

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293288

研究課題名(和文) 膵臓がん浸潤部の葉酸受容体 発現マクロファージとがん幹細胞の相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of the interaction between the folate receptor beta expression macrophages and cancer stem cells in pancreatic cancer invasion

研究代表者

高尾 尊身 (TAKAO, SONSHIN)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・特任教授

研究者番号：80171411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膵繊維化とがん幹細胞の浸潤への関連性を検討した。がん幹細胞様の特性を示すCD133発現膵癌細胞が免疫不全マウスの膵臓内移植で間質の線維化増強および活性マクロファージの高発現を示した。活性マクロファージの多くはFR を発現し浸潤部位に存在した。血中可溶性FR 測定系を確立し、膵癌20例の臨床データとの相関を検討した結果、血清可溶性FR 高値群はリンパ節転移の可能性が高く、臨床応用が示唆された。また、CD133発現膵癌細胞はEMT関連遺伝子の発現を介して血行性転移を有意に増強した。さらに、miR-30 familyがCD133発現膵癌細胞の浸潤に重要な役割を果たしていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examine the relevance to the invasion of pancreatic fibrosis and cancer stem cells. CD133 expression pancreatic cancer cells showing the cancer stem cell-like characteristics showed fibrosis enhancement and high expression of active macrophages interstitial in the pancreas within the transplantation of immunocompromised mice. Many of the active macrophages were present in the invasion site express FR . To establish a blood soluble FR measurement system, a result of the study the correlation between the clinical data of pancreatic cancer 20 cases, serum soluble FR high-value group has a high possibility of lymph node metastasis, clinical application has been suggested. In addition, CD133 expression pancreatic cancer cells were significantly enhanced the hematogenous metastases through the expression of EMT-related genes. It was further found that the miR-30 family plays an important role in the invasion of CD133 expression pancreatic cancer cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：pancreatic cancer cancer stem cell CD133 macrophage FRb-receptor tumor microenvironment miR-30

1. 研究開始当初の背景

膵癌(PC)は予後不良な難治性癌で、5年生存率は5%以下である。近年、癌細胞と周囲間質細胞との相互作用に関する研究の展開が注目されている。我々は、腫瘍浸潤 Mφに葉酸受容体 β(FRβ)が発現することを、抗ヒト FRβ 単クローン抗体を用いて初めて報告した(*Arthritis Rheum*, 2006; *Cancer Immunol Immunother*, 2009)。PC は背景母地として慢性膵炎を伴うことが多く、がん幹細胞(CSC)と免疫細胞との相互作用が、浸潤転移において重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、癌微小環境における相互作用は未だ明らかになっていない。

2. 研究目的

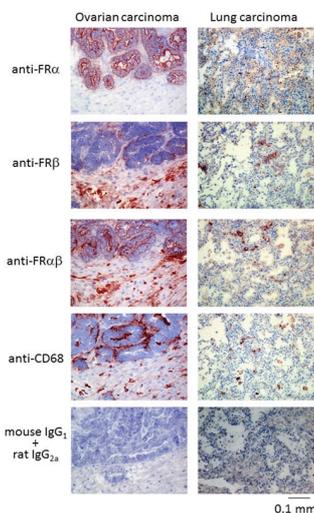
本研究は、PC 幹細胞とシグナル伝達系の相互作用を担う分子機構の解析と、FRβTAM を標的とする PC の診断法及び新規治療法の開発を目的とする。

3. 研究方法

FRαβ 抗体の作製 動物実験 免疫組織学的解析 分子生物学的解析
miRNAs 発現プロファイルの解析

4. 研究成果

(1) 葉酸リセプター抗体の作製: 葉酸リセプター抗体の作製をさらに発展させた。葉酸リセプターαとβはアミノ酸レベルで70%のホモロジーがあるが、双方に反応する抗体は作成されていない。我々は、葉酸リセプターαとβに反応する抗体を作成した。この抗体は、がん組織の葉酸リセプターα発現が



