

機関番号：17102  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2011  
 課題番号：23659653  
 研究課題名（和文） 膵癌浸潤に関わる新機序—細胞外基質クリアランス機能—に注目した新規治療法の開発  
 研究課題名（英文） The development of pancreatic cancer therapy based on the new mechanism of pancreatic cancer invasion  
 研究代表者  
 大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)  
 九州大学・医学研究院・講師  
 研究者番号：20452708

## 研究成果の概要（和文）：

膵癌の浸潤機構にかかわるあたらしい機序として CD280 陽性膵癌細胞を同定し、その機能を解析した。CD280 は膵癌細胞表面にあり、コラーゲン取り込みレセプターとして機能しており、このレセプターを抑制することで膵癌の細胞内コラーゲン取り込み機能が落ち、癌の浸潤を抑制できることを示した。以上の結果により膵癌における新規治療標的分子として CD280 を同定した。

## 研究成果の概要（英文）：

We identified and characterized CD280 positive pancreatic cancer cells with high malignant potential. Moreover, we clarified that collagen-internalization receptor CD280 was important molecule for invasion of pancreatic cancer cells. We found that the invasion of pancreatic cancer cells was reduced by inhibition of CD280 expression.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：膵臓外科学、膵癌、コラーゲンリモデリング、EMT

## 1. 研究開始当初の背景

癌進展の中心的プロセスである癌浸潤は、細胞外基質(Extracellular matrix; ECM)の分解と形成されたスペースへの細胞遊走から構成される。Matrix metalloproteinase(MMP)がECM分解の主酵素として長く研究され治療標的として期待されてきたが(Derygina, Cancer Metastasis Rev, 2006)、MMP阻害剤では腫瘍の進展を抑制できないことが臨床試験で明らかにされた(Coussens, Science, 2002)。最近、メラノーマ細胞がエンドサイトーシスによりコラーゲンを細胞内に取り込み、リソソームへ輸送していることが報告され(Quintanilla-Dieck, J Invest Dermatol, 2008)、

癌細胞の新たなECMリモデリング機序の存在を示唆するとして注目されている。ECM生成の主役は線維芽細胞であり、線維芽細胞の持つECMの細胞内での分解機構についてはよく知られているが(Lee, J Cell Physiol, 1996)、癌細胞におけるECM成分の取り込み・分解・再合成を一元的に解析した報告は今までにない。また癌の浸潤・転移にかかわるプロセスとして上皮細胞が一時的に間葉系細胞の形態・特徴を獲得する上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition; EMT)が注目されているが(Nakaya, Nature cell biol, 2008)、これと細胞内基質分解機構との関係を調べた研究もない。我々はかねてから膵癌浸潤における線維芽

細胞の役割につき研究しており(Ohuchida, *Cancer Res*,2004; Moriyama, *Cancer*, 2010; Ikenaga, *Gastroenterology*,2010)、線維芽細胞の持つ高い ECM 分解機能と浸潤能に注目していた。また膵癌の高い浸潤能には EMT が関与することにも着目し、EMT を誘導する miRNA や線維芽細胞が分泌する成長因子に関する研究も行ってきた(Fujita, *Cancer Sci*,2009; Yu, *Molecular Cancer*,2010)。以上の知識・経験から、膵癌細胞が浸潤する際、EMT による高い遊走能だけでなく、線維芽細胞特有の ECM 細胞内分解能を獲得し癌細胞自ら ECM リモデリングに積極的に関与しているのではないかと考え、本研究を立案するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、癌細胞内基質分解機構と膵癌浸潤の関係を解明するため次の 4 つを明らかにする。

- ・膵癌細胞による ECM 成分の細胞内取り込み・分解に関わる新規分子の同定
- ・膵癌細胞の EMT と細胞内基質分解機構との関係について
- ・膵癌細胞の細胞内基質分解機構が膵癌の生物学的動態に与える影響について
- ・細胞内基質分解機構を標的とした新規膵癌治療法の開発

