

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461024

研究課題名(和文)ペリサイトをターゲットとした腫瘍血管の正常化 - 膵癌の新規治療法開発に向けて -

研究課題名(英文) Normalization of tumor vessels targeting pericytes; a new approach in treatment of pancreatic cancer

研究代表者

嶋本 正弥 (SHIMAMOTO, Masaya)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00457433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生阻害薬は大腸癌、肺癌などで一定の効果をあげているが、膵癌では実用化されていない。本研究では血管を裏打ちし、血管の安定性に関わるペリサイト(周皮細胞)を標的とする新規治療の開発を目指した。

我々の研究では膵癌組織でペリサイトは間質に広く存在していた。そこで、血管の脆弱性が膵癌の豊富な間質増生によってもたらされる可能性を考え、間質増生に中心的な役割を果たす膵星細胞に注目して研究を行った。

膵癌切除組織の膵星細胞のCD51発現は予後と負の相関があり、膵星細胞のCD51抑制実験ではin vitroで膵星細胞の遊走、浸潤能は低下し、ヌードマウスへの膵癌細胞との共移植では腫瘍形成能が低下した。

研究成果の概要(英文)：Antiangiogenic agents have been shown to be effective in the treatment of cancers such as colon cancer and lung cancer, but not in pancreatic cancer. In this study, we aimed to develop a new treatment of pancreatic cancer targeting pericytes, which cover and stabilize the tumor vessels.

In our study, pericytes were prevalent in the stroma of pancreatic cancer specimen. Then we conducted this study focused on pancreatic stellate cells(PSCs), which play a crucial role in desmoplasia, considering the possibility that tumor vascular permeability is caused by the abundant tumor stroma.

Stromal CD51 expression in the resected pancreatic cancer specimens was associated with shorter patients survival time, and knockdown of CD51 in PSCs led to suppression of proliferation and migration of PSCs in vitro. In addition, tumor growth was inhibited in nude mice co-transplanted with pancreatic cancer cells and CD51 knocked down PSCs, compared with those co-transplanted with control PSCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 ペリサイト 膵星細胞 薬剤送達 血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

癌の血管新生を阻害することで酸素や栄養の供給を断ち、癌細胞を兵糧攻めにするというコンセプトで血管新生阻害薬は研究開発されており、大腸癌や肺癌などで臨床応用され、一定の効果をあげている。しかし、膵癌においては、既存の血管新生阻害薬の効果は示されていない。一方、癌組織の低酸素化を介した癌細胞の浸潤・転移能の増強や、長期使用後の耐性獲得といった問題点も指摘されている。これらのことから、血管新生阻害薬の主な標的である血管内皮細胞のみならず、周囲に存在する癌間質にも目が向けられるようになった。

間質を構成する細胞のひとつであるペリサイト（血管周皮細胞）は血管内皮細胞との相互作用により血管の安定化や機能制御に重要な役割を果たすとともに、血管新生において血管内皮細胞の出芽を誘導するとされる。正常組織のペリサイトは内皮細胞を裏打ちし血管構造を安定化しているが、腫瘍組織ではペリサイトの形態や局在が変化して血管の安定性は失われるとされている。さらに機能的にも正常と異なる働きが示唆されており、癌の転移を制御する可能性などが報告されている。

膵癌は豊富な間質増生を特徴とする乏血性腫瘍であり、このことが薬剤送達を妨げている。膵癌におけるペリサイトの役割についての報告は少ないが、ペリサイトを治療標的とすることで腫瘍血管を正常化して薬剤送達率を向上させ、ひいては薬物治療の有効性を高めることができる可能性がある。

## 2. 研究の目的

膵癌のペリサイトを治療標的として腫瘍血管を正常化することで、薬剤到達率の向上を計り、薬物治療の有効性を高めることを目指す。そのために、膵癌におけるペリサイトの形態や局在を同定し、癌細胞や血管内皮細胞、周囲間質細胞との相互作用を含めた生理学的特徴の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 膵癌切除組織の免疫組織化学染色によりペリサイトの形態や分布、血管内皮細胞との位置関係を検討する。

(2) 我々が初代培養により樹立した膵星細胞をフローサイトメトリーにより解析し、ペリサイトマーカーであるNG2およびPDGFR の2つの細胞表面抗原を指標としてPSCsにおける陽性率を検討する。

