

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791544

 研究課題名（和文）膵癌抑制効果を有する特異的間質細胞の同定および新規膵癌治療法の開発  
 研究課題名（英文） Identification of stromal cells that have suppressive role against pancreatic cancer cells and development of new anticancer therapy

研究代表者

森山 大樹（MORIYAMA TAIKI）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：70586859

研究成果の概要（和文）：

膵癌に対して抑制的に作用する特定の間質細胞集団を同定するために、ヒト膵癌切除組織から分離・培養した膵星細胞の表面抗原解析を行い、CD271 に着目した。癌細胞との共培養実験において、膵星細胞の CD271 遺伝子発現増加は一過性であった。また、癌細胞の方向に遊走する膵星細胞の CD271 発現は、遊走しない細胞と比較してより少ないことが明らかになった。膵癌切除組織間質の CD271 発現を免疫組織化学染色で検討すると、CD271 の高発現群は予後良好であった。以上のことから、CD271 陽性膵星細胞が膵発癌の早期において、癌間質相互作用によって膵癌に対して抑制的に作用することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study was to identify subpopulation of stromal cells that suppress pancreatic cancer cells. We analyzed surface marker of pancreatic stellate cells (PSCs) derived from human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), and characterized CD271+ PSCs. Quantitative RT-PCR analyses revealed that CD271 mRNA expression was increased in PSCs after coculture with pancreatic cancer cells. However, the level of CD271 mRNA expression subsequently decreased after the transient increase. Furthermore, CD271 mRNA expression was decreased in PSCs migrating toward pancreatic cancer cells through Matrigel. Immunohistochemistry of PDAC revealed stromal CD271 high expression was associated with a good prognosis. These findings suggest that CD271+ PSCs appear at the early stage of pancreatic carcinogenesis and have suppressive role against pancreatic cancer cells through cancer-stromal interaction.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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、CD271

## 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にある。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。前臨床段階で有効性の確認された数々の治療法が、臨床段階で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、それを取りまく微小環境の重要性が指摘されている。膵癌の微小環境として、豊富な線維増生を特徴とする間質の存在がある。膵癌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、より膵癌の進展に関与していることを明らかにした (Ikenaga et al., Gastroenterology 2010)。一方、脂肪由来間質細胞が膵癌細胞に対して抑制効果を有することが報告された (Cousin et al., PLoS one 2009)。膵癌を抑制的に制御する間質細胞の存在は他にほとんど報告がなく、その機序も明らかにされていない。そのため、癌抑制作用のある膵星細胞集団を同定し、その作用機序を解明できれば、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

膵癌の進展に抑制的に作用する特定の間質細胞集団およびその責任分子を同定し、それらを応用した新規膵癌治療法の開発を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 膵星細胞の表面抗原の解析

ヒト膵癌切除組織由来膵星細胞を分離・培養し、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。その際、脂肪由来間質細胞が膵癌細胞に対して抑制効果を有するという過去の報告から、脂肪細胞にも分化する間葉系幹細胞の表面抗原に着目して解析する。具体的には CD29, CD56, CD90, CD105, CD271 について解析する。

### (2) 特定の膵星細胞集団の機能解析

(1) で分離・培養した膵星細胞から、セルソーター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抑制する膵星細胞集団を同定する。

### (3) 臨床病理学的因子の解析

膵癌細胞を抑制的に制御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) 膵星細胞の表面抗原の解析

当研究室で樹立したヒト膵癌切除組織由来膵星細胞 12 種類の表面抗原の解析をフローサイトメトリーを用いて行った。間葉系幹細胞の表面抗原である CD29, CD56, CD90, CD105, CD271 について検討すると、CD29, CD56, CD90, CD105 の陽性細胞の割合は 90% 以上であった (図 1) が、CD271 陽性細胞は 0.0-2.1% の割合であった (図 2)。

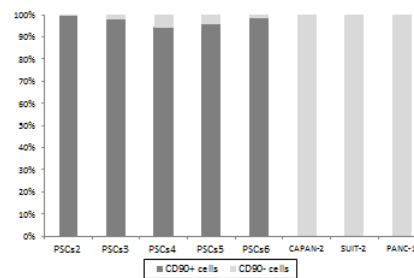


図 1. CD90 陽性細胞の割合

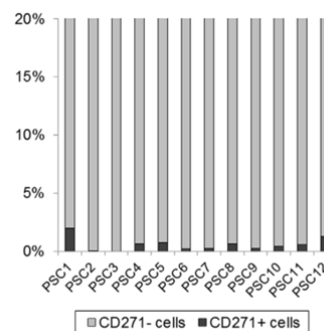


図 2. CD271 陽性細胞の割合

### (2) 特定の膵星細胞集団の機能解析

インナーカップに膵星細胞、アウターカップに膵癌細胞を培養して行う遊走能実験では、癌細胞が存在するアウターカップの方向に遊走する膵星細胞集団が、遊走しない細胞集団よりも CD271 の遺伝子発現量が少ないことが明らかになった (図 3)

