

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591014

研究課題名(和文) 膵癌における癌間質相互作用に関わるmicrovesiclesの機能解明とその制御

研究課題名(英文) Functional analysis and regulation of microvesicles that affect tumor-stromal interaction in pancreatic cancer.

研究代表者

清水 祐紀子 (SHIMIZU, Yukiko)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10404021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膵癌癌間質相互作用に関与しているマイクロベシクルと呼ばれる $2\mu\text{m}$ 以下の膜貫通物質を同定・解析し、その制御を行うことである。

膵癌細胞と膵星細胞との相互作用の研究を更に進めるため、膵星細胞における表面抗原CD146に着目し、その解析を行った。免疫組織化学染色法でヒト膵癌切除組織におけるCD146陽性膵星細胞を解析すると、膵癌の前癌病変であるPanINの周囲に多く存在し、浸潤癌の周囲ではあまり発現していないことが判明した。これらの結果から、CD146陽性膵星細胞は何らかの液性因子やマイクロベシクルを介して膵癌細胞に対して抑制的な機能を有している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify and analyse the microvesicles affecting tumor-stromal interaction in pancreatic cancer. To clarify the functional interaction between pancreatic cancer cells and pancreatic stellate cells (PSCs), we focused CD146 expression in PSCs.

Immunohistochemistry revealed that CD146 positive PSCs were around the PanIN, the premalignant lesion of pancreatic cancer, but around the invasive carcinoma there was few CD146 positive PSCs. This result indicating that CD146 positive PSCs have suppressive function for pancreatic cancer cells, and some kind of soluble factor or microvesicles are mediating between them.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 膵星細胞 ミクロベシクル

1. 研究開始当初の背景

膵癌の病理学的・生物学的特徴は過剰な間質増生 (desmoplasia) である。この間質増生における中心的な役割を担う膵星細胞は癌細胞と相互に遊走能・浸潤能を増強させ、薬剤送達率の低下とも関連することが明らかになっている。癌細胞を標的とした新規抗腫瘍薬や分子標的薬だけでは十分な治療成績の改善は得られておらず、膵星細胞との相互作用を標的とした新たな治療戦略の確立が期待されている。

脳腫瘍、乳癌、前立腺癌といった他癌種では癌細胞の細胞質よりマイクロベシクル (Microvesicles) という 2 ミクロン以下の膜貫通物質が放出され、周囲の細胞へ細胞内蛋白や遺伝子情報の受け渡しを行っていることが報告されている (PNAS, 2011, Antonyak)。膵癌細胞と膵星細胞の細胞間相互作用においても、種々の液性因子や増殖因子、マイクロ RNA を介した細胞間シグナル伝達が関与していることが報告されているが、マイクロベシクルの果たす役割やその機能については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は膵癌細胞と膵星細胞との相互作用に関与しているマイクロベシクルと呼ばれる 2 μm 以下の膜貫通物質を同定・解析し、その制御を行うことで、膵癌の新規治療戦略を確立することである。

3. 研究の方法

癌間質相互作用に関する更なる研究のため、下記の実験を行った。

(1) 膵星細胞の表面抗原である CD146 に着目し、癌細胞との相互作用における機能を解析してきた。具体的には免疫組織化学染色法で、膵癌切除症例における CD146 の発現解析を行い、患者の予後との相関を解析した。In Vitro では、初代培養細胞における CD146 の発現をリアルタイム PCR 法や Western blotting で解析した。

さらに、siRNA による CD146 の発現抑制を行い、癌細胞の遊走・浸潤に与える影響を解析した。

(2) 脂肪組織浸潤における脂肪組織由来間質細胞と膵癌細胞との相互作用について解析した。

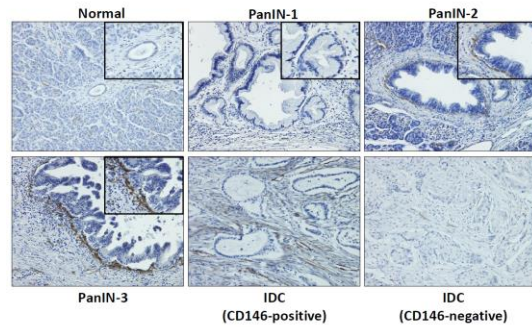
4. 研究成果

(1) 当科で手術を行った膵癌切除組織 110 例を免疫組織化学染色を行って、CD146 の発現を解析した。膵癌組織においては、CD146 は膵癌細胞よりも間質細胞での発現が強かった。

