

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591008

研究課題名(和文) 膵星細胞による膵癌幹細胞 stemness 制御機構の解明とその治療応用

研究課題名(英文) Stellate cell-mediated regulation of stemness maintenance in pancreatic cancer stem cells

研究代表者

正宗 淳 (MASAMUNE, Atsushi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90312579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：膵星細胞との共培養により、膵癌幹細胞性の指標である、スフェロイド形成能や、上皮間葉形質転換誘導性転写因子であるSnailやABCG2などの発現増加が確認された。膵癌細胞を膵星細胞とともにヌードマウスの皮下に接種した場合、膵癌細胞単独に比べて腫瘍径の増大がみられ、膵星細胞が膵癌幹細胞性を増強することが示された。マイクロアレイによる解析に基づき、この相互作用を担うマイクロRNAとして、miR-210を同定した。さらに高血圧の治療薬であるオルメサルタン投与により、膵星細胞-膵癌細胞間相互作用を阻害したところ、腫瘍増大の抑制作用がみられ、新たな膵癌治療のターゲットである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Indirect co-culture of pancreatic cancer cells with PSCs enhanced the spheroid-forming ability of cancer cells and induced the expression of cancer stem cell-related genes ABCG2, Nestin and LIN28. In addition, co-injection of PSCs enhanced tumorigenicity of pancreatic cancer cells in vivo. These results suggested a novel role of PSCs as a part of the cancer stem cell niche. miR-210 was identified as an upregulated micro RNA by co-culture with PSCs. Inhibition of miR-210 expression decreased stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. Olmesartan, an angiotensin II type I receptor blocker, administered at 10 mg/kg in drinking water inhibited the growth of subcutaneous tumors derived from the co-injection of pancreatic cancer cells and stellate cells. Olmesartan inhibited the growth of tumors by targeting stellate cell activities, and olmesartan might be useful as an anti-fibrosis therapy in pancreatic cancer.

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：胆道学、膵臓学

キーワード：膵癌 膵炎 マイクロRNA 膵線維化 シグナル伝達 薬剤耐性 膵星細胞

1. 研究開始当初の背景

膵癌は代表的な予後不良癌である。多数を占める切除不能膵癌に対して、ゲムシタピンなどの化学療法や化学放射線療法が行われるが、治療の経過とともに抵抗性が獲得され腫瘍の再増大や転移がおきてくる。このような薬剤抵抗性、放射線抵抗性、再発時の腫瘍原性など全ての統一的原因として癌幹細胞 (cancer stem cell) の存在が指摘されている。癌幹細胞は、組織幹細胞と同様に自己複製能を有して癌細胞を供給し、多様な分化度を呈する癌細胞のヒエラルキーを再構築する。化学療法や放射線治療により“非”癌幹細胞を死滅させ、腫瘍の縮小効果が得られても、残存腫瘍では治療に抵抗性である癌幹細胞が濃縮され、結果として腫瘍の再増大や再発、転移を引き起こす。

一方、癌幹細胞が、自己複製能と多分化能を維持するためには幹細胞ニッチ (niche) と呼ばれる特別な微小環境が必須である。膵癌は、desmoplastic reaction と呼ばれる高度な線維化を伴う。この膵線維化を担うのは膵星細胞である。申請者は、膵星細胞研究にいち早く着手し、膵星細胞の細胞機能や活性化機構、細胞内シグナル伝達機構などを内外に先駆けて報告した。特に、膵星細胞が periostin などのマトリックス細胞蛋白の産生を介し、膵癌の進展に好都合な微小環境を作り出すこと、膵星細胞が膵癌細胞の上皮間葉転換を誘導すること、膵星細胞は膵癌放射線治療中における腫瘍の再増大を引き起こすことを示した。これらの知見は、膵星細胞が、膵幹細胞の幹細胞性維持に関わることを強く示唆する。

2. 研究の目的

膵癌幹細胞の特性である“stemness” (幹細胞性) の、膵星細胞による制御機構を明らかにし、その制御機構をターゲットとした新しい膵癌治療法の開発をはかることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ヒト膵星細胞として、膵切除標本より分離した初代培養膵星細胞あるいは、SV40 large T 抗原および hTERT を、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入して不死化した hPSC21-S/T 細胞を用いた。

