

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791430

研究課題名(和文) 分子生物学的解析に基づく膵癌間質制御の新展開

研究課題名(英文) New development of pancreatic cancer stromal control based on the molecular analysis

研究代表者

藤田 逸人 (FUJITA, Hayato)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：40611281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：膵星細胞の解析でCD90陽性線維芽細胞が93%以上認められ、これらが間質の線維増生を制御する鍵となる表面マーカーである可能性が考えられた。膵癌細胞の解析でCD105陽性の膵癌細胞は上皮間葉移行に特徴的な遺伝子発現変化が認められ、またそれらの遊走能は膵星細胞によって強く増強されることが分かった。次にCD166に着目したところ、CD166陰性膵癌細胞がCD166陽性細胞と比較して強い遊走能、浸潤能を示すことが分かった。抗線維化薬のPirfenidoneは、膵星細胞が主体となっている膵癌間質の線維増生を抑制することが示され、間質の制御が膵癌の進行を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：CD90-positive fibroblasts were observed in 93% or more in the analysis of pancreatic stellate cells and this CD90 could be the key surface marker to regulate desmoplasia. In the analysis of pancreatic cancer cells, CD105-positive pancreatic cancer cells showed the specific gene expression of epithelial-mesenchymal transition and these mobility were enhanced by pancreatic stellate cells. In the case of CD166, CD166-negative pancreatic cancer cells showed strong mobility and invasiveness compared with CD166-positive cells. Furthermore, the anti-fibrotic drug "Pirfenidone" inhibited pancreatic cancer desmoplasia mainly contributed by pancreatic stellate cells and it had been suggested that regulation of stroma could suppress progression for pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵癌 間葉系幹細胞 線維増生

1. 研究開始当初の背景

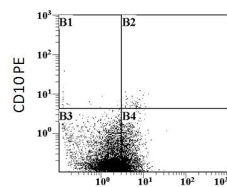
膵癌は我が国における癌死の5位を占め、現在でも100人中3人しか根治しない疾患であり、その治療法・診断法の開発は、社会的要請度・緊急性が高い。腫瘍性病変が多様な細胞からなる集団であることは当然認識されていながら、従来の癌研究は腫瘍細胞を中心として進められてきた。膵癌は豊富な細胞外基質を伴う過剰な desmoplasia を病理組織学的な特徴とする (Gastroenterology, 2005, Bachem)。慢性膵炎や膵癌における間質増生には膵星細胞 (Pancreatic Stellate Cells; PSCs) (Gastroenterology, 1989, Bachem; Gut, 1989, Apte) が強く影響する。膵星細胞は様々な液性因子や細胞外基質を産生し、ニッチとなって膵癌の増殖・転移を促進する (Cancer Res, 2008, Vonlaufen)。また、膵癌マウスモデルを用いた研究で、膵癌間質における Sonic hedgehog pathway を抑制することで治療抵抗性を改善できることが報告され (Science, 2009, Kenneth)、EGFR 阻害剤などを含め癌間質の制御が新たな治療戦略として現在脚光を浴びている。

2. 研究の目的

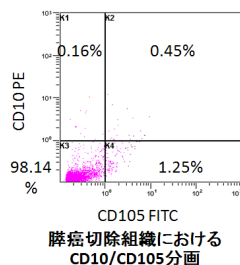
膵癌間質、特に間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem cells; MSC) を標的とした新規治療法の開発を目的とし、desmoplasia 抑制というこれまでの癌治療法研究とは全く異なる新しい切り口の膵癌新規治療戦略を創造することを目的とする。

3. 研究の方法

1. 間葉系幹細胞純化と新規間葉系幹細胞特異的表面抗原の同定-これまでに報告した CD10 に加え、間葉系幹細胞マーカーとして期待される CD44、CD90、CD105、CD280、Stro-1 などの陽性分画に関して解析を進める (Nature, 2007, Karnoub; Lab Invest, 2006, Seeberger)。具体的には、膵星細胞 (下図、左) あるいは手術切除標本 (下図、右) からセルソーターで純化する。切除標本では固形癌バルク組織をコラゲナーゼ処理して、単一細胞レベルまで分離し、細胞浮遊液を作成する必要がある。



