

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592020

研究課題名(和文) 組織幹細胞マーカーによる膵癌幹細胞の同定と周囲微少環境との相互作用の解明

研究課題名(英文) Identification of pancreatic cancer stem cells and its interaction with surrounding stroma

研究代表者

吉富 秀幸 (Yoshitomi, Hideyuki)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60375631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌における癌幹細胞と間質の関係を中心に検討した。膵癌細胞において、膵組織幹細胞マーカーであるsry-box 9(SOX9)の発現が強度の症例は予後不良であった。膵癌細胞株にてSox9の発現を低下させると抗癌剤感受性が増強し、Sox9は薬剤耐性に関与していた。癌幹細胞と間質の関連を検討するため、膵癌間質量を測定し、その中央値で症例を2群に分けると間質量が少ない症例は予後不良で、血行性転移の頻度が高かった。また、細胞外マトリックスのTenascin C(TNC)の発現も予後に関与しており、膵癌細胞の遊走能を誘導した。癌間質と癌幹細胞が密接に関わり、これを標的とした治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the relationship of cancer stem cells and stroma in pancreatic cancer. The high expression level of sry-box 9(SOX9), which is the marker of pancreatic progenitor cells, in cancer cell correlates with poor prognosis. Inhibition of SOX9 induced sensitivity against chemoreagent, suggesting its role in chemo-resistance. The low amount of stromal area in cancer tissue correlated with poor prognosis and high incidence of hematogenous metastasis. The expression of Tenascin C (TNC), which is known to have a role in maintenance of cancer stem cells, in cancer stroma was sound the stromal area which is adjacent to cancer cells. The positive expression of TNC correlated with poor prognosis. TNC induced pancreatic cancer cell movement and invasion, confirmed by in vitro analysis using pancreatic cancer cell line cultured on TNC coated plate. These results showed that the interaction between cancer stem cell and stroma plays important role in pancreatic cancer progression.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：癌幹細胞 癌間質 膵臓癌 組織幹細胞 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

膵癌は日本において癌死亡の第5位を占めており、その発生率も近年増加傾向にある。加えて、他癌腫に比較して極端に既存の治療法の成績が悪く、新規治療法の開発が急務である。

組織の初期発生や再生において、種々の細胞に分化できる能力を持つ幹細胞がその中心的役割を果たす。膵臓は原腸細胞の中で、pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1)、pancreatic specific transcription factor 1a (Ptf1a)や sry-box 9 (Sox9)といった転写因子を発現する細胞の一群から完成されていく。このような転写因子を発現する細胞は、正常組織でも認められ、組織幹細胞として組織の維持、修復、再生に関わっている。最近、Sox9発現細胞が膵の組織幹細胞として重要な役割を果たしていることが報告された (Furuyama et al. Nat Genet 2011;43:34)。一方、癌細胞の中にも、種々の細胞に分化できる多分化能を有し、自己複製能を有する細胞、すなわち癌幹細胞が存在し、癌の増殖、進展において中心的役割を果たしていることが注目されている。膵臓癌でも膵癌幹細胞と考えられる一群の細胞が存在することが、近年、相次いで報告された。しかし、これまで癌幹細胞のマーカーとしては、CD133、CD44といった組織非特異的な幹細胞表面マーカーが汎用されているが、これらのマーカーが各種の癌でどのような働きをしているのかは明らかでない。

組織中の幹細胞は niche と呼ばれる周囲の間質細胞が作る特殊な微小環境中に存在し、その中に存在する血管内皮細胞やマトリックスからのシグナルにより、増殖、分化が精密に制御されている。近年、癌幹細胞もこのような特殊な微小環境(niche)の中に存在する可能性も報告されつつあり、周囲の血管内皮細胞、線維芽細胞、Tenascin C等の細胞外マトリックスとの相互作用が幹細胞としての機能を維持する事に重要である。すなわち、癌組織における微小環境からの作用、および、組織幹細胞、前駆細胞との共通の分子機構に注目した研究は、癌幹細胞を維持する機構を解明し、そして、癌幹細胞をターゲットとした新しいコンセプトの治療法の開発に大いに貢献する。