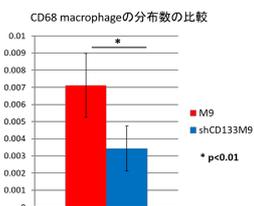
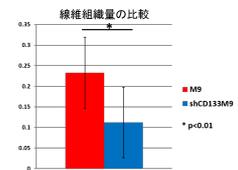
葉酸リセプターα発現 GROV-1、KB 細胞や葉酸リセプターβ発現 FRβ - B300-19 と反応したが葉酸リセプターの発現のない SKOV3 細胞や B300-19 細胞とは反応しなかった。作成した抗葉酸リセプターαβ 抗体の末梢白血球との反応性を解析結果、単球(CD14 陽性)の一部と M-CSF 下で培養した Mφ と反応したが、T (CD 3 陽性) 細胞、B (CD 20 陽性) 細胞、NK (CD 16 陽性) 細胞とは反応しなかった

(2) 膵癌の進展と腫瘍環境

セルレイン誘導膵炎における PC 進展と線維性間質: 慢性膵炎は PC の発癌または進展への関与が示唆されている。本研究では、セルレイン膵炎モデルに PC 株を同所移植し PC 進展における膵炎の影響を調べた。その結果、膵癌細胞の生着や腫瘍径に膵炎の有無による差は見られなかった。

CD133 高発現 PC の浸潤による間質への影響 (線維化) と腫瘍関連 Mφ との関連性:

PC は、desmoplastic reaction といわれる強い線維化反応が特徴である。本研究では、CD133⁺ PC が腫瘍微小環境に及ぼす影響を検討した。そこで、CD133 高発現(CD133^{high}) 細胞(Capan-1M9)と CD133 を knock-down (CD133^{KD}) した細胞 (shCD133M9) を樹立した。これらの細胞株を免疫不全マウスに同所移植し、腫瘍微小環境に対する効果を調べた結果、CD133^{high} PC を移植したマウス膵臓では腫瘍周囲線維化が高いことを見出した(右図)。また、CD133^{high} PC による線維化部分には CD68 Mφ の浸潤が著明で、CD133^{high} PC は線維化の促進および CD68 Mφ の誘導能が高いことが示唆された(右図)。さらに、炎症性 Mφ のサブタイプである FRβMφ を同定した。すなわち、

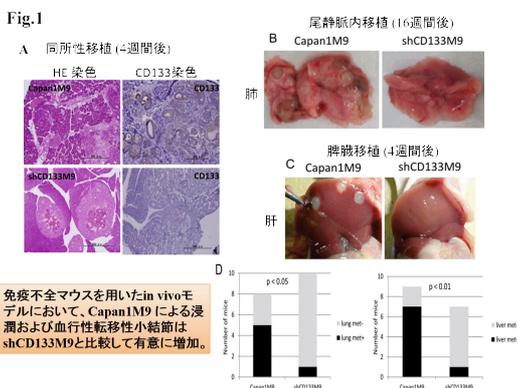


がん幹細胞特性をもつ CD133^{high}PC が間質の線維化を惹起することが示唆された。

(3) PC 転移において CD133 と ERK 経路の相互作用を介する上皮間葉移行の促進:

癌転移に必須な初期プロセスとされる EMT (上皮間葉移行) を誘導する因子として EGFR があり、それを介して活性化される経路として、RAS-RAF-MEK-MAPK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路がある。近年、PC において Src 活性の上昇が認められ、CD133 が SRC ファミリーチロシンキナーゼの基質として作用することにより、SRC 機能の調節に重要な役割を果たすことが示唆されている。

