

平成 27 年 4 月 13 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591022

研究課題名(和文) 膵癌根治を目指した人工膵癌幹細胞株の作製とマイクロRNAによる制御

研究課題名(英文) Generation of artificial pancreatic cancer stem cell and its regulation by microRNA in order to develop effective therapy for pancreatic cancer.

研究代表者

佐藤 賢一 (Kennichi, Satoh)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん幹細胞研究部・部長

研究者番号：10282055

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、癌幹細胞を標的とした画期的な治療法を開発することを最終目標として人工膵癌幹細胞を作製し、microRNAによってその特性を制御できるかを検討することを目的とした。正常膵管細胞に活性化型K-ras発現ベクターを導入するとsphereの形成能はコントロールに比べ上昇したが、癌幹細胞マーカー陽性数は増加しなかった。Warburg効果に關与するPKM2の役割を膵癌で検討すると、膵癌では正常組織に比べPKM2の高発現がみられ、発現を抑制すると膵癌細胞増殖が低下した。また、膵癌の幹細胞特性に關与するmicroRNAを同定する過程でmiR-483-3pが膵癌組織で高発現することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to develop effective therapy for pancreatic cancer, we tried to generate artificial pancreatic cancer stem cell. Human pancreatic duct cell line (HPDE) transfected with expression vector of activated K-ras demonstrated the increased sphere formation but could not show the increase in number of cancer stem cell marker positive cells. PKM2, a key molecule for Warburg effect, was significantly expressed in pancreatic cancer cells compared to normal cells. In addition, suppression of PKM2 expression resulted in decreased cellular growth. During the exploration for microRNA associated with cancer stem cell property, miR-483-3p was identified as highly expressed microRNA in pancreatic cancer cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 人工がん幹細胞 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

本邦での膵癌の死亡者数は 2004 年の時点で 2 万人を超えており、癌関連死亡の第 5 位を占めている。また、1993~96 年の部位別 5 年生存率調査によると、癌患者全体の 5 年生存率が 54.3% であり、胃癌は 62%、大腸癌が 68%、肺癌が 22.6% に対し膵癌は 6.5% と他の癌に比べ著しく致死率が高い。一方、最新の膵癌全国調査によると Stage I-III の 3 年生存率が 40% 以上であるのに対し Stage IVa は 16.5%、Stage IVb は 3.9% と極端な予後の短縮がみられ、早期発見が膵癌患者の生命予後向上のための最良の方策であることがわかる。しかし、Stage III 以前に発見される例が全体のわずか 20% 以下であることはいかに膵癌の早期発見が困難で進行が急速なのかを示しており、膵癌患者の予後延長には新しい画期的な治療法の開発が急務である。申請者は膵癌化の初期の変化として K-ras 遺伝子の変異、18q の欠失 (Pancreas, 1996, Cancer Res, 1998)、c-erbB-2 蛋白の過剰発現 (Cancer, 1993)、後期の変化として p53、CD44v、survivin (Cancer, 2001)、の発現、初期から後期にかけての Notch signal の活性化 (Cancer Sci 2007) を明らかにし、これら遺伝子異常同定による膵癌早期診断の可能性を示してきた。しかし、膵癌の大多数を占める進行膵癌を治療標的とするには、これらの遺伝子異常に加えて、癌細胞の転移や化学療法耐性に関与する分子機構を明らかにする必要があった。

癌組織は多様な細胞集団によって構成されている。その中で、通常の癌細胞と異なりごく少数の細胞でも癌を生体内で再構築できる細胞群の存在が示され、癌幹細胞と呼ばれている。癌幹細胞の特徴は: 1) 自らと全く同じ細胞を作り出す自己複製能; 2) 分化度の異なる多種類の細胞に分化する多分化能; 3) 不均等分裂; 4) 高い腫瘍形成能; 5) 細胞周期 G0 期に存在、などの性質を有することが挙げら

