

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390305

研究課題名(和文) 膵癌幹細胞の発生プロセスと特性変化の細胞系譜的解析

研究課題名(英文) Identification of pancreatic cancer stem cell lineage during pancreatic tumorigenesis

研究代表者

関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00323569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌モデルマウスより様々な発癌段階の膵癌組織を採取し単細胞化し、癌幹細胞マーカーとして知られるいくつかの表面抗原を認識する特異的抗体を用いてセルソーターにより細胞を分離した。分離した細胞が癌幹細胞としての能力を有するか検討し、腫瘍形成能を持つ癌幹細胞を同定した。さらに癌が進行したマウスより採取した癌幹細胞は転移能も有することが明らかとなった。さらに発癌初期の膵癌腫瘍組織より分離した腫瘍形成能をもつ膵癌幹細胞は転移能を有していないが、この発癌初期の癌幹細胞より形成された膵癌ゼノグラフトの細胞をゼノグラフトで植え継ぐと転移能を有する細胞へと増悪化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer tissues were harvested from different carcinogenesis stages of pancreatic model mice. The cells were separated by cell sorter using a specific antibody that recognizes a number of surface antigens known as a cancer stem cell marker. The separated cells were examined either have a capability as cancer stem cells. Cancer stem cells collected from mice with progressed cancer were found to have metastatic potential in addition to the tumor forming potency. Furthermore, pancreatic cancer stem cells with tumor-forming ability that was separated from the carcinogenic early pancreatic cancer tumor tissue does not have a metastatic potential, but the metastatic potential succeed planting cells of pancreatic cancer xenografts, which is formed from this carcinogenesis early cancer stem cells in a xenograft. It revealed to exacerbate into cells having .

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：癌 細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は、特徴的な臨床症状が乏しいために早期発見が非常に困難で、また治療を行った場合でも再発率および転移率が高く極めて予後の悪い難治性癌である。事実、発症数と死亡数がほぼ同数で、我が国の癌による死亡数の第5位に位置することから膵癌の診断および治療応用へ向けた基盤研究の推進が急務であるといえる。これまでの研究から、膵癌の発癌・転移・再発には癌幹細胞(cancer stem cell)が関与すると言われており、膵癌幹細胞が転移や化学放射線療法に抵抗性を示すことが高い再発率を示す原因であると考えられている。

癌幹細胞は癌組織内に存在し自己複製能をもつ幹細胞としての性質を有し、自己複製と分化を繰り返すことにより、不均一な癌組織を形成していることが明らかとなってきた。これまでに白血病の解析から、癌幹細胞は組織幹細胞に変異が蓄積することにより発生することが明らかにされており、固形組織においても分化細胞よりも組織中に長く生存する幹細胞に変異が蓄積することによって発生する可能性が高いと考えられるが、その詳細は不明な点が多い。

我々は膵癌幹細胞は膵幹細胞に遺伝子変異が蓄積し、膵幹細胞の特性変化が生じたことにより出現したと考えている。したがって、最初に癌ができる元(cell-of-origin)となる膵癌幹細胞の発生プロセス、および腫瘍の増悪に伴う細胞生物学的特性変化を細胞系譜を追って明らかにすることが膵癌の治療法および診断法の開発を目指す上で重要な基盤となると考えられる。

そこで、膵幹細胞の機能異常としての膵癌幹細胞の出現プロセスとその後の転移能獲得までの幹細胞特性に焦点を絞り、膵癌の発生母地および転移および化学放射線療法耐性の本態と考えられる膵癌幹細胞の基盤研究を進め膵癌を克服するための知見の蓄積を試みている。膵癌では膵管癌(pancreatic ductal adenocarcinoma)が膵癌全体の約95%を占めるが、我々は膵管上皮中にごくまれに存在するPdx1陽性細胞が膵幹細胞として機能することを見いだしている。このことから、膵癌に膵管癌が多いのは膵管上皮細胞中に存在する膵幹細胞が、膵癌幹細胞の発生母地となっている可能性が高いと考える

ことができる。

一方、膵癌は肝臓に高率に転移することが知られているが、肝転移した転移性肝臓癌中の癌幹細胞がどのような特性を持つのか全く明らかではない。癌幹細胞を標的とした治療を行うには、一口に癌幹細胞といってもどのような性状の癌幹細胞を標的としなければならないのか、ということを知ることは極めて重要である。そこでこれら進行度の異なる複数の癌幹細胞の違いを細胞系譜を追って明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

