

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861198

研究課題名(和文) 膵癌腹膜播種を誘導する特異的間質細胞の同定および膵癌新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapies that focus on specific stroma cell induced peritoneal dissemination of pancreatic cancer

研究代表者

森山 大樹 (MORIYAMA, Taiki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70586859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌腹膜播種巣から筋線維芽細胞を樹立し、膵癌細胞株との相互作用を検討した。筋線維芽細胞は膵癌細胞株の遊走能・浸潤能を有意に亢進させた(in vitro)($P < 0.05$)。マウス腹腔内移植モデルにおいて、膵癌細胞 + hPMFs共移植群は膵癌細胞単独移植群と比較して、有意に腹膜播種形成を認めた。膵癌腹膜播種形成における癌間質相互作用が、腹膜播種を抑制するための新たな治療標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to assess the role of myofibroblasts at peritoneally disseminated sites of pancreatic cancer. Human peritoneal myofibroblasts (hPMFs) were established from disseminated sites of pancreatic cancer and their interactions with the SUIT-2 and CAPAN-1 human pancreatic cancer cell lines were analyzed in vitro and in vivo. In vitro, hPMFs significantly promoted the migration and invasion of pancreatic cancer cells ($P < 0.05$), while the cancer cells significantly promoted the migration and invasion of hPMFs ($P < 0.05$). In vivo, the number of peritoneally disseminated nodules was significantly greater in mice implanted with cancer cells plus hPMFs compared to mice implanted with cancer cells alone.

hPMFs promote the peritoneal dissemination of pancreatic cancer. The cancer-stromal cell interaction in the peritoneal cavity may be a new therapeutic target to prevent the dissemination of pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 筋線維芽細胞 腹膜播種 癌間質相互作用

1. 研究開始当初の背景

膵癌はいまだ予後不良であり、切除不能膵癌の多くの症例において、遠隔転移および腹膜播種が認められる。

膵癌は間質細胞が多くを占める **Desmoplasia** を病理学的特徴とする。近年、癌細胞と間質の細胞が相互に作用しその悪性度を増す癌間質相互作用が報告され (Nature, 2004, Bhowmick)、その研究が世界的に進められている。また、膵間質に存在する膵星細胞 (human Pancreatic Stellate Cells: hPSCs) が同定され、hPSCs が種々の液性因子の分泌を介し膵線維化に関与することが明らかになった (J Clin Invest, 2007, Omary)。近年、膵癌原発巣でニッチと考えられる膵星細胞 (hPSCs) は骨髄由来の細胞であると報告された (Gut, 2008, Marrache)。ニッチとは癌細胞浸潤の先導役として共に移動し浸潤を促進する役割を担う間質細胞のことを称し、扁平上皮癌においても報告されている (Nature Cell Biol, 2007, Gaggioli)。また、近年提唱されている新しい概念として間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) と呼ばれる細胞がある。この細胞は骨髄に存在し、間葉系組織への分化能を有する細胞であると定義され、今後の再生医療への応用が強く期待され世界的に研究が進められている。最近、骨髄由来間葉系幹細胞が膵癌の増殖・浸潤に関与し (Br J Cancer, 2008, Beckermann)、転移巣においてもニッチとして癌細胞の増殖を支持する (Nature, 2007, Karnoub) という報告がなされた。

2. 研究の目的

現在までに、膵癌原発巣においては膵間質に存在する膵星細胞 (hPSCs) が癌細胞によって hPSCs 自体の浸潤能や増殖能が増すことは証明されていた (Langenbecks Arch Surg, 2008, Bachem)。しかし、膵癌腹膜播種巣や肝転移巣においては同様の検討が現在までなされておらず、本申請者は hPSCs を誘導する間葉系幹細胞が膵癌細胞浸潤の先導役として働き、原発巣での **desmoplasia** 形成のみならず遠隔臓器での微小転移巣形成および腹膜播種形成にも関与しているのではと考え、本研究を立案した。

本研究では、膵癌の腹膜播種巣における筋線維芽細胞の作用を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) ヒト腹膜筋線維芽細胞 (human peritoneal myofibroblasts; hPMFs) の樹立
膵癌腹膜播種結節からアウトグロース法を用いて筋線維芽細胞を樹立し、免疫組織化学染色、蛍光免疫染色で評価を行った。

(2) ヒト膵癌細胞と hPMFs の相互作用の評価 (in vitro)

hPMF との間接共培養下での膵癌細胞株 (SUIT-2, CAPAN-1) の浸潤能、遊走能を検

討した。浸潤能はマトリゲルを敷いたトランスウェルチャンバーの上に膵癌細胞を撒き、トランスウェルチャンバー下に浸潤した細胞数で評価した。遊走能は、マトリゲルを用いないトランスウェルチャンバーを用いて同様に行った。

(3) ヒト膵癌細胞 (SUIT-2) と hPMFs の相互作用の評価 (in vivo)

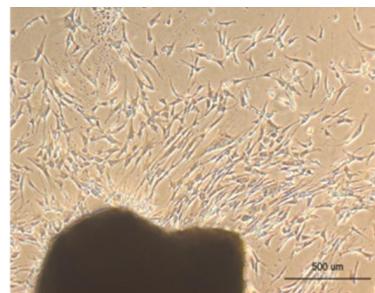
マウス腹腔内移植モデルにおける、膵癌細胞単独移植群と膵癌細胞+hPMFs 共移植群の腹膜播種結節数の比較を行った。

(4) ノードマウス膵癌腹膜播種巣における、腹膜線維芽細胞 (hPFs) の存在の証明 (in vivo)