(1)膵星細胞が膵癌幹細胞様形質に与える影響の検討

ヒト膵癌細胞 AsPC-1 単独あるいは膵星細胞とともに ICR ノードマウス背部に皮下移植して腫瘍形成能を評価した。

ヒト膵癌細胞 AsPC-1 あるいは SUIT-2 細胞を膵星細胞と、culture insert を用いて非接着条件下で共培養した。Ultralow attachment culture dish 上でのスフェロイド形成能ならびに、癌幹細胞マーカーである ABCG2、Nestin、LIN28 発現をリアルタイム PCR で評価した。

(2)膵星細胞による膵癌細胞マイクロ RNA 発現プロファイルの変化

(1)と同様に、膵癌細胞単独あるいは膵星細胞と共培養し、マイクロ RNA を抽出した。904 マイクロ RNA を搭載した (Agilent Technologies 社製) マイクロアレイにより、膵癌単培養と膵星細胞との共培養間でマイクロ RNA 発現プロファイルを比較した。発現の差異の見られたマイクロ RNA については、細胞内シグナル伝達経路阻害剤を用いて、膵星細胞による発現誘導機構を検討するとともに、anti-miR 阻害剤を用いて、発現を抑制し、膵癌細胞形質を評価した。

(3)アンジオテンシン II 受容体拮抗剤の腫瘍形成抑制効果の検討

膵星細胞-膵癌幹細胞間相互作用をターゲットとした新たな膵癌治療法の開発に向けて、膵癌細胞単独あるいは膵癌細胞 + 膵星細胞を皮下移植したヌードマウスに、アンジオテンシン II 受容体拮抗剤であるオルメサルタンを 10mg/kg で投与し、腫瘍増殖に与える影響を評価した。

4. 研究成果

(1)AsPC-1 膵癌細胞を膵星細胞とともにヌードマウスの皮下に接種した場合、膵癌細胞単独に比べて、有意に腫瘍径の増大がみられた (図 1)。

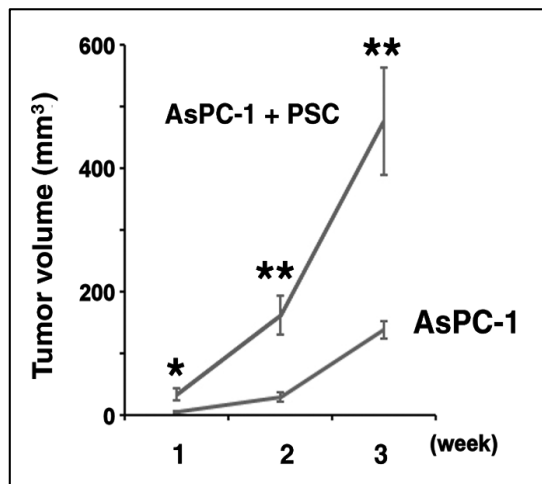


図 1

膵星細胞との共培養により、膵癌細胞のスフェロイド形成能は増加し (図 2)、上皮間葉形質転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) 誘導性転写因子である Snail や ABCG2、Nestin、LIN28 の発現増加が確認された。これらの知見により、膵星細胞が膵癌幹細胞性を増強することが示された。

(2)(1)で認められた膵星細胞-膵癌(幹)細胞間相互作用を司るマイクロ RNA を同定するために、マイクロアレイを行った。膵星細胞との共培養により、膵癌細胞において miR-210 の発現が強く誘導された (図 3)。

