

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592007

研究課題名(和文) ヒトCD133陽性膵癌幹細胞を用いた新規膵癌治療薬の開発

研究課題名(英文) Targeting therapy using chemotherapy-resistant pancreatic cancer stem cells

研究代表者

清水 一也 (Shimizu, Kazuya)

神戸大学・保健学研究科・研究員

研究者番号：50335353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：治療法の開発にもかかわらず、膵臓がんは予後不良で、がん死亡率の第5位である。本研究ではヒト膵癌幹細胞株の増殖阻害機構を分子レベルで解明し、これらを応用した新規治療薬の開発をめざすことを目的としている。われわれは既存の抗がん剤に対して耐性を示した進行膵癌患者から膵癌幹細胞株の樹立する新規性の高い方法を確立した。また、この細胞株を免疫不全マウスに移植すると、患者膵臓がんと同じ組織型を示した。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma is highly resistant to systemic chemotherapy. In gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma patients. By use of in vitro co-culture system with stromal cells, we established a novel pancreatic tumor-initiating cell line. The cell line required its direct interaction with stromal cells for its in vitro clonogenic growth and passaging. Their direct interaction induced basal lamina-like extracellular matrix formation that maintained colony formation. The cell line expressed CD133 protein, which expression level changed autonomously and by culture conditions. These results demonstrated that there were novel pancreatic tumor-initiating cells that required direct interactions with stromal cells for their in vitro cultivation in gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma. This cell line would help to develop novel therapies that enhance effects of gemcitabine or novel anti-cancer drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：膵臓がん がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は癌死亡率の第5位にあり、早期診断が困難できわめて予後不良の疾患であり、発見時には多くの症例ですでに遠隔転移や癌性腹膜炎を伴っている。遠隔転移や癌性腹膜炎を伴った膵癌患者にはGemcitabineやTS-1を用いた抗がん剤治療が行われているが、5年生存率は0%である。また遠隔転移がなく根治手術を行った場合でも5年生存率は20%には及ばない。このように外科的治療、化学療法、放射線療法による集学的治療の進歩にも関わらず死亡率や死亡数は増加傾向にあり、病因解明や新しい治療法の開発が急務である。最近、正常組織と同様に癌組織にも幹細胞の存在が報告されており、上皮系・非上皮系を問わず、様々な癌組織の幹細胞が同定されつつあり、癌幹細胞を標的とした新たな治療法開発が注視されている。これまでに、我々は正常の膵幹細胞を同定しこの膵幹細胞が幹細胞マーカーであるCD133を発現していることを明らかにした<sup>[1]</sup>。また、悪性度の高いヒト膵管状腺癌が幹細胞マーカー(CD133)を発現する一方、低悪性度の膵管内乳頭粘液性腫瘍がCD133を発現しないことも明らかにした<sup>[2]</sup>。一方、我々はGemcitabineやTS-1に耐性をもつ進行膵癌患者の肝転移巣と癌性腹水、癌性胸水からCD133陽性膵癌幹細胞株を樹立する実験系の開発に成功している。今回、抗がん剤治療耐性膵癌患者より樹立した膵癌幹細胞を用いて抗がん剤耐性の分子機構を分子レベルで解明することで膵癌幹細胞を標的とした新規治療薬の開発を行う。

[1] Hori Y, Fukumoto M, Kuroda Y. Enrichment of putative pancreatic progenitor cells from mice by sorting for prominin1 (CD133) and PDGFR b. *Stem Cells*. 26: 2912-2920, 2008.

[2] Shimizu K, Itoh T, Shimizu M, Ku Y, Hori Y. CD133 expression pattern distinguishes intraductal papillary mucinous neoplasms from ductal adenocarcinomas of the pancreas. *Pancreas* 38: e307-e214, 2009.