さらに、膵癌の前癌病変である PanIN の周囲にも CD146 陽性の線維芽細胞が存在し、PanIN の grade が上がるにつれて、線維芽細胞における CD146 の発現は増強された。また、浸潤癌の周囲に存在する線維芽細胞の CD146

の発現を陽性、陰性の 2 群に分けると、CD146 陽性群の方が予後良好であった。これらのこ

Immunohistochemical analysis of CD146 in human pancreatic cancer



とから、線維芽細胞の CD146 の発現は膵癌の悪性度に影響していることが示唆された。

図 1 ヒト膵癌組織における CD146 の発現解析 (免疫組織化学染色)

(2) 膵癌切除組織から初代培養した癌関連線維芽細胞における CD146 の mRNA レベルでの発現をリアルタイム PCR で解析すると、癌細胞株よりもその発現が高いことが示された。また、Western blotting で CD146 のタンパクレベルでの発現を確認すると、同様に癌細胞株よりもその発現が高いことが示された。

CD146 expression in CAFs, HUVEC and cancer cells

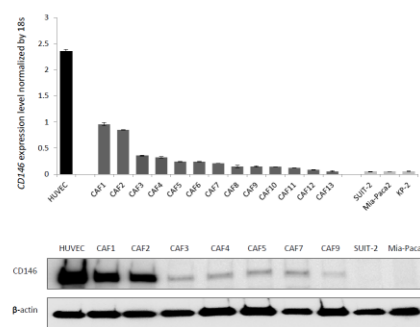


図 2 初代培養細胞における CD146 の発現解析

(3) 癌関連線維芽細胞における CD146 の発現が癌細胞の浸潤能に与える影響を解析するため、癌関連線維芽細胞における CD146 の発現を siRNA で抑制した。CD146 の発現が抑制された線維芽細胞では、膵癌細胞株の遊走・浸潤を有意に亢進させることが判明した。

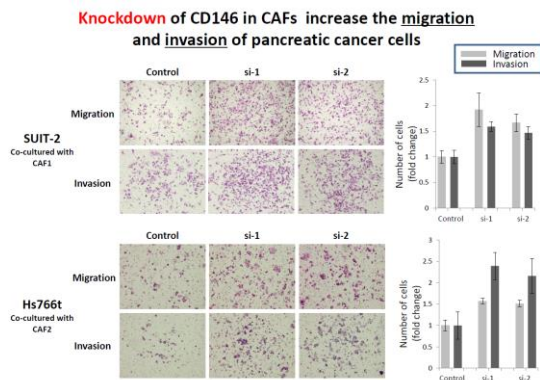


図 3 癌関連線維芽細胞における CD146 の発現抑制が膵癌細胞の浸潤能に与える影響

(4) 癌関連線維芽細胞の CD146 の発現を siRNA で抑制すると、CCL5、CXCL1、SDF1、HGF、Cox2 といったサイトカイン、ケモカインの発現が増強される傾向がみられた。

これらの結果から癌関連線維芽細胞における CD146 の発現は膵癌の浸潤・転移に抑制的に作用している可能性が考えられた。

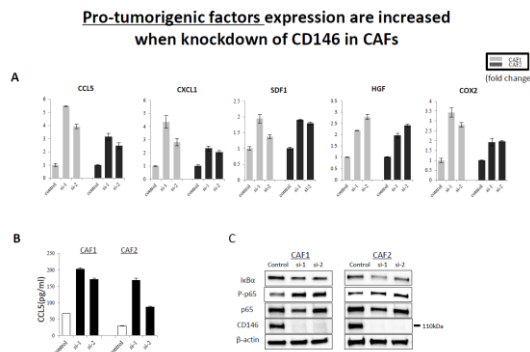


図 4 癌関連線維芽細胞における CD146 の発現抑制によるサイトカイン、ケモカインの産生の変化

(5) 当科で手術を行った膵癌切除標本から癌関連線維芽細胞と脂肪組織由来間質細胞を初代培養した。これらの初代培養細胞を脂肪細胞への分化誘導を行うと脂肪組織由来間質細胞のみ、脂肪細胞へ分化した。このことから、脂肪組織由来間質細胞は癌関連線維芽細胞よりも間葉系幹細胞の性質を維持した細胞であることが示唆された。

