

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592031

研究課題名(和文) 膵癌微小環境を構築する星細胞のphenotypingとその制御による新規治療開発

研究課題名(英文) Establishment of a novel therapeutic strategy for pancreatic cancer phenotyping and regulating the pancreatic stellate cells in the tumor microenvironment

研究代表者

上田 純二 (UEDA, Junji)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：90529801

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)：本研究の目的は、膵癌の微小環境における重要な因子である星細胞のphenotypingを行うことで、膵癌細胞との相互作用においてより重要な働きを担っている細胞群を同定し、それを制御することによって膵癌の新規治療法開発を目指すことである。CD271陽性の星細胞は腫瘍周辺で発現し、患者の予後と負の相関関係を示すことが分かった。また、CD146陽性の星細胞はPanINの周囲に多く存在し、患者の予後と負の相関がみられることが分かった。これらの結果から、星細胞は機能的に多様性をもった細胞集団で、特定の星細胞のみを標的とした治療が有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is classifying the pancreatic stellate cells that are the important factor in the tumor environment, and identifying the specific cell population which strongly enhances the tumor malignancy. CD271 positive pancreatic stellate cells were at the tumor periphery and correlated with patients' prognosis negatively. CD146 positive pancreatic stellate cells existed around the PanIN lesions and correlated with patients' prognosis negatively. These findings indicates that pancreatic stellate cells are the functionally heterogenous population and targeting the specific group of stellate cells could be the novel therapeutic strategy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 癌間質相互作用 星細胞

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。癌細胞のみ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。

膵星細胞には機能的に多様性をもった細胞集団であることが近年明らかとなってきた。当研究室からも CD10 陽性の膵星細胞が膵癌の浸潤能を有意に増強し、予後不良と関連することを明らかにした(Ikenaga 2010 Gastroenterology)。CD10 陽性膵星細胞のような膵癌細胞の悪性度を増強する特定の細胞集団を標的とした治療は有望な治療戦略となりうることを期待されるため、膵星細胞の機能的な phenotyping を更に行う必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌の微小環境における重要な因子である膵星細胞の phenotyping を行うことで、膵癌細胞との相互作用においてより重要な働きを担っている細胞群を同定し、それを制御することによって膵癌の新規治療法開発を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) 膵星細胞の表面抗原である CD271 に着目し、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。
 (2) 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。

4. 研究成果

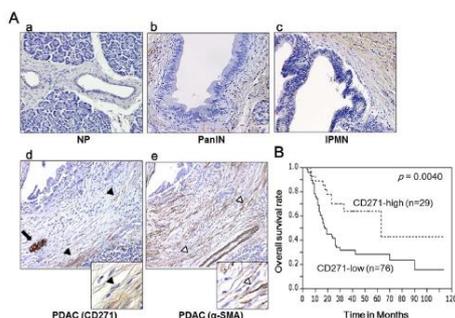


図 1 ヒト膵癌切除標本における CD271 の発現と予後との関連

CD271 は別名 Nerve Growth Factor Receptor として知られている。膵星細胞での発現を膵癌切除症例において解析すると、腫瘍辺縁で発現している傾向にあり、その発現強度は患者の予後と負の相関関係にあることが示された。このことから、膵星細胞における CD271 の発現は、膵癌の悪性度に何らかの関与をしていることが示唆された。

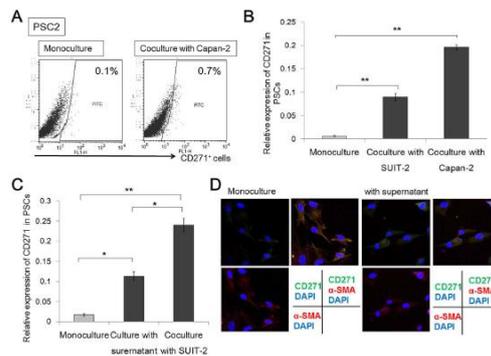


図 2 癌細胞との共培養による膵星細胞における CD271 の発現の変化

膵癌切除組織から初代培養して樹立した膵星細胞における CD271 の発現は 0.1% と低かったが、膵癌細胞との共培養によってその発現は増強され、何らかの分子生物学的意義があるものと考えられた。

Immunohistochemical analysis of CD146 in human pancreatic cancer

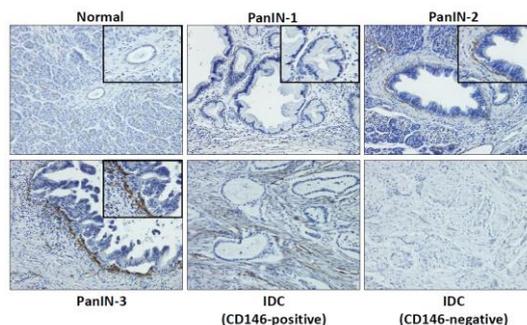


図 3 ヒト膵癌組織における CD146 の発現解析(免疫組織化学染色)

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。

CD146 expression in CAFs, HUVEC and cancer cells

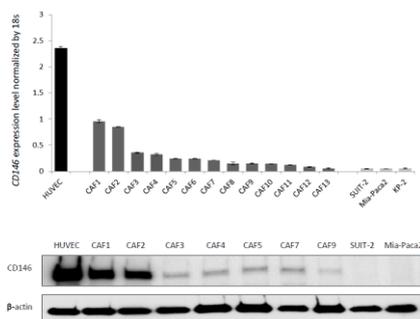
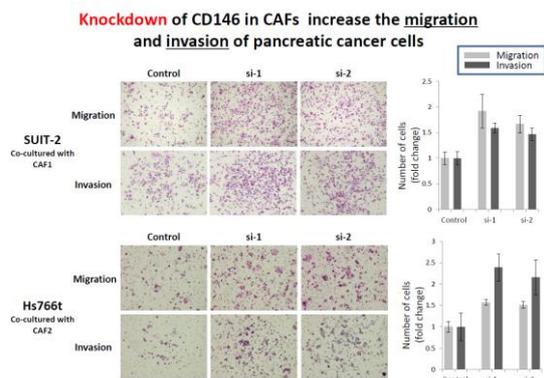


図 3 初代培養細胞における CD146 の発現解析



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。

図 4 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

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。

Pro-tumorigenic factors expression are increased when knockdown of CD146 in CAFs

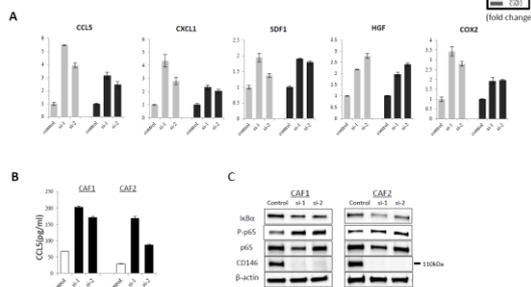


図 5 癌関連線維芽細胞における CD146 の発現抑制によるサイトカイン、ケモカインの産生の変化

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。

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 2 件）

1. Akagawa S, Ohuchida K, Torada N, Eguchi D, Kozono S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M. Comparisons of Characteristics of Peritoneal Fibroblasts in Dissemination with those of Mesothelial Cells and Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Cancer, Ammerican Pancreatic Association 44th Annual Meeting, 2013.10.31. Miami, FL, USA.
2. 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

上田 純二 (UEDA Junji)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：90529801

(2) 研究分担者

田中 雅夫 (TANAKA Masao)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：30163570

永井 英司 (NAGAI Eishi)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：30264021

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

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

(3) 連携研究者

なし