(3) 膵癌における血管の脆弱性が、膵癌の豊富な間質増生によってもたらされている可能性を考え、間質増生において中心的な役割を果たしている膵星細胞に焦点を絞り、間質増

生の制御が血管の安定性向上に与える影響について検討を行う。

具体的には、肝臓における線維化に肝星細胞のCD51が関与するとの報告を基に、膵星細胞におけるCD51制御が間質を抑制できるとの仮説に基づいて検証を行う。

まず、膵癌切除組織の免疫組織化学染色でCD51陽性細胞の分布、形態を観察する。

(4) 膵癌患者の切除標本の免疫組織化学染色におけるCD51の染色強度と臨床病理学的因子の相関を検討する。

(5) 膵星細胞のCD51の発現をRNA干渉によってノックダウンし、膵星細胞におけるCD51の分子生物学的特性を検討する。

(6) CD51をノックダウンした膵星細胞とノックダウンしていないPSCsをそれぞれ膵癌細胞株SUIT-2と共にヌードマウスの皮下に共移植して比較することで、腫瘍増殖における膵星細胞のCD51の役割を検討する。

## 4. 研究成果

(1) これまでに報告されているペリサイトのマーカーとしてNG2、PDGFR などがあるが、これらの免疫組織化学染色により膵癌組織における癌細胞周囲の間質にペリサイトが広く分布していることが判明した（図1、上段）。また、連続切片でCD31を血管内皮細胞のマーカーとして免疫組織化学染色を行うと、血管の分布とは無関係にペリサイトが分布していることも分かった（図1、下段）。

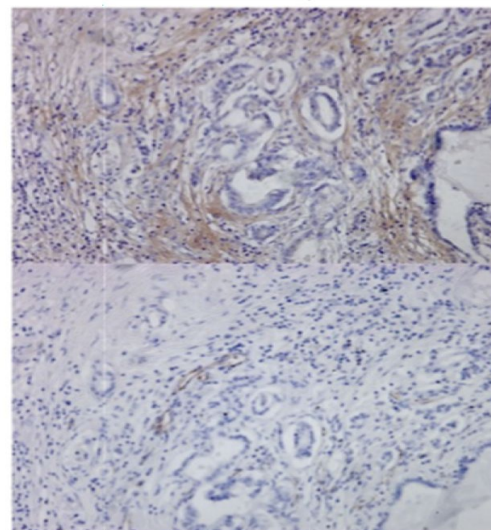


図1：膵癌切除標本の免疫組織化学染色  
上段：NG2（ペリサイト）  
下段：CD31（血管内皮細胞）

(2) 膵癌切除組織から樹立した膵星細胞の中にはNG2、PDGRF という表面抗原を有した細胞集団が存在することわかった。しかしながら、その陽性率は細胞群毎に様々であり、膵星細胞の由来や培養条件などに影響され、ダイナミックに発現が変化する可能性が考えられた。

(3) 星細胞の線維化に関与しているCD51の免疫組織化学染色によって、正常膵組織では神経細胞のみが陽性であったのに対し、膵癌組織では間質に広くCD51陽性細胞が存在することが分かった(図2)。

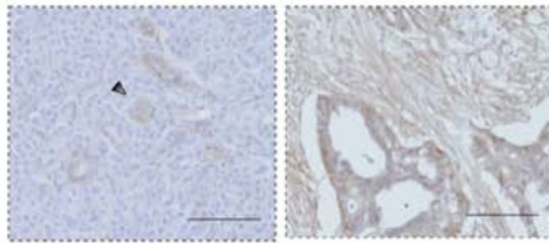


図2: CD51の免疫化学組織染色  
左: 正常膵組織(矢頭: 神経線維)  
右: 膵癌組織

(4) 膵癌切除組織の免疫組織化学染色を行い、間質細胞に占めるCD51陽性細胞の割合(0%; 1, <25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; or 4, 76-100%)および染色強度(陰性; 0, 弱陽性; 1, 中等度陽性; 2, 強陽性; 3)をそれぞれスコア化し、掛け合わせることでCD51高発現群(>5点)、低発現群(<5点)に分けて検討を行った。その結果、CD51高発現群は低発現群と比較して有意に全生存期間が短く、リンパ節転移陽性や膵切断断端陽性例が有意に多かった(図3)。

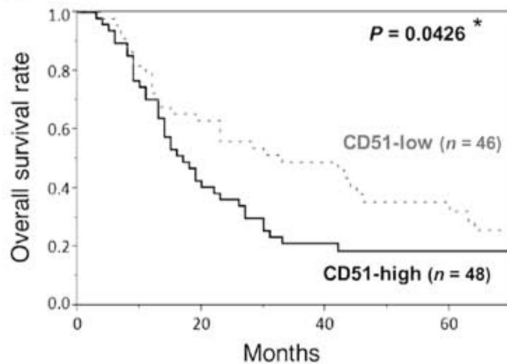


図3: 膵星細胞のCD51高発現群は低発現群と比較して有意に全生存期間が短かった。

(5) 樹立した膵星細胞のCD51をRNA干渉によって発現抑制を行い、mRNAレベル、タンパクレベルで発現の低下を確認した。このCD51抑制膵星細胞を用いて、増殖能や遊走を検討したところ、CD51の抑制は膵星細胞の遊走および増殖能は低下した。さらに、薬剤送達を含めて膵癌の悪性度を高めている報告が多数ある、膵星細胞が産生する細胞外基質を注目し、主な細胞外基質であるコラーゲンとフィブロネクチンの産生に、膵星細胞のCD51がどう影響を与えているかを検討した。CD51を抑制した膵星細胞においては、コラーゲンやフィブロネクチンといった細胞外基質の産生が低下していた(図4)。これらの結果から、膵癌悪性度に膵星細胞のCD51が影響を与えている可能性が示唆され、これを学会発表した。

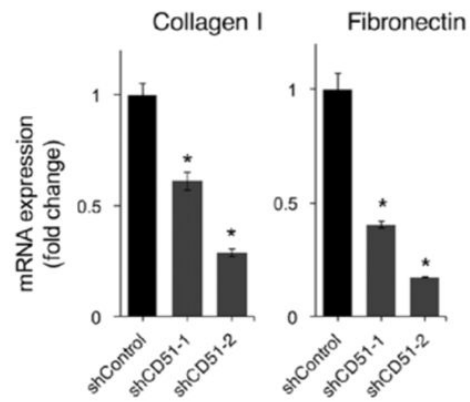


図4: CD51を抑制した膵星細胞ではコラーゲン、フィブロネクチンといった細胞外基質の産生が低下していた。

(6) ノードマウスの皮下に膵癌細胞株SUIT-2および膵星細胞を共移植した。膵星細胞との共移植による膵癌細胞の増殖能を評価するために、膵癌細胞単独移植群、コントロールの膵星細胞との共移植群、2種類のshRNAを用いてCD51をノックダウンした群の4群で比較した。移植した42日後に解剖を行い、腫瘍重量を測定した。その結果、CD51をノックダウンした膵星細胞との共移植群ではコントロールの膵星細胞との共移植群に比較して、有意に形成された腫瘍の重量が軽かった(図5)。

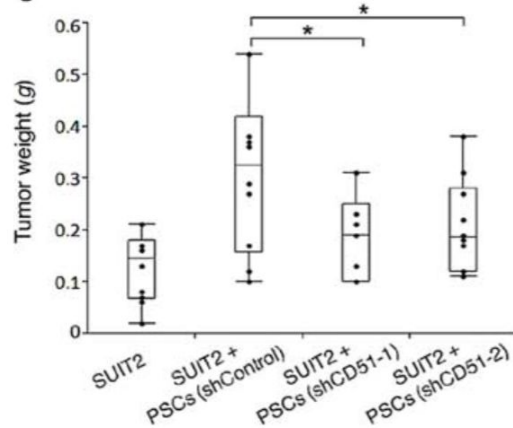


図5: ノードマウス皮下への膵星細胞と膵癌細胞の共移植実験。CD51をノックダウンした膵星細胞との共移植群では腫瘍の重量は有意に軽かった。

## 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 10件)

Horioka K, Ohuchida K, Sada M, Zheng B, Moriyama T, Fujita H, Manabe T, Ohtsuka T, Shimamoto M, Miyazaki T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Suppression of CD51 in pancreatic stellate cells inhibits tumor growth by reducing stroma and altering tumor-stromal interaction in