これまで膵癌の cell-of origin となる膵癌幹細胞を同定すること、発癌後増悪化し治療抵抗性を獲得した癌幹細胞、転移後の癌幹細胞の特性変化を細胞系譜を追って解析することは不可能であった。本研究課題ではヒト膵癌で高率に見られる1st hitの遺伝子変異(KrasG12D)とさらに2nd hitの遺伝子変異(CDKN2A欠損)を導入した遺伝子変異膵癌モデルマウスを用い、遺伝子変異が導入された膵管上皮中の発癌前の膵幹細胞の自己複製の頻度などの特性解析を行う。特に膵幹細胞の特性である自己複製制御が膵癌モデルマウス中のPdx1+細胞において異常が認められるか否かを解析する。さらに、2nd hitの遺伝子変異を導入した膵癌モデルマウスで見られる浸潤と肝転移に焦点を当て、浸潤性・転移性をもつ癌幹細胞を解析し、膵幹細胞、最初に癌ができる元となる膵癌幹細胞との関係を系譜的に解析し、増悪過程における特性変化の解明を試みる。

## 3. 研究の方法

1st hitの遺伝子変異(KrasG12D)とさらに2nd hitの遺伝子変異(CDKN2A欠損)を導入した遺伝子変異膵癌モデルマウスを用いた。このモデルマウスでは生後9週間前後で膵癌は発症するため、生後4-10週のマウスを解剖し、様々な発癌段階の膵癌組織を得た。この膵癌組織を酵素処理により単細胞化し、各種細胞表面抗原を認識する特異的抗体を用いてセルソーターにより細胞を分離した。分離した細胞を同系統のマウス皮下に移植することでそれぞれの細胞の腫瘍形成能を検討した。また、分離した細胞を同系統のマウス脾臓に

移植することで肝臓への転移能を検討した。

#### 4. 研究成果

膵癌モデルマウスより様々な発癌段階の膵癌組織を採取し単細胞化し、癌幹細胞マーカーとして知られるいくつかの表面抗原を認識する特異的抗体を用いてセルソーターにより細胞を分離した。分離した細胞が癌幹細胞としての能力を有するか検討し、腫瘍形成能を持つ癌幹細胞が CD44 を発現することを明らかにした。さらに癌が進行したマウスより採取した CD44 陽性細胞は転移能も有することが明らかとなった。CD44 陽性細胞はこれまでに我々が正常膵臓の幹/前駆細胞として同定した Pdx1 を発現する細胞であった。そこで、Pdx1-EGFP マウスと膵癌モデルマウスと掛け合わせることで Pdx1 発現細胞を可視化することが可能なモデルマウスを作製した。このマウスを用いて CD44 陽性 Pdx1 発現細胞を分離し、腫瘍形成能を検討したところ、Pdx1 発現細胞のみが腫瘍形成能および肝転移能を有する膵癌幹細胞であることが明らかとなった。発癌初期の膵癌腫瘍組織より分離した腫瘍形成能をもつ膵癌幹細胞は転移能を有していない。この発癌初期の癌幹細胞より形成された膵癌ゼノグラフトの細胞をゼノグラフトで植え継ぐと転移能を有する細胞へと増悪化することを明らかにした。以上のことから、当初計画していた膵癌幹細胞を同定と進行度の異なる複数の癌幹細胞の違いを細胞系譜を追って明らかにするという目標を達成したと考えられる。

#### 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22件)

Okuda R, Sekine K, Hisamatsu D, Ueno Y, Takebe T, Zheng YW, Taniguchi H. Tropism of cancer stem cells to a specific distant organ *In Vivo* 28(3):361-5. (2014) <http://iv.iarjournals.org/content/28/3/361.abstract> 査読有

Zheng YW, Tsuchida T, Shimao T, Li B, Takebe T, Zhang RR, Sakurai Y, Ueno Y, Sekine K, Ishibashi N, Imajima M, Tanaka T, Taniguchi H. The CD133+CD44+ Precancerous Subpopulation of Oval Cells is a

Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma *Stem Cells Dev.* 23(18): 2237-49. (2014) doi: 10.1089/scd.2013.0577. 査読有

Sekine K, Takebe T, Taniguchi H. Fluorescent labeling and visualization of human induced pluripotent stem cells with the use of transcription activator like effector nucleases *Transplant Proc*, 46(4):1205-7. (2014) . doi: 10.1016/j.transproceed.2014.02.003 査読有

