

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592025

研究課題名(和文) ヒト膵癌幹細胞と微小環境の相互作用機構の解明に関する研究

研究課題名(英文) Reconstitution of microenvironment surrounding pancreatic cancer

研究代表者

堀 裕一 (HORI, YUICHI)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：80248004

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)：治療法の進歩にも関わらず、膵臓がんは依然として予後が見込めない「21世紀に残された難治性腫瘍」である。本研究では既存の抗がん剤耐性を示した進行膵癌患者から新たに癌幹細胞株を樹立するという新規性・独創性の高い研究をおこなった。その結果、腫瘍とその周囲の微小環境を構築する間質細胞との相互作用により、腫瘍の増殖や形態維持が制御されていることが明らかになった。癌幹細胞を標的とする新たな分子標的薬につながる重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is an aggressive malignancy with a dismal prognosis. Pancreatic cancer is also highly resistant to systemic chemotherapy. In this study, we established a novel human pancreatic tumor-initiating cell lines by use of in vitro co-culture with mouse stromal cells. These cell lines required its direct interaction with stromal cells for its in vitro clonogenic growth and maintenance. We found that extracellular matrix, Laminin, possibly involved in this phenomenon. Also, Notch inhibitors inhibited tumor growth in vivo and colony formation in vitro. Next, siRNA inhibition of Notch pathway in stromal cells also inhibited cancer cell growth and colony formation and laminin gene expression in cancer cells. These results indicate that Notch inhibitor might be effect on not only cancer cells itself, but stromal cells to inhibit tumor growth.

研究分野：膵臓がん

キーワード：膵臓がん がん幹細胞 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は癌死亡率の第5位にあり、発見時には多くの症例ですでに遠隔転移や癌性腹膜炎を伴っている。遠隔転移や癌性腹膜炎を伴った膵癌患者には Gemcitabine や TS-1 を用いた抗がん剤治療が行われるが、5年生存率は0%である。また根治手術を行った場合でも5年生存率は20%には及ばない。外科的治療、化学療法、放射線療法による集学的治療の進歩にも関わらず死亡率や死亡数は依然増加傾向にあり、「21世紀に残された難治性癌」と呼ばれる。最近、癌組織にも幹細胞の存在が報告されており、様々な癌組織の幹細胞が同定されつつあり、癌幹細胞を標的とした新たな治療法開発が注視されている。われわれはこれまでに幹細胞マーカーCD133を指標にして正常の組織幹細胞を同定した^[1]。また、悪性度の高いヒト膵管状腺癌がその先進浸潤部で幹細胞マーカー(CD133)を発現することを明らかにした^[2]。一方、我々は Gemcitabine や TS-1 に耐性をもつ進行膵癌患者から CD133 陽性膵癌幹細胞株を樹立する実験系の開発に成功している。今回、抗がん剤治療耐性膵癌患者より樹立した膵癌幹細胞を用いてニッチと考えられる間質細胞との相互作用に着目した培養系を確立し、癌幹細胞の

解明することで膵癌幹細胞を標的とした新規治療薬の開発を行う。

[1] Hori Y, Fukumoto M, Kuroda Y. Enrichment of putative pancreatic progenitor cells from mice by sorting for prominin1 (CD133) and PDGFR α . *Stem Cells*. 26: 2912-2920, 2008.

[2] Shimizu K, Itoh T, Shimizu M, Ku Y, Hori Y. CD133 expression pattern distinguishes intraductal papillary mucinous neoplasms from ductal adenocarcinomas of the pancreas. *Pancreas* 38: e307-e214, 2009.

2. 研究の目的

本研究では、Gemcitabine や TS-1 に耐性をもつ進行膵癌患者から樹立した CD133 陽性膵癌幹細胞株を用いて膵癌に特徴的な間質反応を再構築し、癌幹細胞を標的とする新規治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株とマウス feeder 細胞との細胞接着機構の解明
予備実験の結果、樹立した CD133 陽性膵癌幹細胞株の維持にはある種の feeder 細胞の存在が必要であった。また、Notch 阻害剤がこの細胞株の増殖を抑制することを明らかにしている。本実験では、Notch 経路が腫瘍だけでなく、feeder 細胞(間質細胞)を介して腫瘍増殖を調節しているという仮説をたてて検証した。

(2) Notch signal と細胞外基質との関係から

増殖に関与する分子を in vitro や in vivo で解析する。

(3) ヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株で Gemcitabine 投与により発現調節をうける因子の同定
樹立した細胞を Gemcitabine で処理したあと、発現が増強あるいは抑制される遺伝子の解析を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株とマウス feeder 細胞の結果、マウス feeder 細胞でも Notch signal の活性化がおこっていることを明らかにした。さらに、この経路をマウス特異的 siRNA で阻害した feeder 細胞を用いるとヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株の増殖抑制が起こることを示した(図1)。この結果から、Notch signal は腫瘍そのものの増殖を調節するだけでなく、周辺の feeder 細胞を介しても腫瘍増殖を調節することを明らかにした。