2. 研究の目的

このような背景から、膵癌における癌幹細胞が膵組織幹細胞の性質を継承している可能性があり、このような癌幹細胞がきわめて悪性度の高い膵癌の生物学的特徴を引き起こしていると考えられる。加えて、このような形質は周囲間質環境からの刺激により維持されていると考えられる(図2)。本研究では、このような仮説のもと、組織幹細胞の維持に必要な因子(Sox9, Ptf1a, Pdx1等)が癌細胞にも発現していないかどうかを、外科切除標本を使用した免疫染色法やRT-PCR法により検討し、組織幹細胞と癌幹細胞の関連を解明する。このような因子が、癌幹細胞上でどのような役割を担っているかを、膵癌細胞株を使った

in vitro の実験系において、発現阻害実験など

を行うことで解明する。また、癌幹細胞を取り巻く周囲微小環境を、血管内皮細胞や CAFs などの細胞をそのマーカーを利用して、加えて、tenascin C や vimentin などの細胞外マトリックスの発現を、免疫染色法を中心とした方法で解剖学的に検討する。また、癌幹細胞と血管内皮細胞や周囲の間質細胞、細胞外マトリックスとの相互作用を、細胞株を利用した in vitro 実験を通して明らかにしていく。最終的には、癌幹細胞がその機能を維持していく分子機構を阻害、もしくは抑制することにより、癌幹細胞自体を標的とした新しい治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 膵癌における Sox9 の発現とその意義

千葉大学医学部附属病院にて 2006-2011年に切除術を行った浸潤性膵管癌症例106例の切除標本を用い、Sox9の発現を免疫組織染色法により検討した。その発現が癌細胞の25%以上に認められるものを高発現群、それ以外を低発現群とし、各症例における臨床病理学的因子を比較、また、その予後 Kaplan-Meier 法を用いて比較した。

癌細胞における Sox9 発現の意義を検討する目的で、Sox9 を高発現する膵癌細胞株である PANC1 細胞を用い、その機能解析を行った。siRNA により Sox9 発現を低下させることで幹細胞としての機能、特に抗癌剤耐性への影響を中心に検討した。

(2) 膵癌間質量と臨床病理学的因子との関連

膵癌間質量を測定するため、上記の116例より、標本が利用できなかった2例を除いた104例の切除標本を用い、二重免疫染色法で同一切片を癌細胞マーカーである Cytokeratin 19 (CK19)と血管内皮細胞マーカーである CD31 を染色した。癌辺縁に近い組織を用い検討した。50倍視野にて CK19 にて染色された癌細胞およびその中心の腺管構造部分を除いた面積を測定し、3視野での平均値を間質面積とした。また、200倍視野での CD31 陽性脈管構造を計測し、Micro vessel density (MVD)と設定した。これらの値と臨床病理学的因子、および予後との関連を検討した。

(3) Tenascin C の膵癌間質における発現とその役割

上記の106例の症例における Tenascin C (TNC)の発現を免疫染色法により検討した。その発現がある症例と無い症例に分け、臨床病理学的因子との関連を検討した。また、膵癌細胞株を用い、TNC をコートしたシャーレ上とそうで無いシャーレ上で細胞を培養し、その移動距離を time lapse image を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 膵癌における Sox9 の発現とその意義

Sox9 における正常膵組織および癌細胞の

発現を免疫組織染色法で検討した。正常組織には一部の膵管細胞、および、Acinar cell の特に傍中心細胞での発現を認めた。癌組織ではその発現は症例によりまちまちで有り、前述の様な基準に従い区分すると、全 106 例のうち、Sox9 高発現群は 52 例、低発現群は 54 例であった。他の臨床病理学的因子との関連を検討したが、分化度、ステージ、リンパ節転移の有無など、検討した項目すべてで Sox9 発現と関連を認めなかった。その予後を解析すると低発現群は高発現群に比し、全生存期

間で有意に延長を認めた(p=0.01)。また、全生存期間へ関与する因子を同定する目的で多変量解析を施行したところ、分化度、遠隔転移の有無、動脈浸潤の有無、癌局所医残度、術後補助療法の有無とならび、Sox9 発現も独立した予後規定因子であった。

以上から、Sox9 は膵癌においてその進展を促進する機能があると考えられた。そこで、特に幹細胞の機能にどのように関わるかについて検討した。まず、抗癌剤耐性に関わっているかどうかにつき検討した。膵癌細胞株での Sox9 の発現を検討したところ、PANC1 細胞では高発現、BxPC3 細胞では低発現をしていることが、Western blot 法で確認された。そこで、これら 2 種の細胞株の薬剤の感受性を検討した。塩酸ゲムシタピン、および 5-FU で細胞を処理し、72 時間後の細胞数を比較すると、両薬剤共に PANC1 では細胞増殖に対する影響は認められなかったが、BxPC3 では細胞数が両者共に著明に減少した。これらの細胞間の違いは Sox9 の発現量によるもの可能性を考えた。これを検討するため、siRNA を用いることで Sox9 高発現膵癌細胞株である PANC1 細胞での Sox9 発現抑制により、薬剤感受性がどのように変化するかを検討した。まず、siRNA にて Sox9 発現が低下することを確認した。通常の培養液における変化では、Sox9 siRNA 処理による細胞増殖に対する影響は認めなかった。一方、培養液中に塩酸ゲムシタピン 100ng/ml を添加した際の 72 時間後の細胞数を検討すると、negative control siRNA で処理した細胞と比較し、