Koike H, Ueno Y, Naito T, Shiina T, Nakata S, Ouchi R, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Isono KI, Koseki H, Taniguchi H. Ring1B promotes hepatic stem/progenitor cell expansion via simultaneous suppression of Cdkn1a and Cdkn2a. *Hepatology*. 60 :323-33. (2014) doi: 10.1002/hep.27046. 査読有

Takebe T, Koike N, Sekine K, Fujiwara R, Amiya T, Zheng YW, Taniguchi H. Engineering of human hepatic tissue with functional vascular networks. *Organogenesis*. 10(2): 260-7. (2014) doi: 10.4161/org.27590. 査読有

Takebe T, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, Koike N, Sekine K, Taniguchi H. Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature Protocols* 9, 396-409 (2014) doi: 10.1038/nprot.2014.020. 査読有

Zhang RR, Takebe T, Miyazaki L, Takayama M, Koike H, Kimura M, Enomura M, Zheng YW, Sekine K, Taniguchi H. Efficient hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells in a three-dimensional microscale culture. *Methods Mol Biol.* 1210:131-41. (2014) doi: 10.1007/978-1-4939-1435-7\_10. 査読有

Koike H, Ouchi R, Ueno Y, Nakata S, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Isono K, Koseki H, Taniguchi H. Polycomb group protein Ezh2 regulates hepatic progenitor cell proliferation and differentiation in murine embryonic liver. *PLoS One*. 9: e104776. (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0104776. 査読有

Zhang R, Takebe T, Sekine K, Koike H,

Zheng Y, Taniguchi H.  
Identification of proliferating human hepatic cells from human induced pluripotent stem cells.  
*Transplant Proc.* 46:1201-4. (2014) doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.021. 査読有

Tsuchida T, Zheng YW, Zhang RR, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H.  
The development of humanized liver with Rag1 knockout rats.  
*Transplant Proc.* 46:1191-3. (2014) doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.026. 査読有

Zheng YW, Nie YZ, Tsuchida T, Zhang RR, Aoki K, Sekine K, Ogawa M, Takebe T, Ueno Y, Sakakibara H, Hirahara F, Taniguchi H.  
Evidence of a sophisticatedly heterogeneous population of human umbilical vein endothelial cells.  
*Transplant Proc.* 46:1251-3. (2014) doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.077. 査読有

Takahashi Y, Takebe T, Enomura M, Koike N, Lee S, Nemenko JG, Sekine K, Lee JI, Taniguchi H.  
High-resolution intravital imaging for monitoring the transplanted islets in mice.  
*Transplant Proc.* 46:1166-8. (2014) doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.089. 査読有

Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H.  
Vascularized and functional human liver tissue from an induced pluripotent stem cell-derived organ bud transplant.  
*Nature* 499:481-484. (2013) doi: 10.1038/nature12271. 査読有

Tanaka H †, Tanaka S †, Sekine K †, Kita S, Okamura A, Takebe T, Zheng YW, Ueno Y, Tanaka J and Taniguchi H. †equal contribution.  
The generation of pancreatic  $\beta$ -cell spheroids in a simulated microgravity culture system.  
*Biomaterials* 34, 5785–5791. (2013) doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.003 査読有

Yamamoto Y, Yoshizawa T, Fukuda T, Shirode-Fukuda Y, Yu T, Sekine K, Sato T, Kawano H, Aihara KI, Nakamichi Y,

Watanabe T, Shindo M, Inoue K, Inoue E, Tsuji N, Hoshino M, Karsenty G, Metzger D, Chambon P, Kato S, Imai Y.  
Vitamin D Receptor in osteoblasts Is a negative regulator of bone mass control.  
*Endocrinology.* 154:1008-1020. (2013) doi: 10.1210/en.2012-1542. 査読有

Koike H †, Kubota K †, Sekine K †, Takebe T, Zheng YW, Ueno Y, Tanigawa N, Taniguchi H. †equal contribution.  
Establishment of Automated Culture System for Induced Pluripotent Stem Cells  
*BMC Biotechnol.*, 12:81 (2012) †equal contribution.  
doi: 10.1186/1472-6750-12-81. 査読有

Sekine K and Taniguchi H.  
Basics and applications of stem cells in the pancreas  
*J Hepatobiliary Pancreat Sci.*, 19(6), 594-9. (2012) Review  
doi: 10.1007/s00534-012-0545-3. 査読無

Hirose Y, Saijou E, Sugano Y, Takeshita F, Nishimura S, Nonaka H, Chen YR, Sekine K, Kido T, Nakamura T, Kato S, Kanke T, Nakamura K, Nagai R, Ochiya T, Miyajima A.  
Inhibition of Stabilin-2 elevates the circulating hyaluronic acid level and prevents tumor metastasis  
*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109 (11) 4263-4268. (2012)  
doi: 10.1073/pnas.1117560109. 査読有