GFP を標識した hPFs を、膵癌細胞株とともにマウス膵に同所共移植し、播種形成した結節に GFP が発現しているかどうかを実体顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) ヒト膵癌腹膜播種結節から、アウトグロース法にて筋線維芽細胞を樹立した (図1)。病理所見では紡錘形で α -SMA 陽性な細胞を認めた (図2)。蛍光免疫染色で、 α -SMA、Vimentin 陽性であり、活性化された筋線維芽細胞であることを確認した (図3)。



播種結節

図1：腹膜播種結節からアウトグロース法を用いて筋線維芽細胞を樹立した。

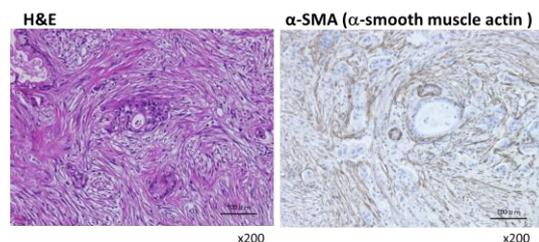


図2：ヒト腹膜播種結節の病理像
膵癌周囲に紡錘形で α -SMA 陽性な筋線維芽細胞を認めた。

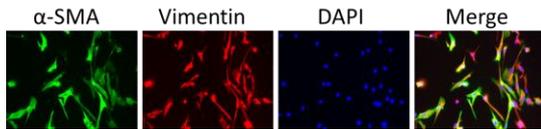


図3：蛍光免疫染色でα-SMA、Vimentin陽性で、活性化された筋線維芽細胞であることを確認した。

(2) hPMF との間接共培養下において、膵癌細胞株(SUIT-2,CAPAN-1)の遊走能(図4)、浸潤能(図5)は有意に亢進した。

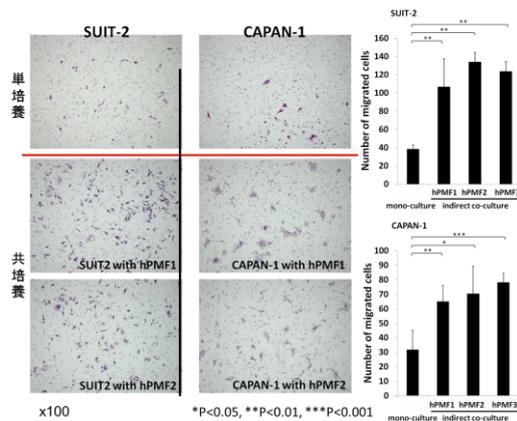


図4：hPMF との間接共培養下において膵癌細胞株の遊走能は亢進した。

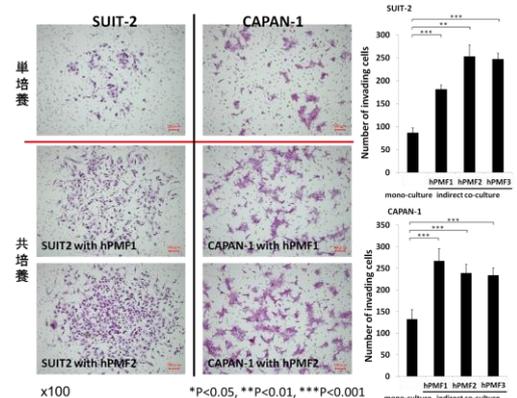


図5：hPMF との間接共培養下において膵癌細胞株の浸潤能は亢進した。

(3) マウス腹腔内移植モデルにおいて、膵癌細胞+hPMFs 共移植群において癌細胞単独移植群と比較して、有意に腹膜播種形成を認めた。

SUIT-2腹膜播種モデル

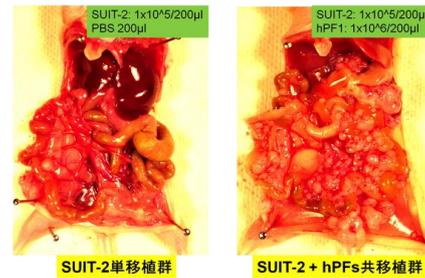


図6：膵癌細胞+hPMFs 共移植群で有意に腹膜播種形成を認めた。

(4) GFP で標識した hPMF と膵癌細胞をマウス腹腔内に共移植した実験では、腹膜播種結節の一部で GFP の発現が認められた(図7)。腹膜播種結節の一部には hPMF が生着している事が確認された。

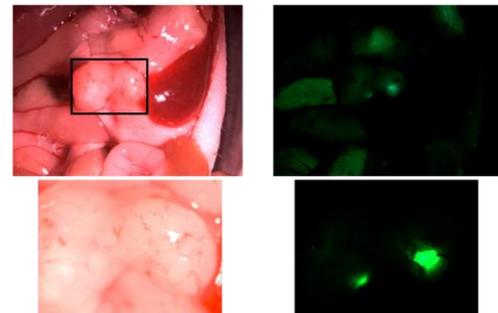


図7：マウス腹膜播種結節で GFP 発現を認めた。

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 1 件)

- 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*, 査読有, 45, 2014, 113-120. DOI: 10.3892/ijo.2014.2391

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 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線維芽細胞の機能解析, 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014/4/4, 京都市

② 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、腹膜線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，福岡市

③ Akagawa S, Ohuchida K, Torada N, Eguchi D, Kozono S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M, Comparisons of Characteristics of Peritoneal Fibroblasts in Dissemination with those of Mesothelial Cells and Pancreatic Stellate, American Pancreatic Association, 44th Annual Meeting , 2013/10/30, Miami

〔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

森山 大樹 (MORIYAMA Taiki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：70586859

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし