

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461956

研究課題名(和文) 膵癌幹細胞の治療抵抗性を制御するトランスポーターの機能解析

研究課題名(英文) Role of membrane transporters in drug resistance of pancreatic cancer cells

研究代表者

上野 康晴 (UENO, Yasuharu)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：60375235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の新たな治療法を開発する上では、抗癌剤に耐性を示す膵癌幹細胞の特性を明らかにし、有益なバイオマーカーを同定する必要がある。本研究では、ヒト膵癌組織を移植し担癌マウスにゲムシタビン治療を施すことにより、ヒト膵癌治療モデルを構築した。治療後の組織を解析したところ、癌幹細胞マーカーの発現を示す細胞が高頻度に検出された。残存膵癌組織のプロテオーム解析およびヒト膵癌病理検体を用いた解析により、膵癌幹細胞において高い発現を示す薬剤トランスポーターを複数抽出した。

今後、予後と関連するトランスポーターを同定することにより、膵癌の新たな治療標的および、新規バイオマーカーの開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of pancreatic cancer remains very poor, the mainly reason might be the prominent resistance to chemoradiotherapy. However, the mechanism of chemoradiotherapy resistance in pancreatic cancer has not been fully understood. We aim to investigate the relationship between pancreatic cancer stem cells and chemoradiotherapy resistance, and identify the specific biomarkers, which promote tumor survival in pancreatic cancer with chemoradiotherapy.

Firstly, we transplanted human pancreatic cancer tissue into mice to construct pancreatic cancer mice model. With gemcitabine treatment, we found that the population of pancreatic cancer stem cells was increasing. Moreover, we identified expression of multiple transporters were upregulated after gemcitabine treatment with proteomic analysis, and these upregulated transporters were mainly detected in CD133+CD44+ cancer cells. Our results suggest that these transporters may exhibit important roles in the chemoradiotherapy resistance.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：癌幹細胞 膵癌 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌の治療抵抗性と癌幹細胞

膵癌は消化器癌の中でも予後が悪く、既存の化学療法に治療抵抗性を示すことが知られている。膵癌の治療抵抗性には抗癌剤に耐性を示す膵癌幹細胞の関与が強く考えられるが、従来の解析の多くはモデル動物を対象とした理解に留まっており、ヒト膵癌幹細胞の特性は十分に明らかにされていない。また、癌幹細胞の治療抵抗性機構についても未解明な点が多い。

(2) 薬剤排出トランスポーター

癌幹細胞の治療抵抗性において、薬剤排出トランスポーターの機能が重要視される。しかしながら、これまでに膵癌幹細胞の治療抵抗性に関与する薬剤トランスポーターは同定されていない。加えて、複数の報告より、トランスポーターを始めとする細胞膜上に発現する分子群は、遺伝子発現量と蛋白質発現量が必ずしも一致しておらず、トランスポーターの発現レベルを正確に評価するためには、蛋白質レベルでの解析を実施する必要がある。

2. 研究の目的

膵癌は消化器癌の中でも予後が悪く、既存の化学療法に治療抵抗性を示すことが知られている。膵癌の治療抵抗性は、膵癌幹細胞が抗癌剤に耐性を示しながら残存することにより生じるものと考えられる。本研究では、抗癌剤治療に抵抗性を示すヒト膵癌幹細胞の特性解析を進めるとともに、膵癌幹細胞において特異的に発現する分子の探索を試みる。癌細胞の抗癌剤治療抵抗性には、抗癌剤の排出を担う薬剤トランスポーターが重要な機能を担うと考えられることから、抗癌剤治療後の残存膵癌組織等を用いた解析を行い、ヒト膵癌幹細胞において発現するトランスポーターの同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) ゲムシタビンに治療抵抗性を示す膵癌幹細胞の特性解析

抗癌剤治療後の残存膵癌組織中には、膵癌幹細胞が高頻度に残存していると考えられる。そこで、これらの膵癌組織を対象とした組織解析を実施し、残存する癌幹細胞の特性解析を行う。既存の癌幹細胞マーカー (CD133、CD44 等) の発現を指標として、細胞動態を解析し、以後の実験に用いる検体の検証を行う。

(2) プロテオーム解析に基づく膵癌幹細胞特異的なトランスポーターの包括的抽出

膵癌幹細胞が高頻度に残存する検体、および対照群となる検体について、定量精度の高いプロテオーム解析を包括的に実施する。これにより、膵癌幹細胞において発現する候補トランスポーターの抽出をすすめる。

(3) 臨床検体を用いた候補トランスポーターの発現検証

プロテオーム解析により抽出された候補トランスポーターの発現を、ヒト膵癌検体を用いて検証し、発現や局在を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ゲムシタビンに治療抵抗性を示す膵癌幹細胞の特性解析

術前にゲムシタビンおよび放射線治療を受けた膵癌患者の手術摘出検体の一部を用いて、既知癌幹細胞マーカーの発現を検証した。その結果、EpCAM を発現する膵癌細胞において、CD133 と CD44 の発現が高頻度に観察された (図 1)。さらに、これらの細胞はアポトーシスに耐性を示す傾向にあることが明らかとなった。

