

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592013

研究課題名(和文) 癌の悪性度に関わる特定膵星細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of pancreatic stellate cell subsets associated with malignant behavior of pancreatic cancer cells

研究代表者

難波江 俊永 (NABAE, Toshinaga)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：10467889

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)：膵癌の悪性度に関わる特定膵星細胞集団を同定するため、癌間質で発現が増強し、間質に特異的に発現するCD90とポドプランインについて解析した。ヒト膵癌切除組織標本におけるCD90とポドプランイン発現は、予後と相関することが示された。また、同組織より樹立した初代培養膵星細胞のCD90とポドプランインの発現に不均一性を認めた。CD90陰性細胞は、通常培養条件下でCD90陽性細胞の経時的な増加が認められた。一方、ポドプランイン陽性細胞は陰性細胞と比較して膵癌細胞の遊走能と浸潤能を増強すること、またポドプランイン発現がCD10、MMP2、MMP3という浸潤関連遺伝子の発現と相関していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To identify subsets of pancreatic stellate cells which correlate to the malignant behavior of pancreatic cancer cells, we analysed CD90 and podoplanin strongly expressed in cancer stroma. Analysis of human pancreatic cancer specimen revealed CD90 and podoplanin expression were associated with shorter survival time. Pancreatic stellate cells isolated from fresh pancreatic cancer tissue had heterogeneity in CD90 and podoplanin expression. The proportion of CD90 positive cells increased in a time-dependent manner after sorted CD90 negative cells had been maintained under culture conditions. Migration and invasion of pancreatic cancer cell lines were associated with podoplanin expression in stromal cells and expression of CD10, matrix metalloproteinase (MMP) 2, and MMP3.

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：膵癌 膵星細胞 CD90 ポドプランイン

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、悪性新生物における部位別死亡数で5位を占め、近年発生率は上昇傾向である。他の消化器癌とは対照的に、生存率の改善もほとんど認めず、極めて予後の悪い疾患であり、早急に新規治療法の開発が望まれている。前臨床段階で有効とされた治療法が、臨床試験では有効性を認めない事例が多数あり、近年の癌研究においては、癌細胞だけでなく、それをとりまく周囲微小環境の重要性が指摘されている。膵癌の微小環境においては、豊富な線維増生を特徴とする間質の存在が特徴的であり、間質の線維増生を制御する膵星細胞は、癌間質相互作用により、膵癌の進展に関与していることがよく知られている (Vonlaufen et al., Cancer Research, 2008)。また、その膵星細胞集団にも機能的な不均一性が存在し、我々は CD10 陽性膵星細胞が、膵癌の浸潤能・転移能を増強することを見出した。(Ikenaga et al., Gastroenterology 2010)。膵星細胞の中でも癌の悪性度に関わる特定の細胞の解析を更に進めることで、革新的膵癌治療法の開発につながるものと期待される。

2. 研究の目的

膵癌の悪性度に関与する特定の間質細胞集団およびその責任分子を同定し、それらを用いた新規膵癌治療法の開発を行う

3. 研究の方法

(1) 膵星細胞の表面マーカーの解析

ヒト膵癌切除組織からアウト・グロース法で初代培養膵星細胞を樹立し、その表面抗原をフローサイトメトリーを用いて解析する。

(2) 特定の膵星細胞集団の機能解析と関連遺伝子の発現解析

(1)で分離・培養した膵星細胞から、セルソーターや磁気細胞分取装置を用いて特定の膵星細胞集団を分取し、膵癌細胞との共培養実験を行う。そして、増殖能実験、遊走能実験、マトリゲル浸潤能実験を用いて、膵癌細胞の増殖や浸潤を促進する膵星細胞集団を同定する。また、遊走・浸潤に関わる代表的遺伝子の発現解析を量的 RT-PCR を用いて行う。

(3) 臨床病理学的因子の解析

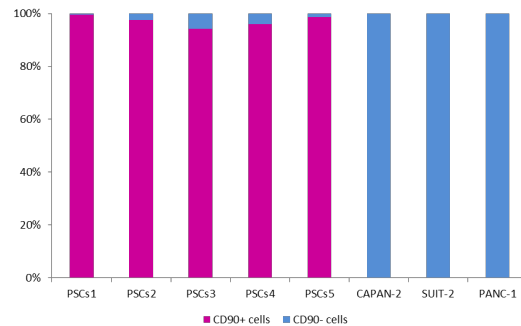
膵癌細胞の悪性度に関与することが同定された特定の膵星細胞集団の表面抗原や責任分子を、当科で手術を施行した膵癌切除組織を用いて、免疫組織染色法で解析し、臨床病理学的因子との関連を検討する。