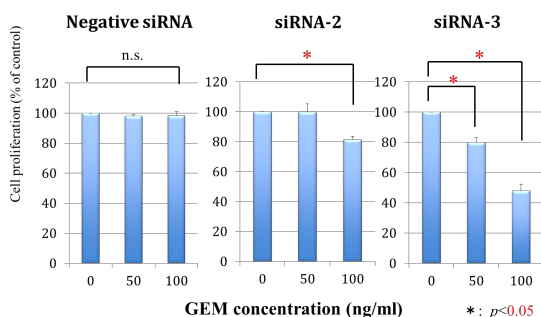


図 1 : PANC1 細胞における塩酸ゲムシタピン(GEM)投与後 72 時間での細胞数の変化

50-80%の細胞数となり、塩酸ゲムシタピンによる殺細胞効果が増強された。このことは

Sox9 が塩酸ゲムシタピンに対する耐性を引き起こしていると考えられた(図1)。

現在、その他の幹細胞としての機能、特に Sphere 形成能や他の幹細胞マーカー(CD44 等)の発現に Sox9 発現の抑制がどのような影響を与えるか、検討を行っている。

(2)膵癌間質量と臨床病理学的因子との関連

幹細胞は niche と呼ばれる特殊な微少環境下に存在し、この niche に含まれる間質成分が幹細胞の機能を維持しているとされる。癌幹細胞においてもこのような機構の存在が予想される。すなわち、癌における間質は癌の表現型の維持に深く関わっていると思われる。そこで、癌の間質量がその悪性度にどのように関わっているか、また、癌悪性度を増加させるとされる MVD との関連はないかについて検討した。

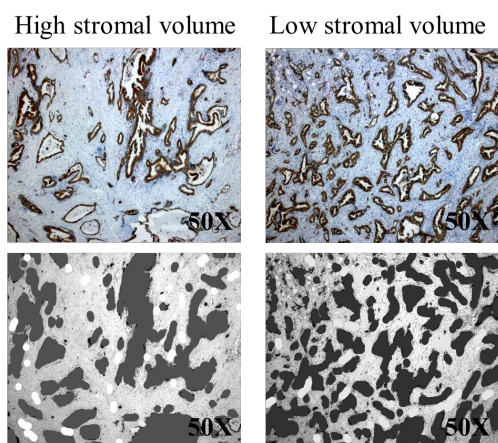


図 2 : 膵癌組織での CK19, CD31 重染色 (上段) と間質量測定 : CK19 染色領域およびそれに囲まれる腺管領域(黒)を除外した面積を測定

図 2 に示すように癌細胞を CK19 で判別し、それを除いた間質の面積を析出、中央値で間質量の多い群と少ない群に各群 52 例ずつに 2 分した。

予後について検討すると、図 3 に示すように、間質量が多い症例は少ない症例に比較し、無再発生存期間、全生存期間共に有意に予後良好であった。特に間質量が多い症例では 5 年生存率が約 40%と極めて良好な結果であった。また、この間質量の多寡と他の臨床病理学的因子との間の関連を検討したところ、分化度が相関しており、間質量が少ない症例は有意に低分化腺癌が多かった。

MVD と間質量の関係を検討すると、両者は負の相関を示した。また、再発頻度、形式との関連では間質量が少ない症例では有意に再発が多く、また、その形式では血行性転移(肝、肺等)が多いという傾向であった。このことから、間質量が多いことは癌の悪性度とは直接結びついておらず、逆に癌細胞の転移を抑制するバリアーのような役割がある物と推察された。