膵癌細胞との共培養実験では、CD271 の遺伝子発現は一過性に増加した後に、減少することが明らかになった (図 4)。CD271 陽性細胞を、セル・ソーターで分取して機能実験を行うことを試みたが、CD271 陽性細胞の割合が非常に少ないためか、安定的かつ高純度の CD271 陽性細胞を十分量分取することはでき

なかった。

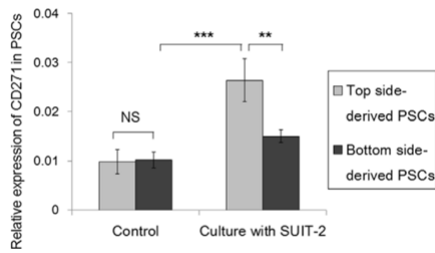


図 3. 遊走能実験における CD271 発現量

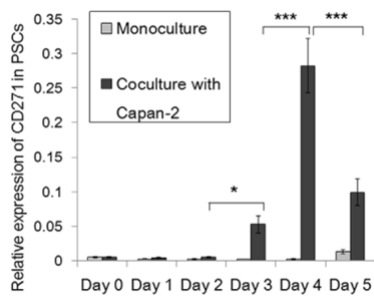


図 4. 共培養における CD271 の発現量

### (3) 臨床病理学的因子の解析

次に、免疫組織化学染色法でヒト膵癌切除組織における CD271 の発現を検討した。CD271 は腫瘍の中心部分ではなく、腫瘍辺縁の間質に発現する傾向があることが明らかになった (図 5)。また、臨床病理学的因子との解析も行い、CD271 の発現量が高いほど予後良好であった (図 6)。

各臨床病理学的因子を多変量解析で検討すると、間質の CD271 発現は独立した予後規定因子であることが明らかになった (図 7)。以上のことから、CD271 は一過性のマーカーであり、発癌過程の早期に膵癌間質に発現することや、CD271 陽性細胞が癌間質相互作用において癌細胞に対して抑制的に働くことが示唆された。

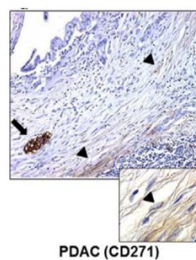


図 5. CD271 の免疫組織化学染色

	Relative risk	95% Confidence interval	p value
CD271 positivity	0.495	0.231-0.962	0.0349
pT category	7.621	1.179-28.117	0.0361
Lymph node metastasis	1.864	0.860-4.658	0.1194
UICC stage	-	-	0.0229
Perilymphatic invasion	1.188	0.509-1.966	0.6751
Perivascular invasion	1.908	1.074-3.717	0.0276
Pathological margin	6.433	0.668-62.02	0.0006

図 6. カプラン・マイヤー生存曲線

	Relative risk	95% Confidence interval	p value
CD271 positivity	0.495	0.231-0.962	0.0349
pT category	7.621	1.179-28.117	0.0361
Lymph node metastasis	1.864	0.860-4.658	0.1194
UICC stage	-	-	0.0229
Perilymphatic invasion	1.188	0.509-1.966	0.6751
Perivascular invasion	1.908	1.074-3.717	0.0276
Pathological margin	6.433	0.668-62.02	0.0006

図 7. 多変量解析

### 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)

Fujiwara K, Ohuchida K, Mizumoto K, Shindo K, Eguchi D, Kozono S, Ikenaga N, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. CD271<sup>+</sup> subpopulation of pancreatic stellate cells correlates with prognosis of pancreatic cancer and is regulated by interaction with cancer cells. PLoS One. 2012;7(12):e52682. doi:10.1371/journal.pone.0052682.

[学会発表] (計 3 件)

1. 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、千葉、2012/04/13

2. Kenji Fujiwara\_CD271<sup>+</sup> pancreatic stellate cells are correlated with prognosis of patients with pancreatic cancer and regulated by interaction with cancer cells, International Symposium on Pancreas Cancer 2012 in Kyoto 2012/10/6

3. 佐田政史、大内田研宙、藤原謙次、赤川進、江口大樹、小園真吾、進藤幸治、水元一博、田中雅夫、 膵癌間質におけるCD90 と $\alpha$ -SMA 発現の意義、第113回日本外科学会定期学術集会、福岡、2013/04/11

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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

森山 大樹 (MORIYAMA TAIKI)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：70586859

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし

研究者番号：