

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670586

研究課題名(和文)膵癌微小環境のリモデリングによる膵癌治療抵抗性への新規戦略

研究課題名(英文)A new strategy for improving the efficacy of the conventional therapy of pancreatic cancer by remodeling its microenvironment

研究代表者

田中 雅夫(TANAKA, Masao)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30163570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変膵癌発生モデルマウスを作製し、膵癌同所移植マウスとは異なり、前癌病変である膵管上皮内腫瘍性病変や、間質における線維増生を認め、ヒト膵癌組織に類似した病理組織像を呈することを確認した。

インテグリン α v は膵癌間質に高発現しており、膵星細胞におけるインテグリン α v の発現を抑制したところ、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質の産生が低下し、また、PDGF-A などの癌間質相互作用に関係する因子や線維化促進作用をもつ増殖因子の発現が低下した。膵癌細胞株と膵星細胞をマウスの皮下に共移植すると、対照群に比べて膵星細胞のインテグリン α v ノックダウン群で腫瘍径が減少する傾向にあった。

研究成果の概要(英文)：In genetically engineered mouse model of pancreatic cancer, the histopathological findings, including pancreatic intraepithelial neoplasia and a lot of fibrous tissue in the tumor stroma, were similar to those of human.

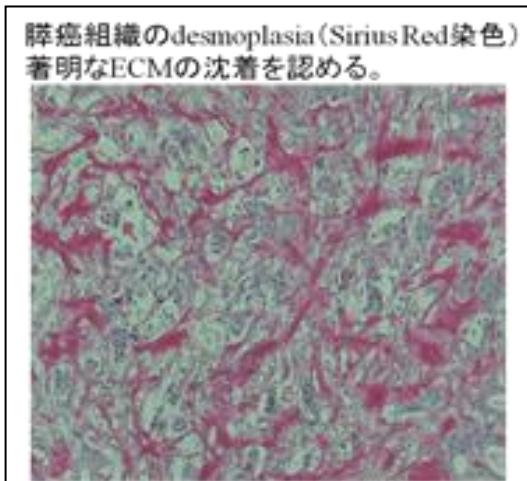
Integrin α v was widely expressed in the stroma of pancreatic cancer. Knockdown of integrin α v in pancreatic stellate cells decreased the production of extracellular matrix such as collagen and fibronectin. PDGFA, a growth factor related to cancer-stromal interaction, and CTGF, a profibrotic growth factor, were also down-regulated by knockdown of integrin α v. When pancreatic cancer cells and pancreatic stellate cells were co-transplanted subcutaneously into nude mice, knockdown of integrin α v in pancreatic stellate cells decreased the tumor growth as compared with the control.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 膵星細胞 癌微小環境 リモデリング

1. 研究開始当初の背景

膵癌はわが国において癌死の5位を占め、現在でも100人中3人しか根治しない疾患で、膵癌の治療法/診断法の開発は社会的緊急性・重要度が高い。しかし他の消化器癌と異なり、その5年生存率はここ30年間でほとんど改善がない。現在、治癒切除が唯一の根治治療であるが、80%の患者は進行癌で既に切除不能である。そのため、化学療法、放射線療法を主軸とした集学的治療が行われるが、他の消化器癌に比較してその治療効果も乏しいと言わざるを得ない状況である。近年、膵癌が様々な治療に抵抗性を示す一因として、腫瘍細胞とその周囲に存在する様々な間質細胞や間質細胞に産生される細胞外基質による癌間質相互作用に注目が集まっている。特に、膵癌は豊富な細胞外基質を伴うdesmoplasiaが病理学的な特徴とされており、desmoplasiaが癌細胞の刺激により活性化された線維芽細胞様の膵星細胞(activated PSCs)より形成される事が報告された(Gastroenterology, 2005, Bachem. 下図参照)。我々はこれまでに膵癌における癌細胞