pancreatic cancer, *Int J Oncol.* 査読有, 48(4), 2016, 1499-1508  
doi: 10.3892/ijo.2016.3374  
Zheng B, Ohuchida K, Chijiwa Y, Zhao M, Mizuuchi Y, Cui L, Horioka K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Tanaka M, CD146 attenuation in cancer-associated fibroblasts promotes pancreatic cancer progression. *Mol Carcinog*, 査読有, 2016, in press,  
doi: 10.1002/mc.22409.  
Zheng B, Ohuchida K, Cui L, Zhao M, Shindo K, Fujiwara K, Manabe T, Torata N, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M, TM4SF1 as a prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma is involved in migration and invasion of cancer cells. *Int J Oncol.* 査読有, 47(2), 2015, 490-498.  
doi: 10.3892/ijo.2015.3022.  
Mizuuchi Y, Aishima S, Ohuchida K, Shindo K, Fujino M, Hattori M, Miyazaki T, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y, Anterior gradient 2 downregulation in a subset of pancreatic ductal adenocarcinoma is a prognostic factor indicative of epithelial-mesenchymal transition. *Lab Invest.*, 査読有, 95(2), 2015, 193-206.  
doi: 10.1038/labinvest.2014.138.  
Ideno N, Ohtsuka T, Matsunaga T, Kimura H, Watanabe Y, Tamura K, Aso T, Aishima S, Miyasaka Y, Ohuchida K, Ueda J, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M, Clinical Significance of GNAS Mutation in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas With Concomitant Pancreatic Ductal Adenocarcinoma., *Pancreas*, 査読有, 44(2), 2015, 311-320.  
doi: 10.1097/MPA.0000000000000258.  
Fujimura Y, Ikenaga N, Ohuchida K, Setoyama D, Irie M, Miura D, Wariishi H, Murata M, Mizumoto K, Hashizume M, Tanaka M, Mass spectrometry-based metabolic profiling of gemcitabine-sensitive and gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Pancreas*, 査読有, 43(2), 2014, 311-318.  
Fujiwara K, Ohuchida K, Sada S, Horioka K, Ulrich CD 3rd, Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M, CD166/ALCAM expression is characteristic of tumorigenicity and invasive and migratory activities of pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 査読有, 2014, doi:

10.1371/journal.pone.0107247.  
Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Aishima S, Oda Y, Nagai E, Tanaka M, Micro RNA-373 is Down-regulated in Pancreatic Cancer and Inhibits Cancer Cell Invasion. *Annals of Surgical Oncology*, 査読有, 2014, doi: 10.1245/s10434-014-3676-8.  
Akagawa S, Ohuchida K, Torata N, Hattori M, Eguchi D, Fujiwara K, Kozono S, Cui L, Ikenaga N, Ohtsuka T, Aishima S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M, Peritoneal myofibroblasts at metastatic foci promote dissemination of pancreatic cancer, *Int J Oncol.* 査読有, 45(1), 2014, 113-120  
doi: 10.3892/ijo.2014.2391.  
Eguchi D, Ohuchida K, Kozono S, Ikenaga N, Shindo K, Cui L, Fujiwara K, Akagawa S, Ohtsuka T, Takahata S, Tokunaga S, Mizumoto K, Tanaka M, MAL2 expression predicts distant metastasis and short survival in pancreatic cancer., *Surgery*, 査読有, 154(3), 2013, 573-582  
doi: 10.1016/j.surg.2013.03.010.

〔学会発表〕(計 1件)

Horioka K, et al. Suppression of CD51 in Pancreatic Stellate Cells Inhibits Tumor Growth by Reducing Stroma and Altering Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer., *American Pancreatic Association 46th Annual Meeting.*, 2015.11.4., San Diego(America)

〔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

嶋本 正弥 ( SHIMAMOTO, Masaya )  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：00457433

(2)研究分担者

水元 一博 ( MIZUMOTO, Kazuhiro )  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号：90253418

坂井 寛 ( SAKAI, Hiroshi )  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：80611665

(3)連携研究者

なし