れる。癌の転移、抗癌剤や放射線療法に対する耐性は、この癌幹細胞がもたらしていることが示唆されている。従って、この癌幹細胞が最も効率の良い癌の治療標的となることを意味するとともに、この細胞を根絶させない限り癌の根治はあり得ない。現在、さまざまな癌種において癌幹細胞様細胞群が同定されている。膵癌においても ESA+CD24+CD44+ 細胞群あるいは CD133+細胞群に癌幹細胞様細胞が多く含まれていることが報告されている。しかし、これらのマーカーを用いて基礎研究を行うには以下のような問題点がある。I) 上記マーカー陽性の細胞数は症例によっては 0.1% 以下と、研究の材料とするには少なすぎる場合がある。II) これらのマーカーによる選別が癌細胞の腫瘍形成能を反映していない例がある。III) また、膵癌細胞株にはこれらのマーカーを発現していないものもあり、普遍的な膵癌幹細胞マーカーとはなっていない。IV) さらに、癌幹細胞の多分化能を有する性格上、癌幹細胞を分離培養してもそれ以外の細胞数が大多数を占めるようになることから、純粋な癌幹細胞のみを長期的に実験に用いることができない。このように、症例や細胞株から抽出した膵癌幹細胞を長時間安定な状態で研究に用いるのは困難なのが現状である。つまり、膵癌幹細胞を標的とした治療法を開発するためには、普遍的な膵癌幹細胞マーカーの同定と癌幹細胞の個々の性質を自在に、かつ長期間安定的に表現する膵癌幹細胞モデルが必要なのである。IPS 細胞の樹立にみられるように、特定の遺伝子を導入することによって様々な細胞に分化しうる細胞の作製が可能となっている。これは、正常の細胞に様々な遺伝子を導入することによって、例えば、G0 期から逸脱し増殖能が亢進しているといった、必要に応じた性質を強調させた人工癌幹細胞が創作できる可能性を示すものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は癌幹細胞としての性質が EMT や Warburg 効果によってもたらされる可能性があることに着目し、膵癌幹細胞を標的とした画期的な治療法を開発することを最終目標に、以下を行うことである。1) EMT 関連遺伝子と Warburg 効果誘導遺伝子を癌関連遺伝子とともに正常膵管細胞に導入することにより人工膵癌幹細胞を作成し; 2) 癌幹細胞の個々の性質をコントロールしている分子を同定する; 3) その癌幹細胞で特異的に発現する microRNA と細胞表面タンパクを同定し; 4) micro RNA 制御による膵癌幹細胞に対する治療効果を *in vitro* と遺伝子改変膵癌マウス (Pdx1-Kras 変異-p53 変異マウス) 上で確認する; 5) さらに同定した細胞表面タンパクが普遍的な膵癌幹細胞マーカーと成り得るか検討する。

3. 研究の方法

ヒトの正常膵管細胞に癌遺伝子の活性型と癌抑制遺伝子の不活型を導入し、人工膵癌細胞を作製する。その細胞に、EMT 関連遺伝子、Warburg 効果関連遺伝子群を段階的に様々な組み合わせで、遺伝子導入し、自己複製能、多分化能、高腫瘍形成能などを検討する。遺伝子導入の組み合わせによって、variation のある人工膵癌幹細胞株を樹立し、目的とする実験系に合わせ使用する。完全型の人工膵癌幹細胞に特異的に発現する microRNA、RNA を網羅的に解析し、特異的に発現する miRNA、細胞膜表面タンパクを同定する。この同定した miRNA の precursor あるいは anti-microRNA を遺伝子改変マウス導入し、その治療効果を確認する。また、前記で同定した細胞表面タンパクが、普遍的な膵癌幹細胞マーカーとなりえるか、ヒト手術検体を用いて検証する。

4. 研究成果

人工膵癌細胞の作製のために、正常膵管上皮細胞株として知られる、HPDE 細胞株 (MS

Tsao 先生より供与)を用いて実験を施行した。レトロウイルスを用いて HPDE に活性型 K-ras 発現ベクターを導入することにより、免疫不全マウス皮下において腫瘍を形成する細胞株 (HPDE-KRAS) を作製した。HPDE-KRAS は sphere 形成能もコントロール細胞に比べ有意に上昇した。しかし、膵癌幹細胞マーカーとして知られる ESA+CD44+CD24+分画は増加しなかった。現在、HPDE 細胞に、K-ras に加え p53 の変異活性型を導入してその性質を検討中である。次に、人工膵癌幹細胞作製のために、人工膵癌細胞に癌遺伝子とともに導入する遺伝子の候補で Warburg 効果に関与していることが知られる pyruvate kinase type M2 (PKM2) の膵癌細胞における役割についてまず検討した。PKM には PKM1 と PKM2 が存在し選択的スプライシングによって単一遺伝子 PKM より作られる。膵癌細胞株 (AsPC1, MIAPaCa2, Panc1, BxPC3) において、PKM の発現を real-time RT-PCR にて確認すると、検索した全ての細胞株で PKM1 と比べ PKM2 が優位に発現していた。ヒト膵癌組織より Microdissection にて抽出した癌細胞と正常膵管上皮で PKM2 の発現を比べると、癌部で有意に発現が亢進していた。AsPC1 と MIAPaCa2 に PKM2 の shRNA を導入し PKM2 発現抑制細胞を作製し、その機能を検討すると、PKM2 の発現抑制により、乳酸生成が低下しており、Warburg 効果も抑制されている可能性がみられた。また、PKM2 発現抑制細胞は、*in vitro* の細胞増殖能並びに免疫抑制マウスの皮下での細胞形成能が低下していた (図 1)。