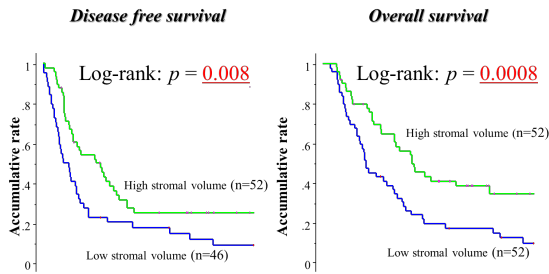


図3：間質量の多寡による術後無再発生存期間および全生存期間の相違

(3)癌間質細胞外マトリックス Tenascin C の役割

このような結果から、間質の構成因子に踏み込んだ検討が必要と考え、特に細胞外マトリックスに注目した。Tenascin C (TNC)はグリオーマで発見された細胞外マトリックスの1つで、乳癌では転移巣のごく初期の形成に関与し、癌幹細胞の機能維持に関わっている可能性が示唆されている。そこで、その発現を膵癌切除標本において検討した。

免疫染色において、TNCは正常膵組織にはその発現を認めなかった。癌組織における検討では、癌細胞による腺管構造の極近い部位にTNCの染色を認めた。その染色の有無により症例を2分するとTNC陽性例は59例、陰性例は47例とほぼ二分された。その予後を検討すると、TNC陽性例は有意に陰性例に比較し、全生存期間が短かった。

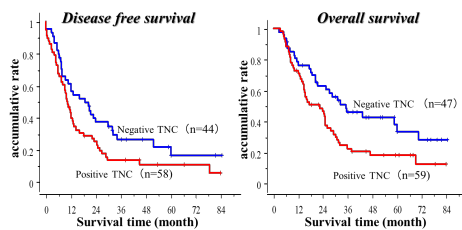


図4：TNC発現の有無による無再発生存期間、全生存期間の相違

TNC発現を認める膵癌症例の予後が不良であったことは、このマトリックスが癌細胞に何らかの作用をしていることが考えられた。また、TNCの発現が膵癌細胞の腺管構造のすぐ脇に認められたことも、その可能性を示唆していた。そこで、膵癌細胞株を用い、TNCが癌細胞に対してどのような作用を持つかを検討するため、膵癌細胞株をTNCでコートしたシャーレで培養したときと、コートしていないシャーレで培養した際の細胞の運動に注目した。すると、TNCコートシャーレで培養した場合は有意にその遊走能が亢進していた。また、細胞invasion assayとして、2重チャンバーを使い、マトリゲルを通過した細胞数を測定すると、マトリゲルにTNCを混入した場合は混入させなかった場合に比較してinvasionをきたす細胞数が増加した。

以上のことから、TNCは癌細胞の浸潤、遊走能を増加させることにより膵癌細胞の悪性を増強する物と考えられた。

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 7件)

Akiyama T, Shida T, Yoshitomi H, Ohtsuka M, Miyazaki M et al. Expression of SOX2 and Pdx1 in pancreatic neuroendocrine tumors. Pancreas (in press) 査読有

Yoshitomi H, Kato A, Shimizu H, Ohtsuka M, Suzuki D, Miyazaki M et al. Tips and tricks of surgical technique for pancreatic cancer: portal vein resection and reconstruction (with video). J Hepatobiliary Pancreat Sci 2014;21:E69-74 査読有

Aida T, Furukawa K, Suzuki D, Ohtsuka M, Yoshitomi H, Miyazaki M et al. Preoperative immunonutrition decreases postoperative complications by modulating prostaglandin E2 production and T-cell differentiation in patients undergoing pancreatoduodenectomy. Surgery 2014;155:124-133 査読有

Miyazaki M, Yoshitomi H, Shimizu H, Ohtsuka M, Suzuki D, Nakajima M et al. Repeat pancreatectomy for pancreatic ductal cancer recurrence in the remnant pancreas after initial pancreatectomy: Is it worthwhile? Surgery 2014;155:58-66 査読有

Kato A, Shimizu H, Ohtsuka M, Yoshitomi H, Miyazaki M et al. Surgical resection after downsizing chemotherapy for initially unresectable locally advanced biliary tract cancer: a retrospective single-center study. Ann Surg Oncol 2013;20:318-324 査読有

Kagawa S, Yoshitomi H, Ohtsuka M, Miyazaki M et al. Akt/mTOR signaling pathway is crucial for gemcitabine resistance induced by Annexin II in pancreatic cancer cells. J Surg Res 2012;178:758-767 査読有

Sakai N, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M et al. CXCR4/CXCL12 expression profile is associated with tumor microenvironment and clinical outcome of liver metastases of colorectal cancer. Clin Exp Metastasis 2012;29:101-110 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

秋山貴洋、吉富秀幸、大塚将之、宮崎勝
他 膵癌神経内分泌腫瘍における Pdx1
の発現による予後予測の可能性 第 69
回日本消化器外科学会総会 2014/7/18
ホテルハマツ (福島県・福島市)