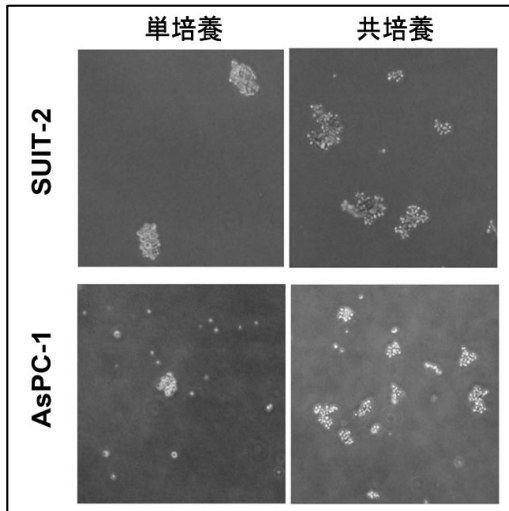


図 2

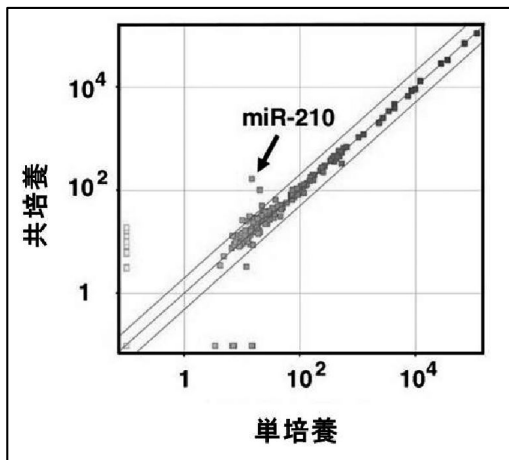


図 3

膵星細胞との共培養による miR-210 の発現誘導は、AsPC-1、Panc-1、SUIT-2 の、3 種の膵癌細胞において、リアルタイム PCR により確認された。

次に膵星細胞による miR-210 発現誘導機構を検討した。HIF-1 に関してはウエスタンブロットング、蛍光免疫染色どちらにおいても膵星細胞との共培養による発現上昇を認めなかった。一方、リン酸化 ERK、リン酸化 Akt に関しては PSC-CM 処理後 10 分後から蛋白レベルで発現上昇を認めた。MEK1/2 inhibitor である U0126、PI3 Kinase inhibitor である LY294002 添加で有意な miR-210 発現低下を認めた。これらより、膵星細胞による膵癌細胞の miR-210 発現機構には ERK 経路ならびに PI3K/Akt 経路の関与が考えられた。

さらに、anti-miR inhibitor を用いた miR-210 一過性発現抑制ならびに miR-210 安定発現抑制株(PKD6)を作成して、miR-210 の膵癌細胞機能における役割を検討した。miR-210 の発現抑制により、コントロール株(PKDC)に比べて、膵星細胞との共培養による遊走(図 4)や ABCG2 発現誘導、上皮間葉変換が抑制された。

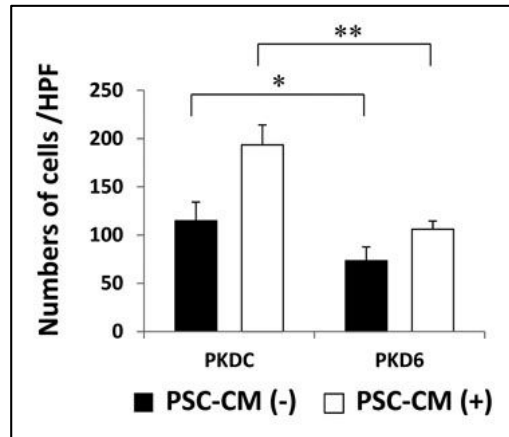


図 4: miR-210 発現抑制株(PKD6)とコントロール株(PKDC)で、膵星細胞培養上清(PSC-CM)による遊走誘導を Two-chamber assay で検討した。*: P<0.05, **: P<0.01

以上より、miR-210 が膵星細胞-膵癌(幹)細胞間相互作用を担う重要なマイクロ RNA であることが示唆された。

(3)オルメサルタン投与により、皮下腫瘍の増大は著明に抑制された(図 5)。

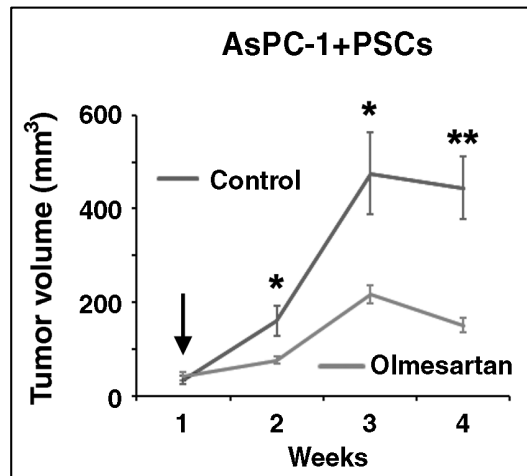


図 5: 膵癌細胞(AsPC-1)をヌードマウスの皮下に、単独、あるいは膵星細胞(PSCs)と共に移植した。オルメサルタン(10mg/kg)を投与し、腫瘍径の経時的変化を評価した。*: P<0.05, **: P<0.01 vs コントロール。