と間質細胞における癌間質相互作用の検討を進め、膵由来間質細胞や膵星細胞が、膵癌の放射線耐性や、膵癌の浸潤能促進を増強することを明らかにした(Cancer Res., 2004, K Ohuchida, Gastroenterology, 2010, N Ikenaga)。しかし、近年、膵癌組織内の癌特有の微小環境が治療抵抗性に大きく関与していることが着目されるようになってきている。例えば、膵癌間質には、細胞外基質(ECM)が圧倒的優位な割合で存在しているが、このECMの著明な沈着が進むにつれ、癌組織内の新生血管密度が減少し、乏血性組織を形成することが報告されている。微小環境中の新生血管の減少は、抗癌剤の薬剤伝達効率の低下につながり、膵癌の治療抵抗性を引き起こす(Science, 2009, Olive)。また、膵癌微小環境の他の特徴として、その組織内圧の上昇が指摘されている。著明なECMの沈着により、組織内圧の上昇が誘導され、血管内からの抗癌剤などの治療分子の拡散が抑制される。これにより抗癌剤の薬剤伝達効率の低下

が誘起され、治療抵抗性を呈する(Cancer Cell, 2012, Provenzano)。また、ECM沈着自体が物理的障壁となり、薬剤の微小環境内での拡散を抑制していることも指摘されている(Nature Reviews, 2006, Minchinton)。

2. 研究の目的

膵癌微小環境形成の過程とその生理的物性的特徴を明らかにし、膵癌微小環境を改変する(リモデリング)ことにより膵癌を制御する画期的な膵癌治療戦略を開発する。

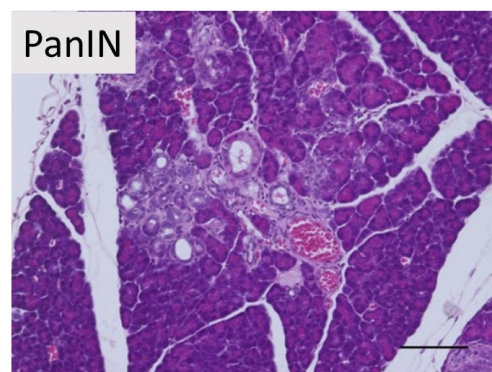
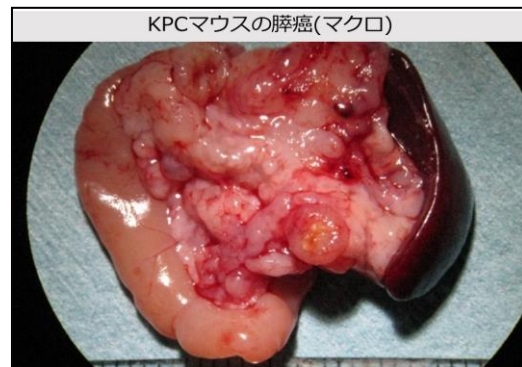
3. 研究の方法

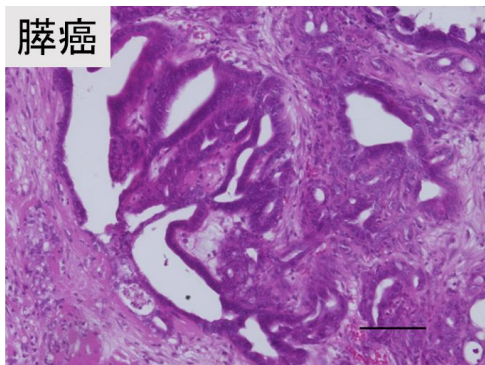
(1) 遺伝子改変膵癌発生モデルマウスを用いた膵癌微小環境の詳細な検討:
KPCマウス(Pdx1-Cre; LSL-KrasG12D/+; LSL-Trp53R172H/+)を作成し、その発癌の過程と組織像について検討する。