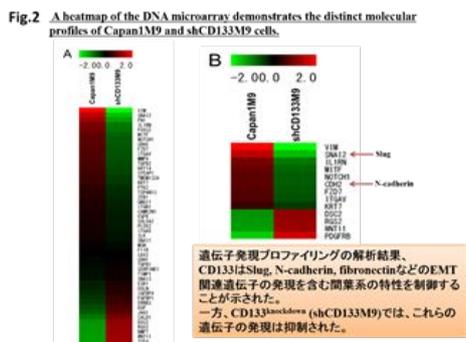
CD133 発現と血行性転移との関連性: 免疫不全マウスを用いた in vivo モデルにおいて、CD133^{high}PC(Capan1M9) による浸潤および



血行性転移性小結節は CD133^{KD} (shCD133M9) と比較して有意に増加を示した (上図)

CD133 による EMT 関連遺伝子の制御

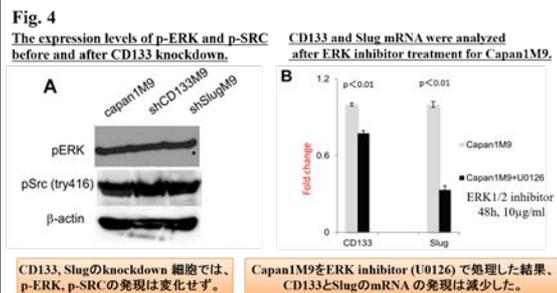
遺伝子発現プロファイリングの解析結果、CD133 は Slug, N-cadherin, fibronectin などの EMT 関連遺伝子の発現を含む間葉系の特性を制御することが示された (下図)。



CD133 と Slug の N-Cad 発現制御: N-cad 中和抗体により CD133^{high} Capan1M9 の遊走能は抑制された。CD133 過剰発現細胞 (M9-CD133-His) において、N-cadherin の発現が上昇した。細胞特異性を排除するため、Panc1 細胞 (CD133 の発現が 1.3%) に CD133 を過剰発現させた (Panc1 CD133) 場合も同様の結果であった。以上の結果は、N-cadherin 単独の障害で膵臓癌細胞の遊走能を抑制できることを示している。

ERK, SRC と CD133 の相互作用

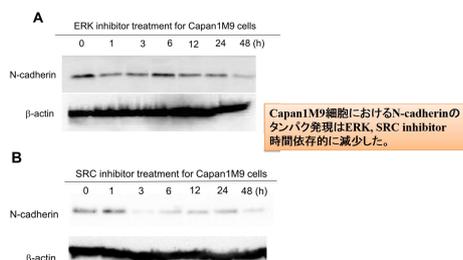
Slug の mRNA 発現は ERK inhibitor (U0126) で有意に減少した。CD133, Slug の knockdown 細胞では、p-ERK, p-SRC の発現は変化せず (下図 A)。Capan1M9 を ERK inhibitor (U0126) で処理した結果、CD133 と Slug の mRNA の発現は減少した (下図 B)。以上の結果は、ERK or SRC 経路は CD133, Slug regulation loop の上流に存在することを示唆している。



ERK or SRC 経路はCD133, Slug regulation loop の上流に存在すると示唆される。

また、CD133 のタンパク発現は、時間依存的に ERK inhibitor, SRC inhibitor で顕著に抑制された。Capan1M9 細胞における N-cadherin のタンパク発現は ERK, SRC inhibitor 添加後 時間依存的に減少した (右図 A, B)。

Fig 5 N-cadherin expression after U0126 or SRC inhibitor treatment.