## 脂肪細胞分化誘導 → 脂肪滴染色(BODIPY)

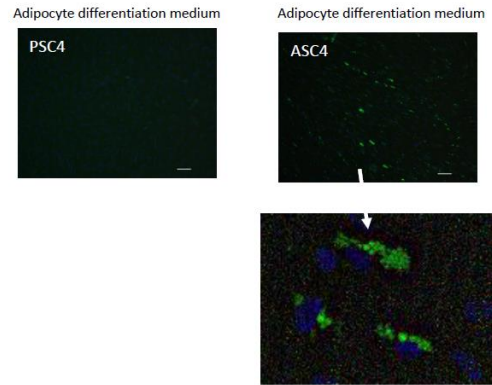


図 5 脂肪細胞への分化誘導実験

(6) 脂肪組織由来間質細胞が間接共培養下で膵癌細胞株の浸潤能に与える影響を解析するため、マトリゲル invasion assay を行った。脂肪組織由来間質細胞も膵癌細胞の浸潤能を有意に増強した。

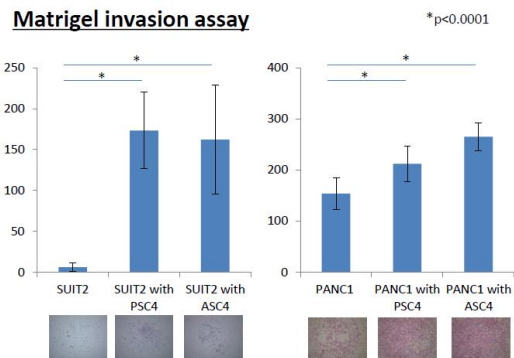


図 6 間接共培養モデルでの脂肪組織由来間質細胞が膵癌細胞の浸潤能に与える影響

## 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)  
全て査読有

1. Akagawa S, Ohuchida K, Torata N, Hattori M, Eguchi D, Fujiwara K, Kozono S, Cui L, Ikenaga N, Ohtsuka T, Aishim S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M, Peritoneal myofibroblasts at metastatic foci promote dissemination of pancreatic cancer, Int J Oncol, 45(1):113-120, 2014, DOI: 10.3892/ijo.2014.2391

2. Shindo K, Aishima S, Ohuchida K, Fujiwara K, Fujino M, Mizuuchi Y, Hattori M, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y, Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive ductal carcinoma of the pancreas, Mol Cancer, 12(1):168, 2013, DOI: 10.1186/1476-4598-12-168

3. Fujiwara K, Ohuchida K, Mizumoto K, Eguchi D, Kozono S, Ikenaga N, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. CD271 Subpopulation of Pancreatic Stellate Cells Correlates with Prognosis of Pancreatic Cancer and Is Regulated by Interaction with Cancer Cells, PLoS One, 7(12):e52682, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0052682

[学会発表] (計 4 件)

1. Sada M, Ohuchida K, Fujiwara K, Horioka K, Tanaka T, Zheng B, Cases AI, Akagawa S, Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka 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 (United States of America)
2. 趙茗、大内田研宙、鄭彪、崔林、小藺真吾、江口大樹、水元一博、田中雅夫, The investigation of CD146 in pancreatic cancer associated fibroblast, 第113回日本外科学会定期学術集会, 2013/4/11-13, 福岡県福岡市
3. 佐田政史、大内田研宙、藤原謙次、赤川進、江口大樹、小藺真吾、趙茗、崔林、大塚隆生、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, 2013/4/11-13, 福岡県福岡市
4. Fujiwara K, Ohuchida K, Mizumoto K, Shindo K, Eguchi D, Kozono S, Ikenaga N, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Tanaka M, 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 (Japan)

[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

清水 祐紀子 (SHIMIZU Yukiko)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号: 10404021

(2) 研究分担者

水元 一博 (MIZUMOTO Kazuhiro)  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号: 90253418

富永 洋平 (TOMINAGA Yohei)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号: 90304823

江上 拓哉 (EGAMI Takuya)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号: 40507787

宮坂 義浩 (MIYASAKA Yoshihiro)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号: 40507795

大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号: 20452708  
(2014年)

(3) 連携研究者

なし