(2) 膵癌における線維増生責任細胞の同定:
肝の線維化に重要な因子であるインテグリン αv に着目し、膵癌間質における発現と機能について検討する。

4. 研究成果

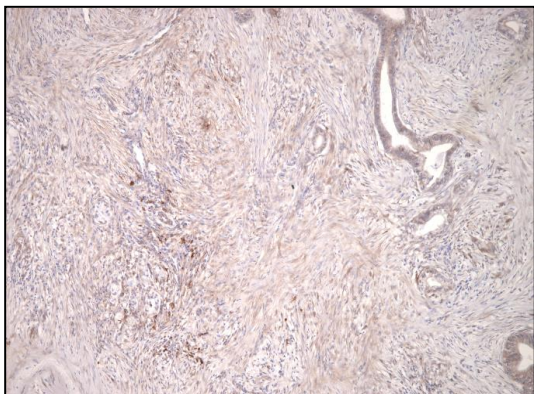
(1) 発癌や癌の進展における各段階の詳細な癌微小環境の検討のため、我々は遺伝子改変膵癌発生モデルマウスの作成を進め、その詳細な解析を進めた。同マウスは、膵癌同所移植マウスとは異なり、前癌病変である膵管上皮内腫瘍性病変や、間質における線維増生を認め、ヒト膵癌組織に類似した病理組織像を認めることを確認した(下図)。





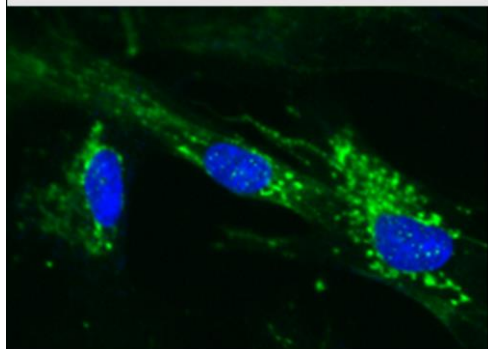
(2)インテグリン αv は、フィブロネクチン、フィブリノゲン、ビトロネクチン、トロンボスポンジン、von Willebrand 因子、ラミニン、MMP-2 など様々な細胞外マトリクスの受容体として働き、細胞接着や細胞遊走などに関与している。最近、マウスの肝線維化モデルにおいて、肝星細胞におけるインテグリン αv 発現が肝線維化において重要な役割を果たしていることが報告された。我々は、膵癌の豊富な間質増生(desmoplasia)における主体としての膵星細胞において、インテグリン αv が間質リモデリング制御の標的となりうるかについて検討した。

ヒト膵癌組織における免疫組織化学染色では、インテグリン αv は膵癌間質に高発現していた(下図)。



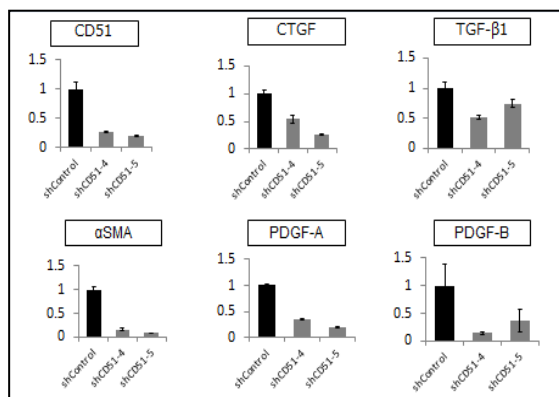
樹立した膵星細胞におけるインテグリン αv の発現(下図)をレンチウイルスベクターを

膵星細胞におけるインテグリン αv の発現



用いたshRNAによって抑制したところ、細胞外基質であるコラーゲン I やフィブロネクチン

の産生が低下し、さらにPDGF-Aなどの癌間質相互作用に関係する因子や線維化促進作用をもつ増殖因子の発現が低下することが分かった(下図)。マウスの皮下移植モデル実験では



膵癌細胞株と膵星細胞との共移植において、対照群に比べて膵星細胞のインテグリン αv ノックダウン群で腫瘍径が減少する傾向にあった。

これらの結果は、膵星細胞におけるインテグリン αv が間質増生と膵癌の悪性度増強という2つの事象に関与していることを示すものであり、インテグリン αv を標的とした間質のリモデリングを介した膵癌治療へとつながる重要な知見と考えられる。

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 4 件) すべて査読あり

- ① 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*, 45(1):113-120, 2014, DOI: 10.3892/ijo.2014.2391
- 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):1283-1290, 2013, DOI: 10.1097/MPA.0b013e318293e7bd
- ③ Shindo K, Aishima S, Ohuchida K, Fujiwara K, Fujino M, Mizuuchi Y, Hattori M, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y, Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive

ductal carcinoma of the pancreas, Mol Cancer, 12(1):168, 2013, DOI:10.1186/1476-4598-12-168