## 2. 研究の目的

研究の全体構想は膵癌幹細胞の新規治療薬の開発を目指すことである。我々は正常膵幹細胞と高悪性度のヒト膵癌が幹細胞マーカー(CD133)を発現することを明らかにした(Hori *et al.* *Stem Cells* 2008)(Shimizu *et al.* *Pancreas* 2009)(Hashimoto *et al.* *Pathobiology*, 2011)。さらに既存の抗がん剤に耐性のヒト膵癌患者からCD133陽性膵癌幹細胞株の樹立に成功し、予備実験の結果から、ケルセチンとNotch阻害剤がこの細胞株の増殖を抑制することを明らかにしている。本研究ではケルセチンとNotch阻害剤によるヒト膵癌幹細胞株の増殖機構を分子レベルで解明し、膵癌幹細胞を標的とした新規治療薬の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株で Gemcitabine 投与により発現調節をうける因子の同定  
予備実験の結果、我々が樹立した CD133 陽性膵癌幹細胞株ではある種の feeder 細胞の存在が必要であった。一方、抗がん剤未治療の患者からは同様の培養条件を用いても細胞株を樹立できない。そこで、もう一度樹立した細胞を Gemcitabine で処理したあと、発現が増強あるいは抑制される遺伝子の解析を行う。Gemcitabine に対する反応は TUNEL 法で評価した。

(2) ヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株とマウス feeder 細胞との細胞接着機構の解明  
まず、共培養により、マウス feeder 細胞に誘導される細胞外基質を RT-PCR で調べる。また、免疫染色により、確認する。さらに、既報(Hosokawa, 2007; Higuchi, 2010)に従い、人工基底膜を作製して、ヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株のコロニー形成能を評価する。

(3) ケルセチンや Notch 阻害剤のヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株に及ぼす影響と治療への応用

in vivo におけるこれら薬剤の効果を調べるため、 $1 \times 10^6$  個の細胞を免疫不全マウスの膵臓内に移植して、腫瘍形成能を評価する。続いてケルセチンや Notch 阻害剤( $\gamma$ -secretase inhibitors; DAPT, diabenazepine)の in vitro でのコロニー形成抑制能や in vivo での腫瘍抑制効果を検討する。

## 4. 研究成果

(1) in vitro での検討の結果、ヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株は Gemcitabine に対する  $IC_{50}=7 \mu M$  であった。Feeder 細胞との共培養により、コロニーを形成させ、至適濃度の Gemcitabine を投与すると、上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition:EMT)に関与する遺伝子発現が増強した。この結果は免疫染色でも確認された。

(2) ヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株とマウス feeder 細胞との共培養の結果、マウスの細胞外基質のうち、基底膜成分である laminin- $\gamma$ 1, laminin- $\alpha$ 5, collagen IV の遺伝子発現が増強しており、免疫染色でも laminin の発現が確認された(図1)。さらに、マウス feeder 細胞を用いて人工基底膜を作製すると、laminin が強陽性であった。人工基底膜上でヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株を培養すると、type-I collagen 単独に比べて明らかにコロニー形成能が増強した。

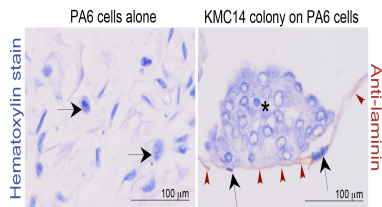


図 1

- (3)  $1 \times 10^6$  個のヒト CD133 陽性膵癌幹細胞を免疫不全マウスの膵臓内に移植して 6 週間後に腫瘍形成能を評価すると、図 2 の矢印のように全てのマウスの膵臓に腫瘍を形成した。

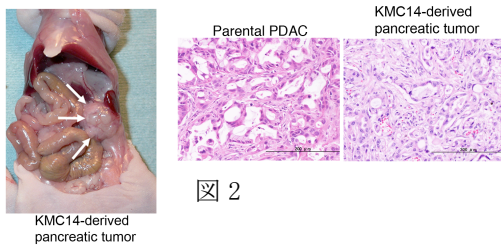


図 2

また、組織を HE 染色で検討すると、患者膵癌組織と類似した adenocarcinoma の所見を呈した。

免疫不全マウスの皮下に腫瘍を形成させたのち、120mg/kg body weight の Gemcitabine を腹腔内投与すると、明らかな腫瘍抑制効果を示した。