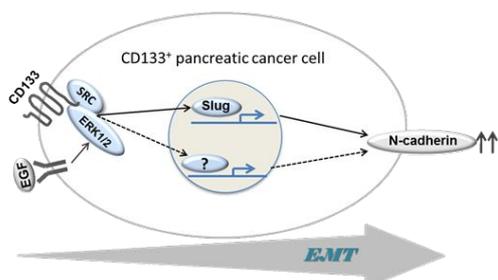


EGF を添加後の N-cadherin の発現は、shSlugM9 で上昇するが、shCD133M9 では上昇は確認されなかった。

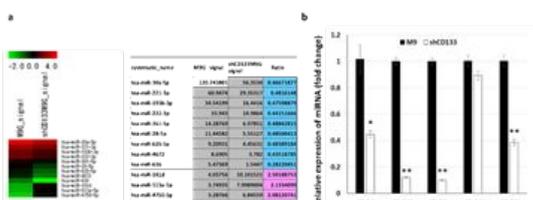
また、CD133-His を His 抗体で免疫沈降を行った結果、p-ERK と p-Src は、CD133 と結合している (右図 D)。

以上の結果から、CD133⁺ PC では、ERK/SRC/CD133 axis は N-cadherin 発現を調節する重要な一つの complex を形成していると考えられた。

これらの結果を考察して、CD133^{high}PC の浸潤に関する signal pathway の仮説を下図に示す。



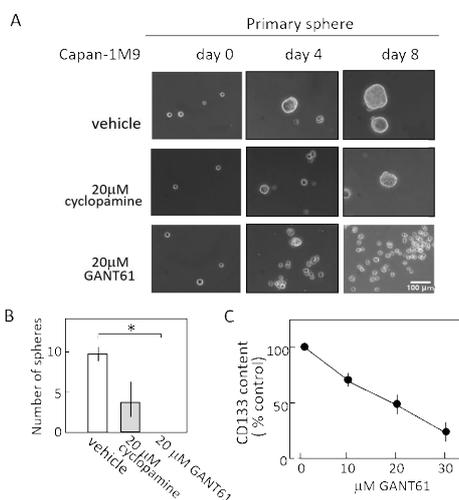
(4) 膵がん幹細胞と miRNA 発現 : miRNA マイクロアレイを用いて CD133^{KD}PC では miR-30 family の発現レベルが減少していることを見出した (下図)。



miR-30 family の miR-30a, 30b, 30c の miRNA を遺伝子導入した subline 株を複製し解析した。miR-30a, 30b, 30c の発現上昇は細胞増殖、sphere 形成に影響を与えなかった。一方、これら subline は PC に対する標準的抗癌剤であるゲムシタビンに耐性を示した。さらに興味深いことに、遊走、浸潤を促進した。また、これらの miRNA によって間葉系マーカーが上方制御され miR-30a subline 株では N-cadherin の mRNA および蛋白の高発現が認められた。

(5) Hedgehog/GLI inhibitor GANT61 と mTOR inhibition による PC 幹細胞の制御

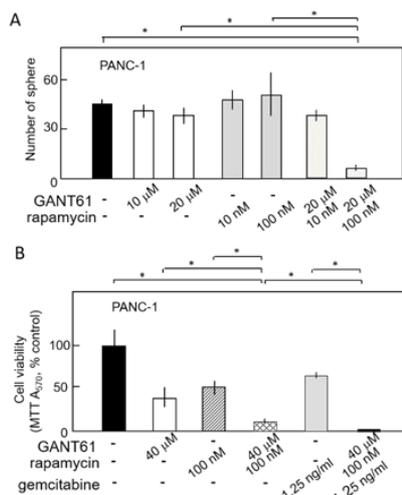
PC の三つの典型的な細胞株 (PANC1、MIA の PaCa-2、CAPAN-1) および CD133^{high}PC では抗 SHH および抗 GLI1 で陽性染色を示した。この分子は GLI1 と GLI2 媒介転写をブロックするために核内で作用し、Hh シグナル伝達に高い特異性を示す。CD133^{high}PC の sphere 形成に対する Hh 阻害剤の効果を調べた。幹細胞増殖条件下、CD133^{high}PC は 8 日間培養後、直径 140μm に達した sphere を形成した (下図 A)。cyclopamine 及び 20μM の GANT 61 の処置は、有意に大きさ及び sphere 数を減少させた。直径 100μm より大きい sphere 形成は、図 B に示す。cyclopamine は