## 3. 研究の方法

培養状態において、膵癌細胞株が ECM の internalization、degradation 機構を持つか確認し、それにかかわる分子を同定する。線維芽細胞が高い細胞内基質分解機構を示すことはすでに実証済みであるのでこれとの比較・検討を行った。蛍光標識コラーゲンを使い、膵癌細胞株でコラーゲン internalization 機構を有する細胞と有さない細胞をソーティングにて分取し、各々の phenotype の発現遺伝子を網羅的に解析することで internalization にかかわる分子を同定する。同様にすでに述べたような蛍光商品を使用することでリソソーム輸送や細胞内分解にかかわる新規分子を同定する。また、コラーゲン受容体として報告のある CD280、integrin、細胞内分解に関与するカセプシン(Cat)などを対象として、発現解析や膵癌細胞株を用いた shRNA による抑制実験を行い、細胞内基質分解機構への関与を見る。CD280 は主に線維芽細胞に発現し、コラーゲンクリアランス作用を制御する遊走促進性受容体で上皮細胞にはほとんど発現していないと報告されているが(Curino, *J Cell Biol*, 2005)、我々の preliminary な解析

によりいくつかの膵癌細胞株で CD280 が発現していることを確認している。また、ECM クリアランスをみるため、matrigel でコートした chamber を用いた invasion assay などを行った。

## 4. 研究成果

当研究室で樹立した膵癌高肝転移株 3 種類 (SUIT-2、MiaPACA-2、Panc-1)とその親株とをマイクロアレイにかけ、高い転移能を有する癌細胞集団を標識する表面マーカーの同定を進めた。また EMT の過程で CD280 が上昇すること、CD280 発現膵癌細胞は浸潤能が高いことを同定した。

膵癌幹細胞マーカーとして報告のある CD133、CD24、CD44 を用いて膵癌細胞を分取し phenotyping を行った。さらに、いままで進めてきた CD133、CD24 による膵癌細胞株の分取に加え CD280 やコラーゲン取り込み能から同定した EMT 細胞の細胞分取を試みたが、陽性細胞の割合が低いことやコラーゲンビーズの製品の問題により有効な解析はできなかった。

癌幹細胞マーカー以外にも新たに CD90、CD105、CD280 など他の細胞表面マーカーにより膵癌細胞株あるいは手術切除組織から癌細胞を純化し、生物学的悪性度のプロファイリングを行った。その結果、新しくコラーゲン取り込みレセプターと呼ばれる CD280 を治療標的候補として同定した。CD280 を抑制することで膵癌の細胞内へのコラーゲン取り込み量が低下し、浸潤能が有意に低下することを同定した。また CD280 は膵癌細胞の EMT と密接な関係を有していることも明らかとなった。また、癌細胞周囲に存在する間質細胞の中で特異的に癌の浸潤を促進する細胞集団を同定することにも成功した。

## 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 11 件)

1. **Kenoki Ohuchida**, Kazuhiro Mizumoto, Cui Lin, Jun Yu, Taiki Moriyama, Yoshiyuki Miyasaka, Hiroshi Yamaguchi, Shunichi Takahata, Hiroki Toma, Norihiro Sato, 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*, in press
2. Hayato Fujita, **Kenoki Ohuchida**, Kazuhiro Mizumoto, Soichi Itaba, Tetsuhide Ito, Kohei Nakata, Jun Yu, Tadashi Kayashima, Akifumi