Sekine K, Takebe T, Enomura M, Matsui C, Tanaka H, Taniguchi H.  
Regenerative medicine approach as an alternative treatment to islet transplantation.  
*Transplant Proc*, 44 (4), 1104-1106. (2012) doi: 10.1016/j.transproceed.2012.03.020. 査読有

Sekine K, Takebe T, Suzuki Y, Kamiya A, Nakauchi H, Taniguchi H.  
Highly efficient generation of definitive endoderm lineage from human induced pluripotent cells.  
*Transplant Proc*, 44 (4), 1127-1129. (2012) doi: 10.1016/j.transproceed.2012.03.001. 査読有

②Takebe T, Sekine K, Suzuki Y, Enomura M, Tanaka S, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H.  
Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro.

*Transplant Proc*, 44 (4) 1018-1020. (2012)  
doi: 10.1016/j.transproceed.2012.02.007.  
査読有

②Takebe T, Koike N, Sekine K, Enomura M, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H.  
Generation of human vascular network in vitro.  
*Transplant Proc*, 44, 1130-1133. (2012)  
doi: 10.1016/j.transproceed.2012.03.039.  
査読有

〔学会発表〕(計25件)

膵癌転移における微小環境と癌幹細胞の相互作用の解析  
濱中香織、奥田諒、関根圭輔、谷口英樹  
第14回日本再生医療学会総会 2015年 Mar19-21  
パシフィコ横浜(神奈川県)

膵癌幹細胞の転移における特定臓器への指向性  
泉陽彦、竹歳卓人、関根圭輔、奥田諒、濱中香織、谷口英樹  
第14回日本再生医療学会総会 2015年 Mar19-21  
パシフィコ横浜(神奈川県)

iPS細胞を用いた代謝性臓器の再生医療  
武部貴則、関根圭輔、谷口英樹  
第14回日本再生医療学会総会 2015年 Mar19-21  
パシフィコ横浜(神奈川県)

A novel system with human liver features for screening anti-hepatitis B virus therapeutics  
Nie YZ, Zheng YW, Zhang RR, Tsuchida T, Ueno Y, Sekine K, Takebe T, Taniguchi H  
第14回日本再生医療学会総会 2015年 Mar19-21  
パシフィコ横浜(神奈川県)

遺伝子改変モデル動物を用いた膵癌幹細胞の機能解析  
第41回日本臓器保存生物医学会学術集会 (招待講演) 2014年 Nov 28-29  
関根圭輔、奥田諒、久松大介、濱中香織、谷口英樹  
千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

Identification and characterization of Pdx1+ pancreatic cancer stem cell during pancreatic tumorigenesis  
関根圭輔、奥田諒、久松大介、谷口英樹  
第73回日本癌学会学術総会 2014年 Sep25- 27  
パシフィコ横浜(神奈川県)

Identification of pancreatic cancer stem cell lineage during pancreatic tumorigenesis  
奥田諒、関根圭輔、久松大介、孫略、濱中香織、谷口英樹  
第73回日本癌学会学術総会 2014年 Sep25- 27  
パシフィコ横浜(神奈川県)

スフィア形成能を有する膵癌幹細胞の解析  
久松大介、奥田諒、関根圭輔、濱中香織、上野康晴、谷口英樹

第73回日本癌学会学術総会 2014年 Sep 25-27  
パシフィコ横浜(神奈川県)

久松大介、奥田 諒、関根圭輔、上野康晴、谷口英樹  
膵癌幹細胞の系譜解析に向けた invitro アッセイ系の構築  
第13回日本再生医療学会総会 2014年 Mar.4-6,2014 京都国際会館(京都府)

iPS細胞を用いた代謝性臓器の創出技術開発拠点  
谷口英樹、武部貴則、関根圭輔、鄭 允文、上野康晴  
第13回日本再生医療学会総会 2014年 Mar.4-6,2014 京都国際会館(京都府)

ヒト iPS細胞由来臓器原基移植による機能的なヒト肝臓の創出  
武部貴則、関根圭輔、谷口英樹  
第13回日本再生医療学会総会 2014年 Mar.4-6,2014 京都国際会館(京都府)