興味深いことに、膵癌細胞単独で皮下移植した場合には抑制効果はみられず、オルメサルタンが膵星細胞をターゲットとして、腫瘍増大抑制効果を示すことが示唆された。

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 15 件)

1. Masamune A, Nakano E, Hamada S, Takikawa T, Yoshida N, Shimosegawa T.

Alteration of the microRNA expression

profile during the activation of pancreatic stellate cells.

Scand J Gastroenterol. 2014;49:323-331.

doi: 10.3109/00365521.2013.876447.

査読有

2. Miura S, Hamada S, Masamune A, Satoh K, Shimosegawa T.

CUB-domain containing protein 1 represses the epithelial phenotype of pancreatic cancer cells.

Exp Cell Res. 2014;321:209-218.

doi: 10.1016/j.yexcr.2013.12.019.

査読有

3. Unno J, Masamune A, Hamada S, Shimosegawa T.

The zinc transporter LIV-1 is a novel regulator of stemness in pancreatic cancer cells.

Scand J Gastroenterol. 2014;49:215-221.

doi: 10.3109/00365521.2013.865075.

査読有

4. Hamada S, Masamune A, Miura S, Satoh K, Shimosegawa T.

MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX.

Cell Signal. 2014;26:179-185.

doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.003.

査読有

5. Hamada S, Masamune A, Shimosegawa T.

Inflammation and pancreatic cancer: disease promoter and new therapeutic target.

J Gastroenterol. 2014;49:605-617.

doi: 10.1007/s00535-013-0915-x.

査読有

6. Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen JM, Chandak GR, Masamune A, Bence M, Szmola R, Oracz G, Macek M Jr, Bhatia E, Steigenberger S, Lasher D, Bühler F, Delaporte C, Tebbing J, Ludwig M, Pilsak C, Saum K, Bugert P, Masson E, Paliwal S, Bhaskar S, Sobczynska-Tomaszewska A, Bak D, Balascak I, Choudhuri G, Nageshwar Reddy D, Rao GV, Thomas V, Kume K, Nakano E, Kakuta Y, Shimosegawa T, Durko L, Szabó A, Schnür A, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Pfützer R, Schneider A, Groneberg DA, Braun M, Schmidt H, Witt U, Friess H, Algül H, Landt O, Schuelke M, Krüger R, Wiedenmann B, Schmidt F, Zimmer KP, Kovacs P, Stumvoll M, Blüher M, Müller T, Janecke A, Teich N, Grützmann R, Schulz HU, Mössner J, Keim V, Löhr M, Férec C, Sahin-Tóth M. .

Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis.

Nature Genet. 2013;45:1216-1220.

doi: 10.1038/ng.2730.

査読有

7. Takikawa T, Masamune A, Hamada S, Nakano E, Yoshida N, Shimosegawa T.

miR-210 regulates the interaction between pancreatic cancer cells and stellate cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2013;437:433-439.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.097.

査読有

8. Masamune A, Shimosegawa T.

Pancreatic stellate cells: multi-functional cells in the pancreas.

Pancreatology. 2013;13:102-105.

doi: 10.1016/j.pan.2012.12.058.

査読有

9. Kikuta K, Masamune A, Hamada S, Takikawa T, Nakano E, Shimosegawa T.

Pancreatic stellate cells reduce insulin expression and induce apoptosis in pancreatic -cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2013;433:292-7.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.095.

査読有

10. Masamune A, Hamada S, Kikuta K, Takikawa T, Miura S, Nakano E, Shimosegawa T.

The angiotensin II type I receptor blocker olmesartan inhibits the growth of pancreatic cancer by targeting stellate cell activities in mice.

Scand J Gastroenterol. 2013;48:602-609.

doi: 10.3109/00365521.2013.777776.

査読有

11. Hamada S, Satoh K, Miura S, Hirota M, Kanno A, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Unno J, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T.

miR-197 induces epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by targeting p120 catenin.