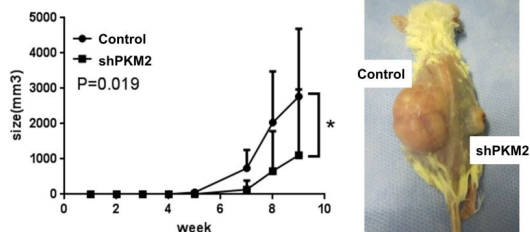


図 1. PKM2 発現抑制細胞の免疫不全マウス皮下生育。コントロール細胞と比べ、PKM2 の発現を shRNA 導入にて抑制した膵癌細胞では、免疫不全マウス皮下での生育が有意に抑制されている。

また、PKM2 の発現低下により sphere 形成能も抑制され、PKM2 はがん幹細胞特性にも重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの研究成果については投稿準備中である。

微小環境と癌幹細胞の関連を検討するために、膵特異的に K-ras 遺伝子の変異活性化タンパクを発現するマウスと、ニッチで強く発現し癌幹細胞の性質をコントロールしていると考えられている Periostin のノックアウトマウスを交配させ、Periostin=ニッチの膵癌化への関与を検討中である。さらに、膵癌の癌幹細胞性に関与する microRNA を探索している過程で、miR-483-3p が膵癌細胞に高発現することを発見した。

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 4 件)

- 1) Hamada S, Satoh K, Miura S, Hirota M, Kanno A, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Unno J, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T. MiR-197 induces epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by targeting p120 catenin. *J Cell Physiol.* 228:1255-63, 2013. doi: 10.1002/jcp.24280
- 2) Hamada S, Masamune A, Miura S, Satoh K, Shimosegawa T. MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX. *Cell Signal.* 26: 179-85, 2014. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.003.
- 3) Miura S, Hamada S, Masamune A, Satoh K, Shimosegawa T. CUB-domain containing protein 1 represses epithelial phenotype of pancreatic cancer cells. *Exp Cell Res.* 321: 209-18, 2014. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.12.019.
- 4) Abue M, Yokoyama M, Shibuya R, Tamai K, Yamaguchi K, Sato I, Tanaka N, Hamada S, Shimosegawa T, Sugamura K, Satoh K. Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer. *Int J Oncol.* 46 (2): 539-47, 2015. doi: 10.3892/ijo.2014.2743.

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 虻江誠、鈴木雅貴、塚本啓裕、濱田晋、下瀬川徹、佐藤賢一
血漿中マイクロ RNA 発現解析の膵癌診断に対する有用性の検討
第 45 回日本膵臓学会大会 2014 年 7 月 11-12 日 (小倉)
- 2) 横山 美沙、白木 健悠、田沼 延公、玉井 恵一、山口 壹範、田中 伸幸、菅村 和夫、佐藤 賢一
ピルビン酸キナーゼM2(PKM2)は膵癌で高発現し、細胞増殖能を亢進させる
第73回日本癌学会学術総会 2014年 9 月25-27日 (横浜)
- 3) M, Abue, M. Yokoyama, R. Shibuya, K. Tamai, I. Sato, N. Tanaka, K. Yamaguchi, S. Hamada, T. Shimosegawa, K. Sugamura, K. Satoh.

The Evaluation of Circulating
miR-483-3p and miR-21 in Plasma of
Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
Patients.

45th Anniversarry meeting of American
pancreatic association/Japanese
pancreatic society. 2014年11月5-8日
Big Island, Hawai.

- 4) M. Yokoyama ,R. Shibuya ,T. Shiroki ,
N. Tanuma ,K. Tamai ,K. Yamaguchi ,
N. Tanaka , K. Sugamura , K.
Satoh.Pyruvate Kinase Type M2
(PKM2) Is Selectively Expressed and
Involved in Survival and Development
in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
Cells.

45th Anniversarry meeting of American
pancreatic association/Japanese
pancreatic society. 2014年11月5-8日
Big Island, Hawai.

〔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

佐藤賢一 (KENNICHI, Satoh)

研究者番号：10282055