4. 研究成果

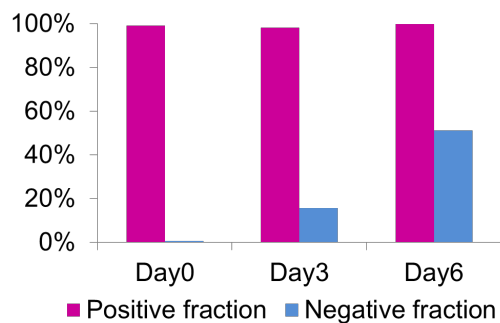
(1) 膵癌間質における CD90 陽性膵星細胞

癌局所の線維芽細胞の由来の1つとして間葉系幹細胞があり、間葉系幹細胞の発現マーカーを中心に膵星細胞の解析を行った。膵癌切除組織から樹立した膵星細胞における間葉系幹細胞のマーカーの1つである CD90 の発現に着目した。フローサイトメトリーによる解析では、CD90 陽性細胞の割合は 93%以上であった。また、セルソーターで CD90 陽性細胞集団と CD90 陰性細胞集団を分取したところ、CD90 陰性細胞集団は通常培養下では経時的に CD90 陽性細胞の割合は増加することが判明した。

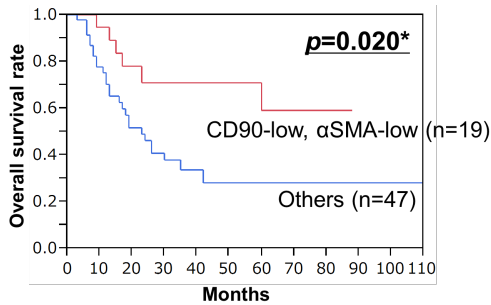
次にヒト膵癌切除組織標本を用いて、CD90 と活性型膵星細胞のマーカーである α -SMA の発現解析を行った。CD90 高発現群は CD90 低発現群に比べて予後不良の傾向にあったが、有意差はなかった。一方、 α -SMA の発現も含めて解析すると、CD90 低発現かつ α -SMA 低発現群は、その他の群に比べて有意に予後良好であった。膵星細胞における CD90 発現は、 α -SMA とともに膵星細胞の活性や癌の悪性度に寄与している可能性が示唆された。



上図：CD90 陽性膵星細胞の割合



上図：CD90 陽性細胞と CD90 陰性細胞の経時的変化

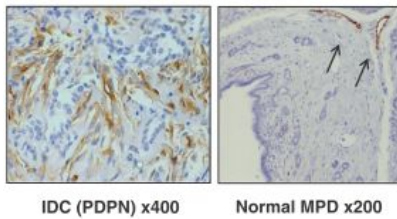


上図：CD90- αSMA 発現による生存曲線

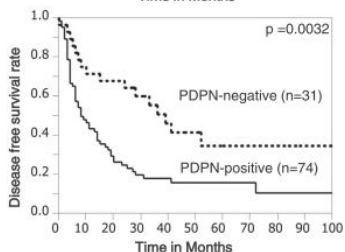
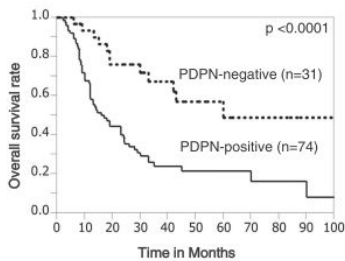
(2) 膵癌間質におけるポドプラニン陽性細胞

癌関連線維芽細胞におけるポドプラニン発現が予後と相関していることが他の癌腫で報告されていることから、我々は膵癌間質におけるポドプラニン発現の意義についても検討した。正常膵組織間質と比較して、癌周囲間質にはポドプラニンが高発現であった。また、膵癌切除組織のポドプラニン発現は、予後と有意に相関することが判明した。