J Cell Physiol. 2013;228:1255-63.

doi: 10.1002/jcp.24280.

査読有

12. Tahara H, Sato K, Yamazaki Y, Ohyama T, Horiguchi N, Hashizume H, Kakizaki S, Takagi H, Ozaki I, Arai H, Hirato J, Jesenofsky R, Masamune A, Mori M.

Transforming growth factor- activates pancreatic stellate cells and may be

doi: 10.1002/jcp.24280.

査読有

12. Tahara H, Sato K, Yamazaki Y, Ohyama T, Horiguchi N, Hashizume H, Kakizaki S, Takagi H, Ozaki I, Arai H, Hirato J, Jesenofsky R, Masamune A, Mori M.

Transforming growth factor- activates pancreatic stellate cells and may be

doi: 10.1002/jcp.24280.

involved in matrix metalloproteinase-1 upregulation.
Lab Invest. 2013;93:720-732.
doi: 10.1038/labinvest.2013.59.
査読有

13. Masamune A, Suzuki N, Kikuta K, Ariga H, Hayashi S, Takikawa T, Kume K, Hamada S, Hirota M, Kanno A, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T.
Connexins regulate cell functions in pancreatic stellate cells.
Pancreas. 2013;42:308-316.
doi: 10.1097/MPA.0b013e31825c51d6.
査読有

14. Hamada S, Masamune A, Takikawa T, Suzuki N, Kikuta K, Hirota M, Hamada H, Kobune M, Satoh K, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells.
Biochem Biophys Res Commun. 2012;421:349-354.
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.014.
査読有

15. Erkan M, Adler G, Apte MV, Bachem MG, Buchholz M, Detlefsen S, Esposito I, Friess H, Gress TM, Habisch HJ, Hwang RF, Jaster R, Kleeff J, Klöppel G, Kordes C, Logsdon CD, Masamune A, Michalski CW, Oh J, Phillips PA, Pinzani M, Reiser-Erkan C, Tsukamoto H, Wilson J.
StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research.
Gut. 2012;61:172-178.
doi: 10.1136/gutjnl-2011-301220.
査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 正宗淳, 下瀬川徹. ビタミン D は膵星細胞をターゲットとして膵線維化を抑制する. 第 21 回日本消化器関連学会週間、2013 年 10 月 11 日、東京.

2. Masamune A. Pancreatic stellate cells -multi-function cells in the pancreas- 17th International Symposium on the Cells of the Hepatic Sinusoid. 2013 年 9 月 24 日、大阪.

3. Masamune A, Kikuta K, Hamada S, Nakano E, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells induce -cell dysfunction and apoptosis -a novel mechanism of diabetes in diseased pancreas-. Digestive Disease Week 2013, the American Gastroenterological Association. 2013 年

5 月 19 日、アメリカ合衆国オーランド.

4. Masamune A. Pancreatic stellate cells -Multi-functional cells in the pancreas-. American Pancreatic Association/International Pancreatic Association, 2012 Joint Meeting. 2012 年 11 月 1 日. アメリカ合衆国マイアミ.

5. 滝川哲也, 正宗淳, 濱田晋, 海野純, 鈴木範明, 桑潔, 菊田和宏, 菅野敦, 廣田衛久, 佐藤賢一, 下瀬川徹. 膵星細胞は膵癌細胞の癌幹細胞様形質を増強する. 第 20 回日本消化器関連学会週間. 2012 年 10 月 11 日、神戸.

6. Suzuki N, Masamune A, Kikuta K, Takikawa T, Hayashi S, Shimosegawa T. Pancreatic Stellate Cells Express Inducible Nitric Oxide Synthase. 2012 Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. 2012 年 5 月 20 日、アメリカ合衆国サンディエゴ.

7. Masamune A, Suzuki S, Kikuta K, Takikawa T, Hayashi S, Ariga H, Shimosegawa T. MicroRNA Profiles Are Altered During the Activation in Pancreatic Stellate Cells. 2012 Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. 2012 年 5 月 20 日、アメリカ合衆国サンディエゴ.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正宗淳 (MASAMUNE, ATSUSHI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90312579

(2) 研究分担者

濱田晋 (HAMADA SHIN)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20451560