ヒト iPS細胞の肝細胞分化誘導プロトコルの至適化  
ヒト iPS細胞の肝細胞分化誘導プロトコルの至適化  
大鐘ひなつ、武部貴則、小池博之、川又史佳、木村昌樹、関根圭輔、谷口英樹  
第13回日本再生医療学会総会 2014年 Mar.4-6,2014 京都国際会館(京都府)

Pdx1陽性細胞は高い腫瘍形成能とスフィア形成能を有する癌幹細胞である  
奥田諒、関根圭輔、孫略、坪井康次、谷口英樹  
第72回日本癌学会学術総会 2013年 Oct3-5  
パシフィコ横浜(神奈川県)

膵幹/前駆細胞の膵癌幹細胞への形質転換プロセスの解析  
関根圭輔、孫略、奥田諒、谷口英樹  
第72回日本癌学会学術総会 2013年 Oct.3-5  
パシフィコ横浜(神奈川県)

マウス胎仔肝幹細胞から成体肝細胞への分化に伴い抑制性ヒストン修飾の局在と標的遺伝子が大きく変化する  
中田晋、上野康晴、小池博之、関根圭輔、谷口英樹  
第72回日本癌学会学術総会 2013年 Oct.3-5  
パシフィコ横浜(神奈川県)

ヒト膵癌幹細胞における治療抵抗性機構の解析  
星野小百合、関根圭輔、孫略、中田晋、寺崎哲也、森永総一郎、宮城洋平、遠藤格、横瀬智之、倉田昌直、上野康晴、谷口英樹  
第72回日本癌学会学術総会 2013年 Oct.3-5  
パシフィコ横浜(神奈川県)

Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant

The 20th JSRH annual meeting 2013年 Sep26-27  
Special Lecture(招待講演)  
関根圭輔, 谷口英樹 大阪国際会議場(大阪府)

Ueno Y, Hoshino S, Tsuchida N, Nakata S, Uchida Y, Sekine K, Zheng YW, Kurata M, Morinaga S, Miyagi Y, Yokose T, Endo I, Terasaki T, Hirano H, Taniguchi H  
Targeted proteomic absolute quantification on transporters of human pancreatic cancer cells with gemcitabine-resistance.  
HUPO 12th annual world congress. 2013年, Sep 14-18 パシフィコ横浜(神奈川県)

Fluorescence visualization of human induced pluripotent stem cells using transcription activator-like (TAL) effector nucleases.  
Sekine K, Takebe T, Zhang R, Taniguchi H  
The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation 2013年 Sep 2-6 京都国際会館 (京都府)

Creation of vascularized and functional human liver from an induced pluripotent stem cell-derived organ bud transplant. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Zhang R, Kimura M, Ogaeri T, Yoshizawa E, Kawamata F, Koike N, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H  
The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation 2013年 Sep 2-6 京都国際会館 (京都府)

②① Flow cytometric identification and characterization of endothelial progenitor cells in human umbilical vein endothelial cells.  
Zheng YW, Aoki K, Tsuchida T, Zhang R, Sekine K, Ogawa M, Takebe T, Yasumura K, Ueno Y, Sakakibara H, Hiranaka F, Taniguchi H  
The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2013年 Sep 2-6 京都国際会館 (京都府)

②奥田諒、孫略、関根圭輔、松井智栄美、坪井康次、谷口英樹：膵癌幹細胞の in vitro アッセイ系の解析 第35回日本分子生物学会年会  
Dec.11-14,2012 福岡国際会議場(福岡県)

③関根圭輔, 孫略, 上野康晴, 谷口英樹  
膵幹細胞を起点とした膵発癌プロセスにおける膵癌幹細胞の細胞系譜的解析 第22回日本サイトメトリー学会 シンポジウム(招待講演) 2012年 Jun 29-30 千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

④Sekine K, Ishikawa M, Takebe T, Suzuki A, Kawashimo K, Matsui C, Taniguchi H:  
Identification of pancreatic stem/progenitor cells expressing PDX1 reside in the CD133 positive pancreatic duct. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual

meeting. Jun 13-16,2012 パシフィコ横浜(神奈川県)

⑤Takebe T, Sekine K, Enomura M, Suzuki Y, Koike H, Zhang R, Koike N, Ueno Y, Zheng Y, Taniguchi H:  
Creation of vascularized human organ from induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> annual meeting. Jun 13-16,2012 パシフィコ横浜(神奈川県)

〔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 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
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  
関根 圭輔 (Sekine Keisuke)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号：00323569

(2)研究分担者  
谷口 英樹 (Taniguchi Hideki)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：70292555

武部 貴則 (Takebe Takanori)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：20612625

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：