次に、Notch 阻害剤 ( $\gamma$ -secretase inhibitors; DAPT, diabenzazepine) の存在下でヒト CD133 陽性膵癌幹細胞とマウス feeder 細胞を共培養すると、in vitro で有意にコロニー形成能が抑制された。

さらに、in vivo での Notch 阻害剤の効果を検討するため、膵臓に腫瘍を形成後に、DAPT を 6 週間腹腔内投与したところ、マウスの体重には変化なかったが、明らかな腫瘍抑制効果を認めた。一方で、ケルセチンの効果は in vitro, in vivo ともに認められなかった。

本研究では、既存の抗がん剤抵抗性膵癌患者由来の細胞株を樹立することに成功した。我々が開発した条件下では、feeder 細胞の存在下、無血清培地では汎幹細胞マーカー CD133 陽性細胞が enrich しており、血清培地では CD133 陽性細胞が減り、分化マーカーが出現する。すなわち、我々の条件下では癌幹細胞の特性を保持した細胞を解析することが可能であった。

また、feeder 細胞との共培養で形成される基底膜様の laminin-rich な人工基底膜を使えば feeder 無しでも培養できる系を確立した。この結果は、今後のそう創薬スクリーニングにとっても意味のある知見である。

膵癌幹細胞を標的とした治療法の開発の足がかりとして Notch 阻害剤の効果を検討したが、明らかなコロニー形成能や腫瘍形成能の抑制を認めたことから、一つの候補となることが示唆された。Notch を介するシグナル伝達経路には feeder 細胞、すなわち、微小環境の影響も考えられるので、今後のさらなる解析が必要である。

## 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 3 件)

- ① Shimizu K, Chiba S, Hori Y. Identification of a novel subpopulation of tumor-initiating cells from gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma patients. PLoS ONE, 査読有、Vol. 8, e81283, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0081283
- ② Hori Y. Prominin-1 (CD133) reveals new faces of pancreatic progenitor cells and cancer stem cells: Current knowledge and therapeutic perspectives. Adv Exp Med Biol. 査読有、Vol. 777, 185-196, 2013. DOI:10.1007/978-1-4614-5894-4\_12.
- ③ Ohtsubo I, Ajiki T, Hori Y, Murakami S, Shimizu K, Fukumoto T, Ku Y. Distinct expression of CD133 between intraductal papillary neoplasms of the bile duct and bile duct adenocarcinomas. Hepatol Res. 査読有、Vol. 42, 574-582, 2012. DOI:10.1111/j.1872\_034X.2011.00954.x.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Shimizu K. Direct interaction between human pancreatic cancer stem cells and stromal cells remodels extracellular matrix formation for cancer stem cell niche. 10<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Research, 2012 年 6 月 13 日, 横浜
- ② Hori Y, Shimizu K. Direct interaction between pancreatic cancer stem cells and stromal cells remodels extracellular matrix formation for cancer stem cell niche. 103<sup>rd</sup> American Association for Cancer Research, 2012 年 4 月 1 日, Chicago, USA
- ③ 堀裕一, 清水一也 膵癌の進展機構における組織幹細胞の関与、第 43 回日本膵臓学会、2012 年 6 月 28 日、山形
- ④ 堀裕一, 清水一也 膵組織幹細胞を用い

た再生医療研究、第 44 回日本膵臓学会、  
2013 年 7 月 25 日、山形

- ⑤ 藤原範人、堀裕一 Gemcitabine が初代膵癌細胞に及ぼす効果の検討、第 45 回日本臨床分子形態学会、2013 年 9 月 13 日、福岡

〔図書〕(計 1 件)

- ① 堀裕一、アークメディア、肝胆膵、2013、734(645-651)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 一也 (Shimizu, Kazuya)  
神戸大学・保健学研究科・保健学研究員  
研究者番号：50335353

### (2) 研究分担者

堀 裕一 (Hori, Yuichi)  
神戸大学・保健学研究科・教授  
研究者番号：80248004

### (3) 連携研究者