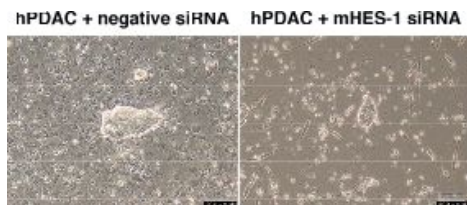


図1

(2) ヒト CD133 陽性膵癌幹細胞株は増殖維持にはマウス feeder 細胞を必要とするが、共培養の結果、マウスのコラーゲンやラミニン遺伝子が亢進することを明らかにした。そこで、ラミニンをコートした dish で培養するとヒト膵癌幹細胞株は接着し、増殖することが判明した。Notch pathway を siRNA で阻害した feeder 細胞を用いるとマウスラミニン遺伝子の発現が抑制されたことから、feeder 細胞の Notch pathway は laminin 遺伝子の発現を介してヒト膵癌細胞株の増殖を調節していると考えられた(図2)。この結果は、ヒト膵癌幹細胞株を in vivo でマウスに移植し形成した腫瘍に、Notch 阻害剤を投与した際に、マウス laminin 遺伝子産物の発現が免疫染色の結果、低下したことから確認された。

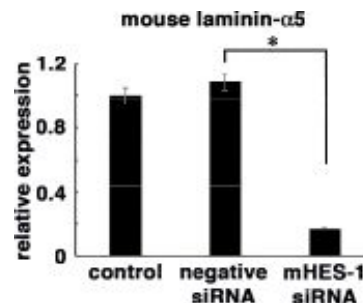


図2

- (3) Gemcitabine を投与したヒト膵癌幹細胞株をコントロール群と比較して、マイクロアレイによる網羅的な解析結果から、癌細胞にいくつかの細胞外基質や新しい癌遺伝子の発現亢進を認めた。また、RT-PCR の結果からも発現亢進が確認された。現在、詳細な検討をおこない、新規治療の標的となりうるかを解析中である。

本研究では既存の抗がん剤抵抗性膵癌患者由来の細胞株を樹立することに成功し、これを報告した(Shimizu et al. 2013)。また、粘液産生胆管がんからも同様の腫瘍を樹立した(Murakami et al. 2014)。樹立したヒト膵癌幹細胞株は増殖維持のために、feeder 細胞を必要とするが、feeder 細胞の代わりに基底膜様の laminin-rich な人工基底膜や laminin-coated dish を使えば、培養可能であることが明らかになった。Notch 阻害剤は明らかなコロニー形成能や腫瘍形成能の抑制を認めたことから、そのメカニズムを解析したところ、feeder 細胞の Notch pathway を siRNA で阻害すると明らかな腫瘍抑制と laminin 発現抑制を認めたことから、マウスの Notch-laminin 系が初代ヒト膵癌幹細胞株の増殖に関わっていることが示唆されると共に分子標的薬の候補となることが示された。今後のさらなる研究が期待される結果である。

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4件)

Murakami S, Ajiki T, Hori Y, Okazaki T, Fukumoto T, Ku Y. Establishment of a novel cell line from intraductal papillary neoplasm of the bile duct. *Anticancer Res.* 査読有、Vol.34, 2203-2210, 2014.

Shimizu K, Chiba S, Hori Y. Identification of a novel subpopulation of tumor-initiating cells from gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *PLoS ONE*, 査読有、Vol.8, e81283, 2013.

DOI:10.1371/journal.pone.0081283
Hori Y.

Prominin-1 (CD133) reveals new faces of pancreatic progenitor cells and cancer stem cells: Current knowledge and therapeutic perspectives. *Adv Exp Med Biol.* 査読有、Vol.777, 185-196, 2013.

DOI:10.1007/978-1-4614-5894-4_12.

Ohtsubo I, Ajiki T, Hori Y, Murakami S, Shimizu K, Fukumoto T, Ku Y. Distinct expression of CD133 between intraductal papillary neoplasms of the bile duct and bile duct adenocarcinomas. *Hepatol Res.* 査読有、Vol.42, 574-582, 2012.

DOI:10.1111/j.1872_034X.2011.00954.x

[学会発表](計8件)

平井里奈、山崎千寛、堀裕一 抗がん剤耐性膵癌細胞の樹立とその解析、第45回日本膵臓学会、2014年7月11日、小倉

三浦拓馬、西山嵩晃、堀裕一 Possible involvement of Notch pathway of stromal cells in the maintenance of pancreatic cancer cells. 第73回日本癌学会、2014年9月26日、横浜

西山嵩晃、三浦拓馬、堀裕一 Oncogene-mediated mouse pancreatic stem/progenitor cells produce pancreatic ductal adenocarcinoma phenotype in vivo. 第73回日本癌学会、2014年9月26日、横浜

堀裕一、清水一也 膵組織幹細胞を用いた再生医療研究、第44回日本膵臓学会、2013年7月25日、山形

藤原範人、堀裕一 Gemcitabine が初代膵癌細胞に及ぼす効果の検討、第45回日本臨床分子形態学会、2013年9月13日、福岡

Shimizu K, Hori Y. Direct interaction between human pancreatic cancer stem cells and stromal cells remodels extracellular matrix formation for cancer stem cell niche. 10th

International Society for Stem Cell Research, 2012年6月13日、横浜

Hori Y, Shimizu K. Direct interaction between pancreatic cancer stem cells and stromal cells remodels extracellular matrix formation for cancer stem cell niche. 103rd American Association for Cancer Research, 2012年4月1日、Chicago, USA

堀裕一、清水一也 膵癌の進展機構における組織幹細胞の関与、第43回日本膵臓学会、2012年6月28日、山形

[図書](計1件)

堀裕一、アークメディア、肝胆膵、2013、734(645-651)

[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

堀 裕一 (Hori, Yuichi)
神戸大学・保健学研究科・教授
研究者番号：80248004

(2) 研究分担者

清水 一也 (Shimizu, Kazuya)
神戸大学・保健学研究科・保健学研究者
研究者番号：50335353