秋山貴洋、吉富秀幸、大塚将之、鈴木大
亮、中島正之、宮崎勝 他 膵神経内分
泌腫瘍における臓器発生に関わる転写
因子の発現の検討 第 45 回日本膵臓学
会大会 2014/7/12 北九州国際会議場
(福岡県・北九州市)

Yoshitomi H, Ohtsuka M, Miyazaki M
et al. Tenascin C in cancer stroma
induces migration and invasion of
pancreatic cancer cells by interaction
with fibronectin. Digestive Disease
Week 2014 (2014/5/4 McCormick Place,
Chicago, IL, USA)

秋山貴洋、吉富秀幸、大塚将之、鈴木大
亮、中島正之、宮崎勝 他 膵神経内分
泌腫瘍における Pdx1 および Sox2 発現
の検討 第 114 回日本外科学会定期学
術集会 2014/4/4 京都国際会議場(京
都府・京都市)

西田孝宏、吉富秀幸、大塚将之、鈴木大
亮、中島正之、宮崎勝 他 膵癌におけ
る間質量の多寡と血管密度と予後との
検討 第 114 回日本外科学会定期学術
集会 2014/4/3 京都国際会議場(京
都府・京都市)

中田泰幸、吉富秀幸、大塚将之、鈴木大
亮、中島正之、宮崎勝 他 膵組織幹細
胞特異的な転写因子である Sox9 の膵癌
細胞における発現の検討 2013/7/25
仙台国際センター(宮城県・仙台市)

秋山貴洋、吉富秀幸、大塚将之、吉留博
之、宮崎勝 他 膵神経内分泌腫瘍にお
ける Pdx1 の発現による予後予測の可能
性 第 68 回日本消化器外科学会総会
2013/7/19 サンホテルフェニックス
(宮城県・宮崎市)

中田泰幸、吉富秀幸、吉留博之、大塚将
之、鈴木大亮、中島正之、宮崎勝 他 膵
癌組織での細胞外マトリックス発現の
検討 第 68 回日本消化器外科学会総会
2013/7/17 サンホテルフェニックス
(宮城県・宮崎市)

Yoshitomi H, Ohtsuka M, Suzuki D,
Nakajima M, Miyazaki M et al. A
randomized phase II trial of adjuvant
chemotherapy with S-1 versus S-1 and
gemcitabine (GS) versus gemcitabine
alone (GEM) in patients with resected
pancreatic cancer (CAP-002 study).
2013 Annual meeting of American
Society of Clinical Oncology (2013/6/3
McCormick Place, Chicago, IL, USA)

中村祐介、吉富秀幸、吉留博之、大塚将
之、鈴木大亮、中島正之、宮崎勝 他 膵
癌における FGF10/FGFR2 シグナル伝
達経路を介した間質組織による癌細胞
浸潤・遊走能誘導の分子機構の解明 第
113 回日本外科学会定期学術集会
2013/4/11 マリンメッセ福岡 (福岡
県・福岡市)

中田泰幸、吉富秀幸、吉留博之、大塚将
之、鈴木大亮、中島正之、宮崎勝 他 膵
組織幹細胞特異的な転写因子 Sox9 の膵
癌組織における発現の検討 第 113 回
日本外科学会定期学術集会 2013/4/11
マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)

Yoshitomi H, Yoshidome H, Ohtsuka
M, Miyazaki M et al. Combination of
preoperative gemcitabine/S-1
chemotherapy and aggressive surgical
resection for borderline or initially
unresectable locally advanced
pancreatic cancer. 32nd Congress of the
European Society of Surgical Oncology
2012/9/20 Valencia Congress Centre
(Valencia, Spain)

中田泰幸、吉富秀幸、吉留博之、大塚将
之、鈴木大亮、中島正之、宮崎勝 他
膵組織幹細胞特異的な転写因子 Sox9 の
膵癌組織における発現の検討
2012/4/14 第 112 回日本外科学会定期学
術集会 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

〔図書〕(計 0 件)

該当無し

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

ホームページ等：該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉富 秀幸 (YOSHITOMI, Hideyuki)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60375631

(2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI, Masaru)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70166156

吉留 博之 (YOSHIDOME, Hiroyuki)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10312935

大塚 将之 (OHTSUKA, Masayuki)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90334185

鈴木 大亮 (SUZAKI, Daisuke)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号： 9042229

中島 正之 (NAKAJIMA, Masayuki)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号： 80466705

(3)連携研究者
なし