膵癌由来星細胞における CD10/CD105 分画



膵癌切除組織における CD10/CD105 分画

-本研究を遂行するための工夫-

上記の点において、血液疾患と明らかに異なっており、特別な手法が必要となるが、申請者は、以前より手術切除標本から primary culture する手法に精通しており、この手法を改良することによりすでに独自のプロトコ

ールにしたがって細胞浮遊液を作成し、目標の表面抗原を発現する細胞集団のソートに成功している。

2. 間葉系幹細胞による膵癌の治療抵抗性や転移・浸潤・EMT への関与を明らかにする EMT に基づく転移や浸潤は固形癌に特異で、特に膵癌では予後を決定する。具体的には上記の間葉系幹細胞表面マーカーで初代培養星細胞あるいは切除組織から間葉系幹細胞を純化し、 $\alpha$ -SMA などの間葉系マーカーとの相関関係について検討する。

3. 膵癌細胞における CD105 発現と EMT の関連、および膵星細胞との相互作用に関する解析 CD105 は間葉系幹細胞マーカーとして期待されている一方で、Ewing 肉腫や腎癌においては癌細胞の発現が高いほど予後不良であることが報告されており、癌幹細胞 (Cancer stem cells; CSC) としても期待されている。膵癌における CD105 発現の意義に関しては今まで報告がなされておらず、その意義を検討するために EMT マーカーの発現および膵星細胞の形質にどのような作用を及ぼすかを検討する。

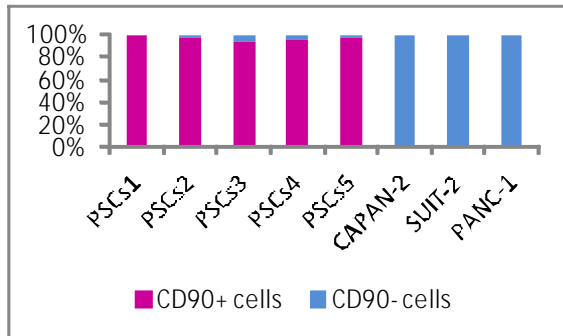
4. 膵癌細胞における CD166 発現と癌細胞の遊走能、浸潤能との関連について検討する CD166 は大腸癌や前立腺癌の分野では CSC とみなされており、他癌腫においても CD166 が独立した予後不良因子であるという報告もなされている。膵癌においてもいくつかの報告があるが、予後不良因子であるかどうかについてはいまだに明らかとなっていない。このため、CD166 の発現量と、膵癌細胞の遊走能、浸潤能との関連について検討する。

5. 抗線維化薬の Pirfenidone が膵癌にどのように作用するかを検討する Pirfenidone は特発性肺線維症の治療薬として期待されており、*in vitro*, *in vivo* ともに組織の線維化を抑制し、TGF- $\beta$  などの成長因子の分泌も抑制しうる可能性が報告されている。この Pirfenidone が膵癌間質に存在する PSCs に対してどのように作用し、それによって膵癌の進展抑制につながるかを検討する。

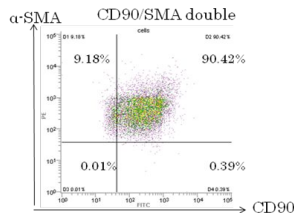
4. 研究成果

1. 間葉系幹細胞純化と新規間葉系幹細胞特異的表面抗原の同定 膵間葉系幹細胞の同定にあたり、まず、膵癌間質の線維増生の主体である膵星細胞に着目した。膵星細胞の一部は、間葉系幹細胞由来と考えられており、膵星細胞における間葉系幹細胞特異的表面抗原の解析を行った。当研究室でヒト膵癌切除組織より樹立した膵星細胞株で、間葉系幹細胞特異的表面抗原である CD29、CD56、CD90、CD105 の発現解析をフローサイトメトリーで行ったが、その発現

