

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592042

研究課題名(和文) *in vitro*膵発癌モデルの確立と発癌メカニズムの解明研究課題名(英文) Elucidation of the establishment and carcinogenesis mechanism of *in vitro* pancreatic cancer model

研究代表者

宮本 好晴 (Miyamoto, Yoshiharu)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20368096

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)：本研究代表が独自に開発した、*acinar-to-ductal transdifferentiation*を誘導するという実験系で、*siRNA*を用いた*knockdown*モデルが*neoplasm*としての形質を証明する研究であったが、形質の獲得を確認することが出来ず方向転換し、癌幹細胞の抗がん剤耐性獲得の機序、癌細胞への分化機序に焦点を当てた。ヒト膵癌細胞株を用いて癌幹細胞の表面抗原(CD44, CD24など)の発現を確認した。発現確認後、3次元培養を行い免疫不全マウスに投与したが、移植された癌幹細胞は増殖するに至らなかった。今後、条件を変えることにより安定した増殖が確認できるように展開していく。

研究成果の概要(英文)：The present study's representative is independently developed, in the experimental system that induces the *acinar-to-ductal transdifferentiation*, but *knockdown* model using *siRNA* was a study to demonstrate the trait as a *neoplasm*, to confirm the acquisition of the trait it is diverted not been able to, the mechanism of anti-cancer agents acquired resistance of cancer stem cells, focused on the differentiation mechanism of the cancer cells. To confirm the expression of surface antigens of cancer stem cells (CD44, such as CD24) using a human pancreatic cancer cell line. After the confirmation of the expression, but was administered to immunodeficient mice for 3-dimensional culture, cancer stem cells that have been transplanted did not lead to growth. In the future, stable growth by changing the conditions continue to expand to allow confirmation.

研究分野：膵臓外科

キーワード：*siRNA* 癌幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は日本人の悪性新生物による死亡の第5位を占め、毎年2万人もの方が命を落としている。非常に予後の悪いことは周知の事実である。外科的治療、放射線療法、化学療法などを組み合わせた就学的治療が行われているにもかかわらず根治には程遠いのが現状である。

### 2. 研究の目的

マウス腺房細胞を分離し、3次元培養を行い TGF $\alpha$  を投与することにより acinar-to-ductal transdifferentiation を誘導する実験系で、siRNA を用いた knockdown モデルが neoplasm としての形質を示すことによって、発癌メカニズムや情報伝達機構を詳細に解明することである。

### 3. 研究の方法

1. マウス腺房細胞の分離と3次元培養を行う。
2. Day0, 1, 3, 5, 7, 14 の ductal cell を抽出する。
3. Neoplasm 獲得の有無を Western blot もしくは PCR で Cyclin D1 の発現増強で確認。同時にテロメラーゼ活性も測定。
4. siRNA による標的 mRNA の knockdown モデルを作製。
5. Neoplasm を獲得した場合、阻害剤を用いた増殖抑制実験を行う。

### 4. 研究成果

Neoplasm 獲得の有無を確認する実験において、Cyclin D1 の発現が確認できず、ここで実験を癌幹細胞に移行した。

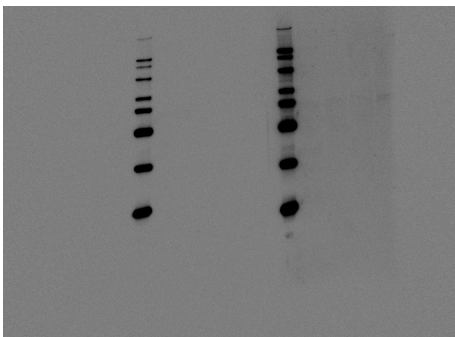
PAN01、MiaPaca、AsPC1、などの6種類のヒト膵癌細胞株を用いた実験で、まずは2次元培養を行い、癌幹細胞の特徴とされる Sphere の確認を行った。

しかし、Sphere は確認されず。

癌幹細胞がどの程度存在するのかを、癌幹細胞マーカー (CD24, CD44, CD133, EpCAM1, ALDH1, CxCR4) を指標に Western blot を行った。

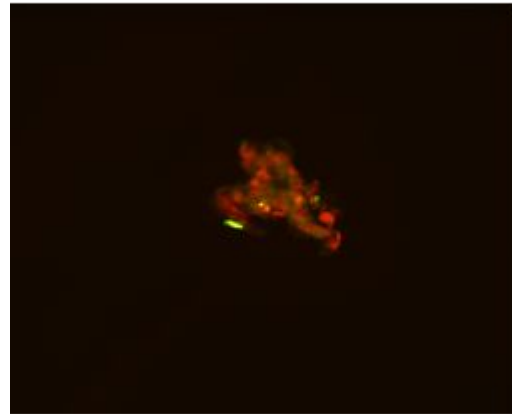
この実験系ではすべての細胞株の2次元培養を行った細胞株において、Western blot にてバンドの出現が認められなかった。