- Hayashi, Ryota Souzaki, Tatsuro Tajiri, Manabu Onimaru, Tatsuya Manabe, Takao Ohtsuka, Masao Tanaka High *EGFR* mRNA Expression Level is a Prognostic Factor for Reduced Survival in Pancreatic Cancer after Gemcitabine-based Adjuvant Chemotherapy International Journal of Oncology, 38; 629-41, 2011
3. Tadashi Kayashima, Kohei Nakata, Kenoki Ohuchida, Hayato Fujita, Cui Lin, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka Insig2 is overexpressed in pancreatic cancer and its expression is induced by hypoxia Cancer Science, 102:1137-43, 2011
  4. Miyasaka Y, Nagai E, Ohuchida K, Fujita H, Nakata K, Hayashi A, Mizumoto K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Senescence in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas, Hum Pathology, 2011 Dec;42(12):2010-7
  5. 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, 2012 Jan;103(1):58-66
  6. Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Tadashi Kayashima, Midori Sato, Hayato Fujita, Taiki Moriyama, Takao Ohtsuka, Junji Ueda, Shunichi Takahata, Makoto Hashizume, and Masao Tanaka. MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer Annals of Surgical Oncology, 18(8):2381-7, 2011
  7. Kurata Nobuaki, Hayato Fujita, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Prawej Mahawithitwong, Hiroshi Sakai, Manabu Onimaru, Tatsuya Manabe, Takao Ohtsuka, and Masao Tanaka Predicting the chemosensitivity of pancreatic cancer cells by quantifying the expression levels of genes associated with the metabolism of gemcitabine and 5-fluorouracil International Journal of Oncology, 39(2):473-82, 2011
  8. Kohei Nakata, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Tadashi Kayashima, Naoki Ikenaga, Hiroshi Sakai, Cui Lin, Hayato Fujita, Takao Ohtsuka, Shinichi Aishima, Eishi Nagai, Yoshinao Oda, and Masao Tanaka. MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer, promotes its invasiveness and is correlated with a poor prognosis, Surgery, 150(5):916-22, 2011
  9. Takaharu Yasui, Kenoki Ohuchida, Ming Zhao, Lin Cui, Manabu Onimaru, Takuya Egami, Takao Ohtsuka, Kazuhiro Mizumoto, Kunio Matsumoto, Masao Tanaka Adenoviral therapy is more effective in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells than in gemcitabine-sensitive cells Anticancer Research, 31:1279-87, 2011
  10. Kosuke Tsutsumi, Norihiro Sato, Cui Lin, Kazuhiro Mizumoto, Yoshihiko Sadakari, Hayato Fujita, Kenoki Ohuchida, Shunichi Takahata, and Masao Tanaka Expression of Claudin-4 (*CLDN4*) mRNA in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas Modern Pathology, 24:533-41, 2011
  11. Takaharu Yasui, Kenoki Ohuchida, Chou Mei, Manabu Onimaru, Takuya Egami, Takao Ohtsuka, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka Tumor-stromal interactions prevent efficacy of adenoviral therapy via HGF-MET pathway Cancer Science, 102:484-91, 2011
- [学会発表] (計 4 件)
1. Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka. The Functional Heterogeneity of Pancreatic Cancer Cells and Surrounding Stromal Cells in Cancer-Stromal Interactions The 4th International Conference for Treatment of Pancreatic Cancer. June 25, 2011. Taipei, Taiwan.
  2. Kenji Fujiwara, Kenoki Ohuchida, Shingo Kozono, Naoki Ikenaga, Lin Cui, Masafumi Nakamura, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka. Pancreatic Stellate Cells Promote Migration of CD105+ Pancreatic Cancer Cells. 42<sup>nd</sup> American Pancreatic Association (APA) Annual Meeting. November 2-5, 2011. Chicago, USA.
  3. 池永直樹、大内田研宙、小藺真吾、Prawej Mahawithitwong、大塚隆生、水元一博、田中雅夫. 膵癌細胞は癌間質相互作用により細胞外基質コラーゲンを取り込み、浸潤を促進する. 第22回日本消化器癌発生学会総会. 2011年11月25日～26日. 佐賀
  4. 小藺真吾、大内田研宙、高浪英樹、江口大樹、藤原謙次、趙蒼、崔林、池永直樹、坂井寛、藤田逸人、大塚隆生、水元一博、田中雅夫. 膵癌細胞株による放射線治療

抵抗性と上皮間葉移行の関連性の検討.  
第47回九州外科学会. 2011年5月7-8日.  
宮崎

[図書] (計3件)

- ①. 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 32巻9号 2011
- ②. 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
- ③. 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

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)  
九州大学・医学研究院・講師  
研究者番号：20452708

### (2) 研究分担者

上田 純二 (UEDA JUNJI)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：90529801

真鍋 達也 (MANABE TATSUYA)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号：60546464

### (3) 連携研究者

なし