Tanaka Pancreatic cancer cells enhance the ability of collagen internalization via epithelial-mesenchymal transition, *PLoS One*, 7(7):e40434, 2012
4. Kosuke Tsutsumi, Norihiro Sato, Kazuhiro Mizumoto, Katsuya Morimatsu Tadashi Kayashima, Hayato Fujita, Kenoki Ohuchida, Takao Ohtsuka, Shunichi Takahata, Masao Tanaka, *Claudin-4* expression predicts survival in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Annals of Surgical Oncology*, 19 Suppl 3:S491-9, 2012
5. Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Cui Lin, Jun Yu, Hiroshi Yamaguchi, Shunichi Takahata, Takao Ohtsuka, Norihiro Sato, Hiroki Toma, Masafumi Nakamura, Eishi Nagai, Makoto Hashizume, and Masao Tanaka MicroRNA-10a is Overexpressed in Human Pancreatic Cancer and Involved in its Invasiveness possibly via Suppression of the HOXA1 gene, *Annals of Surgical Oncology*, 19:2394-402, 2012
6. Kenji Fujiwara, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Koji Shindo, Naoki Ikenaga, Shunichi Takahata, Shinichi Aishima, and Masao Tanaka A CD271-positive subpopulation of pancreatic stellate cells is correlated with the prognosis of patients with pancreatic cancer and regulated by interaction with cancer cells, *PLoS ONE*, 7(12):e52682, 2012
7. Prawej Mahawithitwong, Kenoki Ohuchida, Naoki Ikenaga, Hayato Fujita, Ming Zhao, Shingo Kozono, Koji Shindo, Takao Ohtsuka, Shinichi Aishima, Kazuhiro Mizumoto and Masao Tanaka Kindlin-1 expression is involved in migration and invasion in pancreatic cancer, *International Journal of Oncology* 42: 1360-1366, 2013
8. Daiki Eguchi, Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Shingo Kozono, Lin Cui, Fujiwara Kenji, Koji Shindo, Takao Ohtsuka, Shunichi Takahata, Kazuhiro Mizumoto and Masao Tanaka. Pancreatic stellate cells in hypoxia enhance pancreatic cancer invasiveness via secretion of connective tissue growth factor. *Journal of Surgical Research*, 181:225-33, 2013
9. Shingo Kozono, Kenoki Ohuchida, Daiki Eguchi, Naoki Ikenaga, Kenji Fujiwara, Ming Zhao, Lin Cui, Koji Shindo, Kazuhiro Mizumoto, and Masao Tanaka Pirfenidone inhibits desmoplasia of pancreatic cancer by regulating stellate cells. *Cancer Research*, 73:2345-56, 2013
10. Prawej Mahawithitwong, Kenoki Ohuchida, Naoki Ikenaga, Hayato Fujita, Ming Zhao, Shingo Kozono, Koji Shindo, Takao Ohtsuka, Shinichi Aishima, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka Kindlin-2 expression in peritumoral stroma is associated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*, 42:663-9, 2013
11. Riki Toita, Masaharu Murata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida, Makoto Hashizume Biological evaluation of protein nanocapsules containing doxorubicin, *International Journal of Nanomedicine*, 8:1989-1999, 2013
12. Ana Ines Cases, Takao Ohtsuka, Minoru Fujino, Noboru Ideno, Shingo Kozono, Ming Zhao, Kenoki Ohuchida, Shinichi Aishima, Masatoshi Nomura, Yoshinao Oda, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka Expression of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor and Its Effects on Biological Behavior in Pancreatic Neuroendocrine Tumors, *Pancreas*, 43(1) 1-6, 2014
13. Nobuhiro Torata, Kenoki Ohuchida, Shin Akagawa, Lin Cui, Shingo Kozono, Kazuhiro Mizumoto, Shinichi Aishima, Yoshinao Oda, Masao Tanaka, Tissue Tablet Method: An Efficient Tissue Banking Procedure Applicable to Both Molecular Analysis and Frozen Tissue Microarray, *Human Pathology*, 45(1) 143-52, 2014