- ④ 大内田研宙、大塚隆生、水元一博、田中雅夫，【胆道癌、膵癌に対する個別化治療の新展開】腫瘍内 heterogeneity に着目した膵癌個別化治療の可能性－腫瘍個別化から細胞個別化へ－，胆と膵，34(2):165-169, 2013

[学会発表] (計 10 件)

- ① 藤原謙次、大内田研宙、赤川進、大塚隆夫、高畑俊二、水元一博、田中雅夫，膵癌細胞からの作用により膵星細胞中の NPAS1 が増加する，第 45 回日本膵臓学会大会，2014/7/11-12，福岡県北九州市
- ② 鄭彪、大内田研宙、崔林、水内祐介、藤原謙次、赤川進、堀岡宏平、田中友晴、佐田政史、仲田興平、前山良、大塚隆生、小田義直、水元一博、田中雅夫，膵癌関連繊維芽細胞における CD146 発現と膵がんの進展抑制，第 45 回日本膵臓学会大会，2014/7/11-12，福岡県北九州市
- ③ 田中友晴、大内田研宙、水元一博、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、佐田政史、堀岡宏平、鄭彪、赤川進、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、大塚隆生、田中雅夫，トラニラストによる膵星細胞の抑制についての検討，第 114 回日本外科学会定期学術集会，2014/4/3-5，京都府京都市
- ④ 佐田政史、大内田研宙、堀岡宏平、田中友晴、鄭彪、Cases AI、赤川進、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、大塚隆生、高畑俊二、水元一博、田中雅夫，膵癌間質の線維配列が癌細胞の形態と浸潤方向に与える影響，第 114 回日本外科学会定期学術集会，2014/4/3-5，京都府京都市
- ⑤ 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、寅田信博、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、水元一博、田中雅夫，膵癌の肝転移・腹膜播種巣における癌関連繊維芽細胞の機能解析，第 114 回日本外科学会定期学術集会，2014/4/3-5，京都府京都市
- ⑥ Sada M, Ohuchida K, Fujiwara K, Horioka K, Tanaka T, Zheng B, Cases AI, Akagawa S, Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M, Clinical significance of stromal CD90 and alpha-SMA expression in pancreatic

cancer, Ammerican Pancreatic Association 44th Annual Meeting, 2013/10/30-11/2, Miami (United States of America)

- ⑦ Kozono S, Ohuchida K, Ikenaga N, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M, The development of pancreatic cancer therapy based on regulating pancreatic cancer desmoplasia by targeting pancreatic Stellate Cells, International Pancreatic Research Forum 2013, 2013/7/27, Sendai (Japan)
- ⑧ Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M, Regulation of Pancreatic Stellate cells for Treatment of Pancreatic cancer, The 6th International Conference and Commemorative Lecture of Pin-Wen Lin of Pancreatic Cancer, 2013/6/15, Tainan (Taiwan)
- ⑨ 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、寅田信博、江口大樹、藤原謙次、小藺真吾、崔林、池永直樹、水元一博、田中雅夫，腹膜繊維芽細胞の作用に着目した膵癌腹膜播種メカニズムの解明，第 113 回日本外科学会定期学術集会，2013/4/11-13，福岡県福岡市
- ⑩ 佐田政史、大内田研宙、藤原謙次、赤川進、江口大樹、小藺真吾、趙茗、崔林、大塚隆生、水元一博、田中雅夫，膵癌間質における CD90 と α -SMA 発現の意義，第 113 回日本外科学会定期学術集会，2013/4/11-13，福岡県福岡市

[図書] (計 1 件)

- ① 佐田政史、水元一博、大内田研宙、大塚隆生、田中雅夫，Annual Review 2014 消化器，2014，252-257

[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

田中 雅夫 (TANAKA Masao)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：30163570

(2) 研究分担者

高畑 俊一 (TAKAHATA Shunichi)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：50437779

上田 純二 (UEDA Junji)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：90529801

真鍋 達也 (MANABE Tatsuya)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：60546464

白羽根 健吾 (SHIRAHANE Kengo)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10529803

大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20452708
(2014年)

(3) 連携研究者

なし