50%の sphere 形成数を減少させた。対照的に、GANT61 は、sphere 形成を阻止した。これらの結果は、Hh / SMO 阻害剤、cyclopamine よりも効率的に Hh / GLI インヒビター GANT61 によって sphere 形成の減少が示された (図 C)。

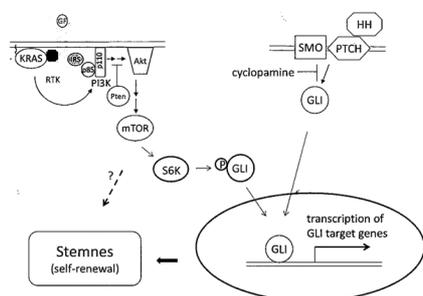
すなわち、Hh シグナル伝達は、CD133^{high}PC の自己複製に必須であることを示している。一方、CD133^{high}PC の細胞生存率に対して、cyclopamine では生存率に対する効果を示さなかったのに対し、GANT61 は濃度依存的に減少を示した。さらに、20μM GANT61 による CD133^{high}PC の処理では、sphere 形成を阻止した。以上の結果は、CD133⁺PC に対して GANT61 は高い有効性を示すこと示している。次いで、mTOR 阻害剤 rapamycin と

GANT61 の併用療法を試みた。これら 2 つの阻害剤の組み合わせは、強く PANC-1 細胞(下図 A) の sphere 形成を減少させた。これらの結果は、Hh / GLI と rapamycin の組み合わせが GANT61 に低感受性を示すが幹細胞様



細胞に対しても自己複製シグナル伝達を強く抑制することを示した。また、2 つの阻害剤との併用療法は、約 15% (上図 B) に細胞生存率を減少させた。興味あることに、この組み合わせに、ゲムシタピンの低濃度を追加すると生存細胞をほぼ 0% へ低下させた (上図 B)。

相乗効果の可能なメカニズムとして Hh と mTOR シグナル伝達の分子間相互作用が重要である。S6 キナーゼ S6K1 は、PI3K / AKT / mTOR 経路の下流で活性化され、SMO に依存しないリン酸化 GLI1 の活性化をもたらす。S6K による GLI の活性化を介さない mTOR 独自機能の存在を示唆している (下図)。



mTOR 阻害と Hh/ GLI 阻害剤 GANT61 の組み合わせは、PC の CSC を制御するための効

率的なアプローチを提供し、高死亡率の膵癌に対する新たな治療選択肢となる可能性を示している。

(6) 臨床応用への展開

ヒトの体液、血液における可溶性 FR β 測定系を確立し、臨床への応用を始めている。現在まで、膵癌 20 症例の臨床データと可溶性 FR β 値の相関を検討した結果、血清可溶性 FR β 高値群はリンパ節転移との高い関連性を示唆している。さらに症例数を増やし解析を行い臨床応用に向けての開発を行っている。

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 8 件)