14. Kenji Fujiwara, Kenoki Ohuchida, Takao Ohtsuka, Kazuhiro Mizumoto, Koji Shindo, Naoki Ikenaga, Lin Cui, Shunichi Takahata, Shinichi Aishima, and Masao Tanaka Migratory activity of CD105+ pancreatic cancer cells is strongly enhanced by pancreatic stellate cells, *Pancreas*, 42(8)1283-90, 2013
15. Shingo Kozono, Kenoki Ohuchida, Takao Ohtsuka, Lin Cui, Daiki Eguchi, Kenji Fujiwara, Ming Zhao, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka S100A4 mRNA expression level is a predictor of radiosensitivity of pancreatic cancer cells, *Oncology Reports*, 30(4) 1601-8, 2013
16. Daiki Eguchi, Kenoki Ohuchida, Shingo Kozono, Naoki Ikenaga, Koji Shindo, Lin Cui, Kenji Fujiwara, Shin Akagawa, Takao Ohtsuka, Shunichi Takahata, Shoji Tokunaga, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka MAL2 expression predicts distant metastasis and short survival in pancreatic cancer, *Surgery*, 154(3) 573-82, 2013
17. Shindo Koji, Aishima Shinichi, Ohuchida Kenoki, Fujiwara Kenji, Mizumoto Kazuhiro, Tanaka Masao, Oda Yoshinao Fibroblasts expressing podoplanin enhance the tumor progression of invasive ductal carcinoma of pancreas, *Molecular Cancer*, 12(1):168, 2013
18. Yoshinori Fujimura, Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Daiki Setoyama, Miho Irie, Daisuke Miura, Hiroyuki Wariishi, Masaharu Murata, Kazuhiro Mizumoto, Makoto Hashizume and Masao Tanaka Mass Spectrometry-based Metabolic Profiling of Gemcitabine-sensitive and Gemcitabine-resistant Pancreatic Cancer Cells, *Pancreas*, in press
19. 大内田研宙、大塚隆生、水元一博、田中雅夫 特集タイトル:臨床検体から導き出す消化器病研究テーマ:6)膵液中バイオマーカーで膵疾患の診断、早期発見はできるか 分子消化器病 vol.11 no.1 (2014年3月1日発行)
20. 大内田研宙、大塚隆生、水元一博、田中雅夫 腫瘍内 heterogeneity に着目した膵癌個別化治療の可能性 -腫瘍個別化から細胞個別化へ- 胆と膵 Vol.30(2), 165-9, 2013
21. 大内田研宙、大塚隆生、水元一博、田中雅夫 膵癌における癌間質相互作用 特集:膵癌診療と研究の最先端 胆と膵 3 2 巻9号, 807-10,2011
22. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M. Molecular biology-based diagnosis and therapy for pancreatic cancer *Fukuoka Igaku Zasshi*. 2011 Jun;102(6):203-14
23. 大内田研宙, 藤田逸人、水元一博、田中雅夫 膵癌の分子生物学的解析の現状 腫

瘍内科, 7 巻 2 号 131-6, 2011

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Fujiwara K, Ohuchida K, Akagawa S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M CD166 Expression Characterized Tumorigenicity, and Invasive and Migratory Activities of Pancreatic Cancer Cell Lines, *Ammerican Pancreatic Association, 44th Annual Meeting, Miami, 2013*
2. Cases A.I., Ohtsuka T, Fujino M, Ideno N, Kzono S, Zhao M, Ikenaga N, Ohuchida K, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M Expression of Glucagon-like Peptide 1 Receptor and Biological Behavior in Pancreatic Neuroendocrine Tumors, *Ammerican Pancreatic Association, 44th Annual Meeting, Miami, 2013*
3. Ideno N, Ohtsuka T, Tamura K, Aso T, Ohuchida K, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M Clinical significance of GNAS mutation for invasive pancreatic carcinoma distinct from/derived from intraductal papillary mucinous neoplasm(IPMN) of the pancreas, *Ammerican Pancreatic Association, 44th Annual Meeting, Miami, 2013*
4. Nakata K, Zhao M, Ohuchida K, Miyasaka Y, Maeyama R, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Tanaka M Salinomycin induced Autophagy and is Related with its Killing Effect for Pancreatic Cells *Ammerican Pancreatic Association, 44th Annual Meeting, Miami, 2013*
5. Tamura K, Ohtsuka T, Ideno N, Aso T, Shindo K, Oda Y, Ohuchida K, Takahata S, Mizumoto K, Tanaka M Treatment Strategy for Main Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreatic Based on the Assessment of Recurrence in the Remnant Pancreas after Resection: A Retrospective Review. *Ammerican Pancreatic Association, 44th Annual Meeting, Miami, 2013*
6. Mizuuchi Y, Aishima S, Ohuchida K, Shindo S, Mizumoto K, Tanaka M Reduced Anterior Gradient 2 Expression is Induced by EMT and Correlated with Poor Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma *Ammerican Pancreatic Association, 44th Annual Meeting, Miami, 2013*
7. Tanaka T, Ohuchida K, Mizumoto K, Kozono S, Tanaka M Histon Deacetylase 1 is Responsible for Radioresistance of Pancreatic Cancer cells *Ammerican Pancreatic Association, 44th Annual Meeting, Miami, 2013*
8. Akagawa S, Ohuchida K, Torada N, Eguchi D, Kozono S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M Comparisons of Characteristics of Peritoneal Fibroblasts in Dissemination with those of Mesothelial Cells and

- Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Cancer  
American Pancreatic Association, 44th  
Annual Meeting, Miami, 2013
9. Sada M, Ohuchida K, Fujiwara K, Horioka K,  
Tanaka T, Zheng B, Cases A.I., Akagawa S,  
Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Oda Y,  
Mizumoto K, Tanaka M Clinical  
Significance of Stromal CD90 and  
alpha-SMA Expression in Pancreatic Cancer  
American Pancreatic Association, 44th  
Annual Meeting, Miami, 2013

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (2)研究分担者

大塚 隆生 (OHTSUKA TAKAO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20372766

村田 正治 (MURATA MASAHARU)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研  
究拠点・准教授

研究者番号：30304744

佐藤 典弘 (SATO NORIHIRO)

産業医科大学・医学(系)研究科(研究院)・  
助教

研究者番号：20423527

(2011年)

### (3)連携研究者

なし