Figure は左 CD44、右 CD133

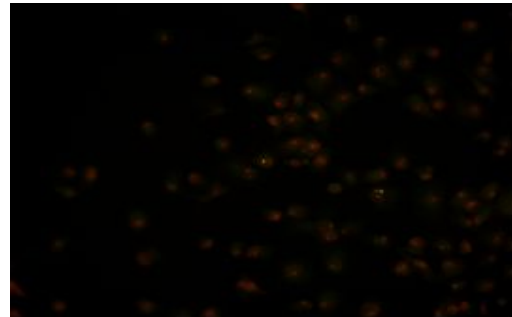


次いで、免疫染色にて癌幹細胞マーカーの発現を確認できるか否かの実験を行った。まずは2次元培養での結果を示す。

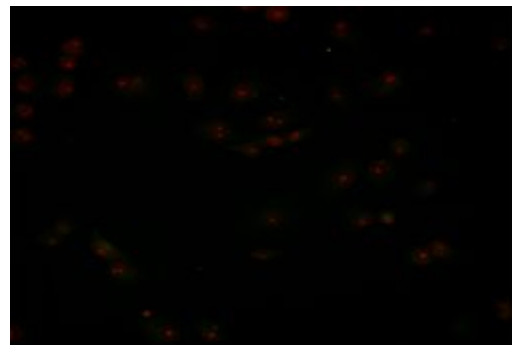
CD133



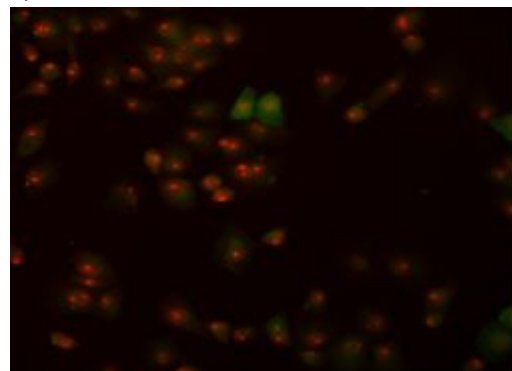
CD24



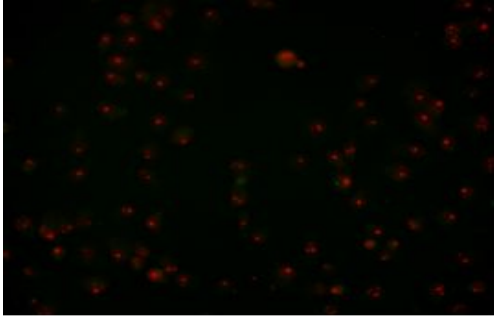
CD44



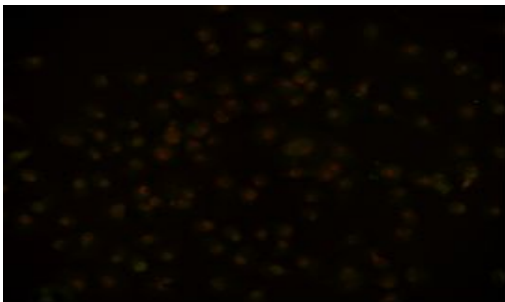
EpCAM1



ALDH1

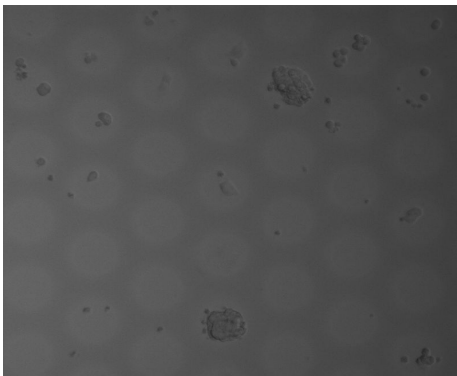


CXCR4

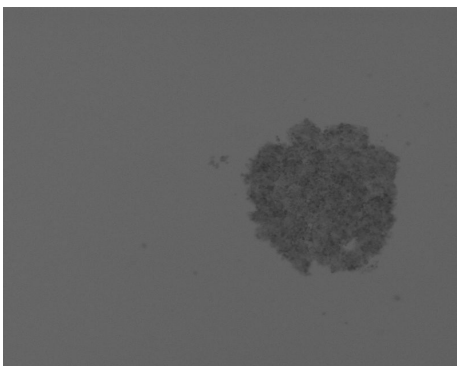


2次元培養での研究では積極的に癌幹細胞の存在を考えられなかったため、これら陰性結果を踏まえ、3次元培養にて Sphere の確認を行った。

Figure は PANC01 細胞で、Cellable3 次培養容器を用いて培養後 Day 1。Sphere を確認できる。



同じく Prime surface での 3次元培養



Sphere の確認が出来たので、2次元培養した細胞株で実験した同様の実験を行うこととした。

PAN01、MiaPaca を 3次元培養し、得られた細胞で免疫染色を行ったが、陽性細胞は認められなかった。

また、免疫不全マウスに 3次元培養で得られた細胞を移植するも、生着しなかった。

今後は Western blot や免疫染色などで癌幹細胞の存在を確実にし、それらを免疫不全マウスに生着させる手法を確立させ、今後の癌治療の基礎を築きたいと考えている。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
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

宮本 好晴(MIYAMOTO, Yoshiharu)  
大阪医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：20368096

##### (2) 研究分担者

内山 和久(UCHIYAMA, Kazuhisa)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80232867

林 道廣(HAYASHI, Michihiro)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号： 90314179

田中 覚(TANAKA, Satoru)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号： 50595741

(3)連携研究者