1. Tsukasa K, Ding Q, Miyazaki Y, Matsubara S, Natsugoe S, Takao S. miR-30 family promotes migratory and invasive abilities in CD133⁺ pancreatic cancer stem-like cells. *Hum Cell*. 2016 Mar 10. [Epub ahead of print] 査読有
2. Nagai T, Furusho Y, Li H, Hasui K, Matsukita S, Sueyoshi K, Yanagi M, Hatae M, Takao S, Matsuyama T. Production of a High-affinity Monoclonal Antibody Reactive with Folate Receptors Alpha and Beta. *Monoclonal Antib Immunodiagn Immunother*. 2015 Jun;34(3):181-90. 査読有
3. Tsukasa K, Ding Q, Yoshimitsu M, Miyazaki Y, Matsubara S, Takao S. Slug contributes to gemcitabine resistance through epithelial-mesenchymal transition in CD133(+) pancreatic cancer cells. *Hum Cell*. 2015; 28(4):167-74. 査読有
4. Samaniego R, Palacios BS, Domiguez-Soto A, Vidal C, Salas A, Matsuyama T, Sánchez-Torres C, de la Torre I, Miranda-Carús ME, Sánchez-Mateos P, Puig-Kröger A. Macrophage uptake and accumulation of folates are polarization-dependent in vitro and in vivo and are regulated by activin A. *J Leukoc Biol*. 2014 95(5):5797-808. 査読有
5. Li H, Nagai T, Hasui K, Matsuyama T. Depletion of folate receptor β -expressing macrophages alleviates bleomycin-induced experimental skin fibrosis. *Mod Rheumatol*. 2014 Sep;24(5):816-22. 査読有
6. Ding Q, Miyazaki Y, Tsukasa K, Matsubara S, Yoshimitsu M, Takao S. CD133 facilitates epithelial-mesenchymal transition through interaction with the ERK pathway in pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer*. Published online 2014 Jan 27;13(1):15. 査読有
7. Matsuo Y, Ding Q, Desaki R, Maemura K, Mataka Y, Shinchi H, Natsugoe S, Takao S. Hypoxia inducible factor-1 alpha plays a pivotal role in hepatic metastasis of pancreatic cancer: an immunohistochemical study. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 21:105-112, 2014 DOI: 10.1002/jhbp.6 査読有
8. Shyuichiro Matsubara, Qiang Ding, Yumi Miyazaki, Taisaku Kuwahata, Koichiro Tsukasa and Sonshin Takao. mTOR plays critical roles in pancreatic cancer stem cells through specific and stemness-related functions. *Sci Rep*. 2013 Nov 15;3:3230. doi: 10.1038/srep03230. 査読有

【学会発表】(計 15件)

1. Koichiro Tsukasa, Shoko Ueno, Yumi Miyazaki, Toru Obara, Shyichiro Matsubara, Sonshin Takao. The influence of miR-30 family to migration of a pancreatic cancer cell line, Capan-1. 2015年10月10日 第74回日本癌学会学術総会
2. Koichiro Tsukasa, Qiang Ding, Makoto Yoshimitsu, Yumi Miyazaki, Shyuichiro Matsubara, Shoko Ueno, Toru Obara, Takami Matsuyama, Sonshin Takao. Slug contributes to gemcitabine resistance through epithelial-mesenchymal transition in CD133+ pancreatic cancer cells. 2015年8月23日 第33回ヒト細胞学会学術集会
3. Koichiro Tsukasa, Qiang Ding, Ryoko Imakiire, Shoko Ueno, Yumi Miyazaki, Toru Obara, Shyichiro Matsubara, Sonshin Takao. The role of miR-30a in the highly migratory pancreatic cancer cell line. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日 横浜市
4. Matsubara S, Miyazaki Y, Tsukasa K, Obara T, Ueno S, Takao S. Not only mTORC1 but also mTORC2 are involved in the function to maintain stem-like property of pancreatic cancer cells. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日 横浜市
5. Q Ding, M Yoshimitsu, Y Miyazaki, T Obara, K Tsukasa, S Matasubara, S Takao. CD133 facilitates pancreatic cancer metastasis by promoting epithelial-mesenchymal transition (EMT). 第72回日本癌学会総会 2013年10月3日 横浜市
6. T Nagai, K Hasui, T Matsuyama, S Takao, M Hatae, K Sueyoshi, S Matsukida. Efficacy of an antibody reactive with human folate receptors alfa and beta in targeting cancer cells and TAMs. 第72回日本癌学会総会 2013年10月3日 横浜市
7. S Matsubara, Q Ding, Y Miyazaki, T Kuwahata, K Tsukasa, S Takao. The mTOR pathway as a mechanism to maintain pancreatic cancer stem cell properties and a target to eliminate stem-like cells. 第72回日本癌学会総会 2013年10月3日 横浜市
8. Y Miyazaki, W Yuqing, K Mitsui, Q Ding, K Tsukasa, S Matsubara, K Kosai, S Takao. Immunohistochemical comparative analysis of the sphere cells of CD133-positive pancreatic cancer cells with iPS cells. 第72回日本癌学会総会 2013年10月4日 横浜市
9. Koichiro Tsukasa, Qiang Ding, Ryoko Imakiire, Shoko Ueno, Yumi Miyazaki, Toru Obara, Shyichiro Matsubara, Sonshin Takao. The role of noncoding RNAs in highly CD133-expressing pancreatic cancer stem-like cells. 第72回日本癌学会総会 2013年10月3日 横浜市
10. Q Ding, M Yoshimitsu, K Tsukasa, Y Miyazaki, S Ueno, R Imakiire, T Obara, S Takao. CD133/ERK axis mediates invasion and metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in pancreatic cancer. 104th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting. 2013 April 8, Washington DC, USA
11. Y Miyazaki, Q Ding, M Yoshimitsu, T Obara, K Tsukasa, S Matsubara, S Takao. GLI-1 plays a pivotal role in Hedgehog pathway on self-renewal of pancreatic cancer stem cells. 104th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting. 2013 April 8, Washington DC, USA
12. Koichiro Tsukasa, Qiang Ding, Makoto Yoshimitsu, Yumi Miyazaki, Toru Obara, Shyuichiro Matsubara, Sonshin Takao. Role of Slug in chemoresistance, invasion and metastasis of CD133-expressing pancreatic cancer. 2013年4月6日 104th AACR Annual Meeting
13. S Takao, Q Ding, T Nagai, H Kurahara, M Yoshimitsu, T Kuwahata, Y Miyazaki, R Imakiire, S