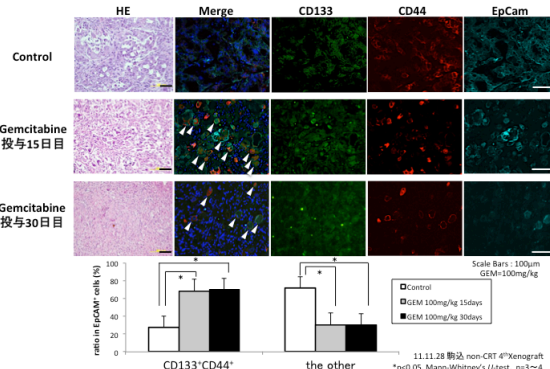


図 1 ゲムシタビン投与後に残存した膵癌組織における CD133+ CD44+ EpCAM+細胞の存在

(2) プロテオーム解析に基づく膵癌幹細胞特異的なトランスポーターの包括的抽出

トランスポーターの発現は mRNA レベルと蛋白質レベルで乖離するとされている (図 2)。

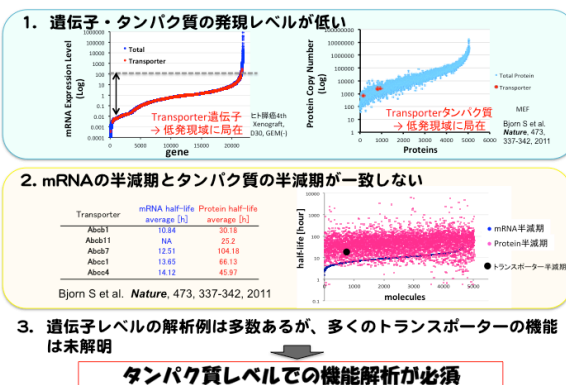


図 2 膵癌幹細胞の抗癌剤耐性に関わるトランスポーターの機能解析において想定される問題

Sekine K, Takebe T, Ueno Y et al.,
Evidence of a sophisticatedly
heterogeneous population of human
umbilical vein endothelial cells.
Transplant Proc. 査読有り 46(4):
1251-3, 2014.
doi: 10.1016/j.transproceed.2013.
11.077.

- ⑦ Tsuchida T, Zheng YW, Zhang RR, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H. The development of humanized liver with Rag1 knockout rats. Transplant Proc. 査読有り 46(4):1191-3, 2014.
doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.026.
- ⑧ Zheng YW, Tsuchida T, Shimao T, Li B, Takebe T, Zhang RR, Ueno Y, Taniguchi H et al. The CD133+CD44+ precancerous subpopulation of oval cells is a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. Stem Cells Dev. 査読有り 15:23(18):2237-49, 2014.
doi: 10.1089/scd.2013.0577.
- ⑨ Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Ueno Y, Taniguchi H et al., Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, Nature, 査読有り 499:481-484, 2013.
doi: 10.1038/nature12271.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 佐藤準也、奥田諒、濱中香織、高橋正希、関根圭輔、上野康晴、谷口英樹、膵癌の微小環境を有する膵癌オルガノイドの創出、第 15 回日本再生医療学会総会、口頭発表、2016 年 3 月 17 日、大阪国際会議場、大阪
- ② 濱中香織、上野康晴、奥田諒、倉田昌直、宮城洋平、谷口英樹ら、ヒト膵癌オルガノイドを用いた新規薬剤評価系の構築、第 74 回日本癌学会学術総会、ポスター、2015 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場、愛知
- ③ Nie YZ, Zheng YW, Zhang RR, Tsuchida T, Ueno Y, Sekine K, Takebe T, Taniguchi H: A novel system with human liver features for screening anti-hepatitis B virus Therapeutics. 第 14 回日本再生医療学会総会 ポスタ

ー Mar.19-21, 2015 パシフィコ横浜、神奈川

- ④ 久松大介、奥田諒、関根圭輔、濱中香織、上野康晴、谷口英樹：スフィア形成能を有する膵癌幹細胞の解析 第 73 回日本癌学会学術総会 口頭 Sep.25-27, 2014 パシフィコ横浜、神奈川
- ⑤ 星野小百合、関根圭輔、寺崎哲也、森永総一郎、宮城洋平、上野康晴、谷口英樹ら：ヒト膵癌幹細胞における治療抵抗性機構の解析 第 72 回日本癌学会学術総会 ポスター Oct.3-5,2013 パシフィコ横浜、神奈川
- ⑥ 中田晋、上野康晴、小池博之、関根圭輔、谷口英樹：マウス胎仔肝幹細胞から成体肝細胞への分化に伴い抑制性ヒストン修飾の局在と標的遺伝子が大きく変化する 第 72 回日本癌学会学術総会 ポスター Oct.3-5,2013 パシフィコ横浜、神奈川
- ⑦ Ueno Y, Hoshino S, Tsuchida N, Nakata S, Uchida Y, Sekine K, Taniguchi H et al. Targeted proteomic absolute quantification on transporters of human pancreatic cancer cells with gemcitabine- resistance. HUP0 12th annual world congress. Yokohama, Japan, Sep 14-18, 2013 パシフィコ横浜、神奈川

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~sais ei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 康晴 (UENO, Yasuharu)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：60375235

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()
研究者番号 :