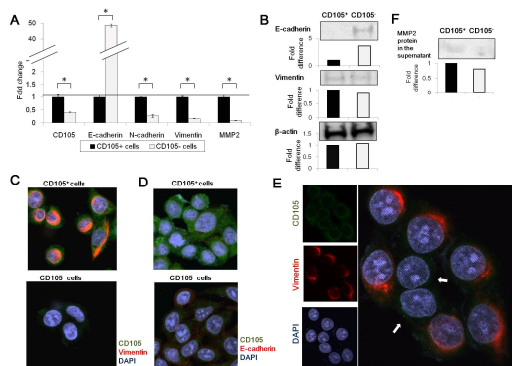
割合は0%に近いものと、100%に近いものに大別された。その中でも、他臓器の線維芽細胞において分化特異性が指摘されている CD90 に着目した。CD90 陽性線維芽細胞が筋線維芽細胞に分化することから、膵星細胞、ひいては間葉系幹細胞においても、間質の線維増生を制御する鍵となる表面マーカーである可能性が考えられた。



2. 間葉系幹細胞による膵癌の治療抵抗性や転移・浸潤・EMT への関与を明らかにする  
免疫組織化学染色法で、ヒト膵癌切除組織における間質の CD90 発現について検討した。連続切片の検討で、CD90 陽性細胞は  $\alpha$ -SMA 陽性細胞と一致しているものが多かったが、一部一致していない細胞群も認められた。膵星細胞株のフローサイトメトリーでの解析では、CD90 陽性細胞は 93% 以上認められた。免疫組織化学染色法による膵癌切除組織での検討結果との乖離を認めたと、ディッシュ上での培養・継代に伴う形質の変化や、単一形質を有する細胞の選択生存バイアスの影響が考えられた。CD90 の機能解析を行うために、磁気細胞分離法で、膵星細胞株を CD90 陽性細胞と陰性細胞へと分取することを試みたが、分取前の CD90 陽性細胞の割合が多いためか、高純度の CD90 陰性細胞の分取には至らなかった。

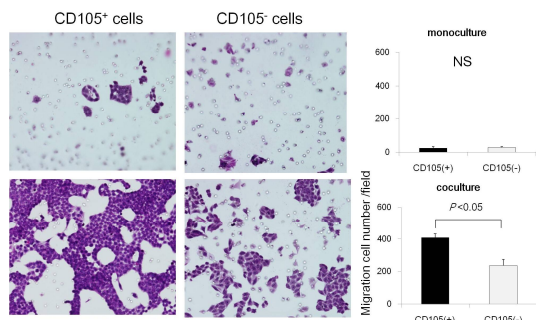


3. 膵癌細胞における CD105 発現と EMT の関連、および膵星細胞との相互作用に関する解析



CD105 陽性の膵癌細胞は EMT に特徴的な遺伝子発現変化が認められ、またそれらの遊走能は膵星細胞によって強く増強されることが分かった。このことから、CD105 は膵癌において CSC となり得る可能性が示唆され、さらには間質との相互作用によって悪性度が増強する可能性が示唆された。

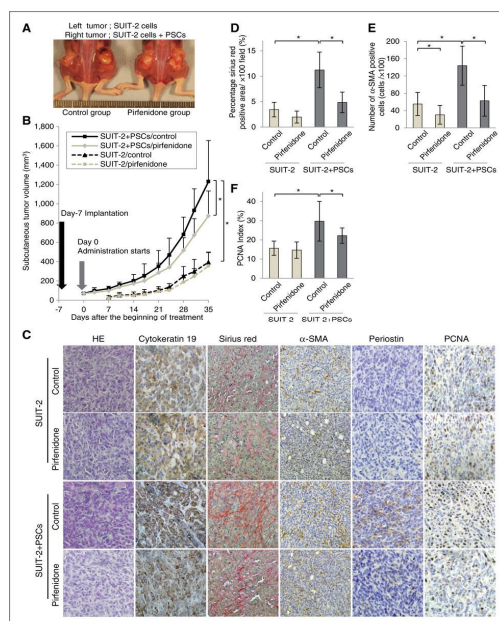
4. 膵癌細胞における CD166 発現と癌細胞の遊走能、浸潤能との関連について検討する  
CD166 陽性膵癌細胞が強い腫瘍形成能をもつ