Ueno, T Obara, T Matsuyama. The roles of novel tumor-associated macrophages (TAMs) in invasion and metastasis of pancreatic cancer. 104th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting. 2013 April 8, Washington DC, USA

14. Koichiro Tsukasa, Qiang Ding, Makoto Yoshimitsu, Yumi Miyazaki, Toru Obara, Shyuichiro Matsubara, Sonshin Takao. Involvement of Slug in the properties of CD133-expressing pancreatic cancer. 2013年2月14日 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research

15. Koichiro Tsukasa, Qiang Ding, Makoto Yoshimitsu, Koki Maeda, Taisaku Kuwahata, Yumi Miyazaki, Toru Obara, Shyuichiro Matsubara, Sonshin Takao. Slug contributes to chemoresistance in pancreatic cancer cells. 2012年9月20日 第71回日本癌学会学術総会

【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 1件)

名称: 膵臓癌の治療用及び診断用の組成物

発明者: 高尾尊身・松山隆美

権利者: 国立大学法人 鹿児島大学

種類: 特許

番号: 特許第5881085号

取得年月日: 平成28年2月12日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高尾 尊身 (SONSHIN TAKAO)

鹿児島大学, 医用ミニブタ先端医療開発研究センター・特任教授 研究者番号: 80171411

(2) 研究分担者

・松山 隆美 (TAKAMI MATSUYAMA)

鹿児島大学, 医用ミニブタ先端医療開発研究センター・客員教授 研究者番号: 30145479

・松原 修一郎 (Shyichiro Matsubara)
鹿児島大学, 医用ミニブタ先端医療開発研究センター・准教授 研究者番号: 60199841

・永井 拓 (TAKU NAGAI)
鹿児島大学, 医歯学域医学系・講師 研究者番号: 90363647

・丁 強 (QIANG DING)
聖ミカエル病院李嘉誠知識研究所キーン研究センター 研究者番号: 80457647

・吉満 誠 (MAKOTO YOSHIMITSU)
鹿児島大学, 医歯学域医学系・准教授 研究者番号: 70404530