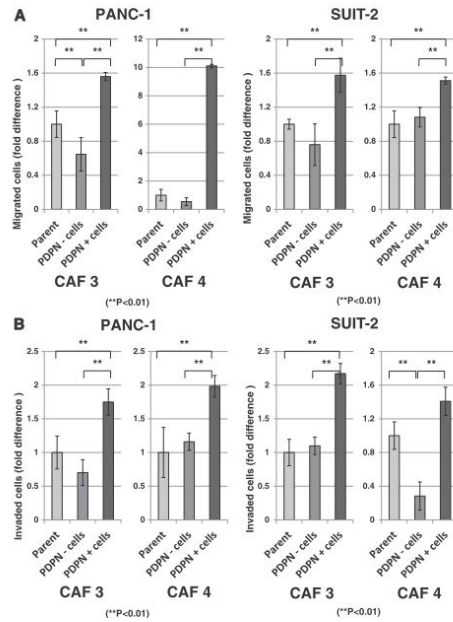
膵癌切除組織から樹立した間質細胞の解析では、ポドプラニン陽性細胞の割合は0.4-94%であった。また、ポドプラニン陽性細胞はポドプラニン陰性細胞と比較して、癌の遊走能・浸潤能を有意に増強させることが間接共培養実験より明らかになった。さらに、ポドプラニンの発現が MMP2、MMP3 といった癌浸潤に関連する代表的分子や、我々が報告した CD10 発現と相関することが明らかになった。以上のことから、膵癌間質におけるポドプラニン発現は癌細胞の遊走能や浸潤能を増強することによって膵癌の悪性度を増すことが明らかとなった。



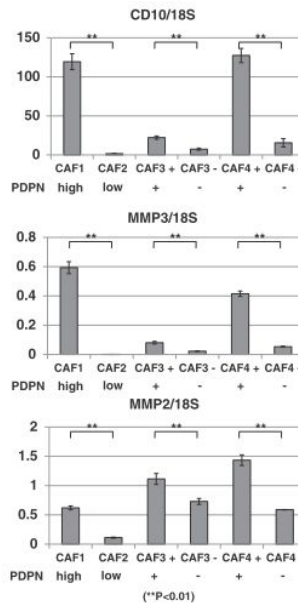
上図：ヒト膵癌組織と正常膵のポドプラニン発現



左下図：ポドプラニン発現による全生存期間と無病生存期間



上図：ポドプラニン陽性細胞と陰性細胞による遊走能・浸潤能



図：ポドプラニン発現と CD10, MMP2, MMP3 発現の関連

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 1 件)
査読有

1. Koji Shindo, Shinichi Aishima, Kenoki Ohuchida, Kenji Fujiwara, Minoru Fujino, Yusuke Mizuuchi, Masami Hattori, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka, Yoshinao Oda Podoplanin

expression in cancer -associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive ductal carcinoma of the pancreas. Mol Cancer. 2013 Dec 20;12(1):168. doi: 10.1186/1476-4598-12-168.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Ikenaga S, CD10 positive pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer, 42nd American Pancreatic Association (APA) Annual Meeting, 2011/11/3-5, Chicago
2. Fujiwara K, The CD271 positive rate of pancreatic stellate cells is correlated with their migration activities enhanced by co-cultured pancreatic cancer cells, Asian Pacific HPBA Congress 2011, 2011/9/27-30, Melbourne
3. Ouchida K, The Functional Heterogeneity of Pancreatic Cancer Cells and Surrounding Stromal Cells in Cancer-Stromal Interactions, The 4th International Conference for Treatment of Pancreatic Cancer, 2011/6/25, Taipei
4. 池永直樹、CD10 陽性膵星細胞は膵癌の進展を促進する、第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011/5/26-28、紙上開催
5. 進藤幸治、Fibroblasts expressing Podoplanin enhance the tumor progression of invasive ductal carcinoma of pancreas 膵腺癌の間質に存在するポドプラニンを発現している繊維芽細胞は腫瘍進行を促進する、The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association -Towards a new era and liaison of cancer research and life science- 第 71 回日本癌学会学術総会 -がん研究とライフサイエンスの更なるリエゾン-、2011/9/19-21、札幌市
6. Shindo K, Fibroblasts Expression podoplanin Enhance the Tumor Progression of Invasive Ductal Carcinoma of Pancreas., American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting, 2012/10/30-11/2, Miami
7. Fujiwara K, CD271+ pancreatic stellate cells are correlated with prognosis of patients with pancreatic cancer and regulated by interaction with cancer

cells, Pancreas Cancer 2012 in Kyoto, 2012/10/4-6, Kyoto

8. 藤原謙次、膵癌における CD271 陽性膵星細胞の意義、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012/4/12-14、千葉市
9. Sada M, Clinical Significance of Stromal CD90 and alpha-SMA Expression in Pancreatic Cancer, American Pancreatic Association, 44th Annual Meeting, 2013/10/30-11/2, Miami

〔図書〕(計 0 件)

〔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 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

難波江 俊永 (NABAE Toshinaga)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10467889

(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

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