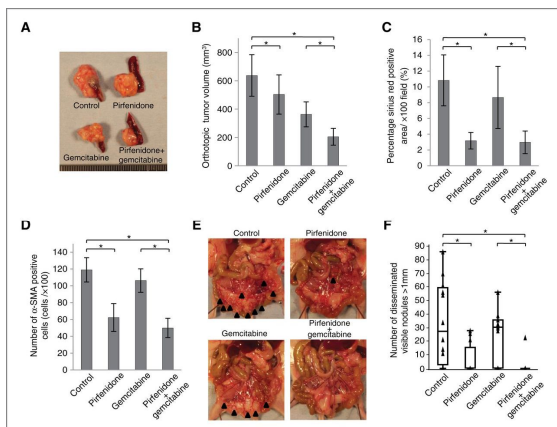
事が判明した一方で、CD166 陰性膵癌細胞の方が CD166 陽性細胞と比較して強い遊走能、浸潤能を示すことが分かった。CSC に特徴的な遺伝子発現や sphere formation assay などでは有意差を認めなかった。

5. 抗線維化薬の Pirfenidone が膵癌にどのように作用するかを検討する

抗線維化薬の Pirfenidone は in vitro において PSC の増殖能を抑制し、それは膵癌細胞の上清を添加したうえでの検討でも同様であった。また、癌間質相互作用に特徴的な PSC の発現蛋白 (成長因子や細胞外マトリクス蛋白) や mRNA を Pirfenidone が抑制することが分かった。in vivo では、膵癌細胞と PSC



を皮下に共移植したモデルにおける検討で、Pirfenidone の投与が癌間質相互作用をブロックし、腫瘍進展を抑制し得る可能性が示唆された。さらには、Gemcitabine と Pirfenidone を併用することで、単剤の場合と比較すると、腫瘍形成および転移を有意に抑制することが分かった。



## 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. Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, Ikenaga N, Fujiwara K, Cui L, Mizumoto K, Tanaka M. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells *Cancer Research* 73(7), 2013, 2345-56, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3180.
2. Fujiwara K, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Shindo K, Ikenaga N, Cui L, Takahata S, Aishima S, Tanaka M Migratory Activity of CD105+ Pancreatic Cancer Cells Is Strongly Enhanced by Pancreatic Stellate Cells *Pancreas* 42(8), 2013, 1283-90
3. Fujiwara K, Ohuchida K, Mizumoto K, Shindo K, Eguchi D, Kozono S, Ikenaga N, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. CD271<sup>+</sup> subpopulation of pancreatic stellate cells correlates with prognosis of pancreatic cancer and is regulated by interaction with cancer cells *PLoS One*, 12, 2012, DOI: 10.1371/journal.pone.0052682.

[学会発表](計 3 件)

1. Sada M et al. Clinical Significance of Stromal CD90 and alpha-SMA Expression in Pancreatic Cancer American Pancreatic Association, 44th Annual Meeting 2013/10/30, Miami
2. Fujiwara K et al. A CD166 negative subpopulation of pancreatic cancer cells

has strong invasive and migratory activity DDW2013 2013/5/18, Orlando

3. Fujiwara K et al. Migratory activity of CD105+ pancreatic cancer cells is strongly enhanced by pancreatic stellate cells 2012 Joint Meeting of American Pancreatic Association and International Association of Pancreatology 2012/11/03, Miami

[図書](計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 逸人 (FUJITA Hayato)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号: 40611281

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし