

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462059

研究課題名(和文) ヒト膵癌幹細胞とES/iPS細胞を使った微小環境構築に関する研究

研究課題名(英文) Reconstruction of pancreatic cancer microenvironment

研究代表者

清水 一也 (SHIMIZU, KAZUYA)

神戸大学・保健学研究科・保健学研究員

研究者番号：50335353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌は、5年生存率が7.7%と極めて予後が不良である。本研究では我々が樹立したマウスや患者由来の癌幹細胞株を使って、マウスES細胞やヒトiPS細胞との共培養系を樹立し、微小環境を構築する新規性・独創性の高い研究をおこなった。その結果、*in vitro*や*in vivo*においてstemセルが神経系細胞に分化誘導されることが明らかになった。微小環境を標的とする治療法の開発につながる重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer shows an aggressive phenotype with a dismal prognosis despite of multimodal therapy. Notably, neural invasion is a life-threatening problem. In this study, we aimed to reconstruct microenvironment around pancreatic cancer cells. First, we developed novel mouse pancreatic cancer stem cells by introducing mutated KRAS, mutated p53, and CDK4 oncogenes common in human pancreatic cancer to mouse pancreatic stem/progenitor cells. Then, we established co-culture system between multipotent stem cells and pancreatic cancer cells. We found that both mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells could differentiate into neural cells such as neuron or glia cells *in vitro* and *in vivo*. These results indicate that this system might be potent tool to develop novel treatment strategy for pancreatic cancer.

研究分野：膵臓外科学

キーワード：膵臓がん がん幹細胞 胚性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

手術治療、化学療法、放射線療法による集学的治療の進歩にも関わらず、膵臓がんは癌死亡率の第5位にあり、最新の5年生存率でも7.7%とがんの中で最も悪い。死亡率や死亡数は依然増加傾向にある。遠隔転移や癌性腹膜炎を伴った膵癌患者には Gemcitabine や TS-1 を用いた抗がん剤治療が行われるが、5年生存率は0%である。また根治手術を行った場合でも5年生存率は20%には及ばない。最近、癌組織にも幹細胞の存在が報告されており、様々な癌組織の幹細胞が同定されつつあり、癌幹細胞を標的とした新たな治療法開発が注視されている。われわれはこれまでに幹細胞マーカーCD133を指標にして正常の組織幹細胞を同定した^[1]。また、我々は進行膵がん患者から20種類の膵癌幹細胞株を樹立し、CD133が癌幹細胞マーカーとなりうることを明らかにした^[2]。一方、がん細胞そのものとは別に、微小環境を標的とした治療戦略にも注目が集まっている。膵がんの特徴である間質形成、高率に起こる神経浸潤、早期に起こる肝転移を制御することは結果として膵がんの予後を改善する可能性が高い。

[1] Hori Y, Fukumoto M, Kuroda Y. Enrichment of putative pancreatic progenitor cells from mice by sorting for prominin1 (CD133) and PDGFR-b. *Stem Cells*. 26: 2912-2920, 2008.

[2] Shimizu K, Chiba S, Hori Y. Identification of a novel subpopulation of tumor-initiating cells from gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *PLoS One* e81283, 2013

2. 研究の目的

本研究では、我々が樹立した初代ヒト膵癌幹細胞株やマウス膵癌幹細胞株を使って微小環境を再構築し、がん細胞の増殖機構を分子レベルで解明し、新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス人工膵癌幹細胞の作成

微小環境の構築には免疫担当細胞の関与も不可欠であるため、従来の免疫不全マウスの利用では困難があった。そこで、syngenicなモデルを作成するために、マウスのCD133陽性 stem/progenitor 細胞にヒト膵癌に特徴的な変異型 KRAS、変異型 p53、CDK4 を遺伝子導入してマウス人工膵癌幹細胞を作成した。さらに、その特性を解析した。

(2) マウス人工膵癌幹細胞とマウス embryonic stem (ES)細胞との共培養系の樹立

マウス人工膵癌幹細胞には GFP、マウス ES 細胞には RFP が恒常的にラベルされ

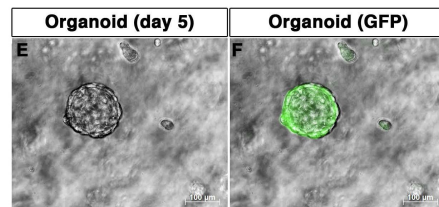
ているのでこれを指標にして in vitro や in vivo において様々な条件で培養を行い、互いの細胞が混在する培養系を確立した。

4. 研究成果

(1) マウス人工膵癌幹細胞の作成

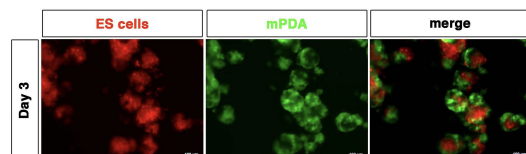
今回、我々が樹立したマウス人工膵癌幹細胞は parental のマウス CD133 陽性 stem/progenitor 細胞と同様に幹細胞マーカーである CD133 や膵臓の初期発生に必須の Pdx-1 を発現保持していることがわかったのでこの細胞も幹細胞としての特性(自己複製能とヘテロな腫瘍形成能)をもつ可能性が示唆された。実際に、cell sorting した CD133 陽性細胞から in vitro や in vivo で CD133 陰性細胞が出現することからも確認された。

(2) マウス人工膵癌幹細胞の特性解析



マウス人工膵癌幹細胞はマトリゲル上で培養すると図のように三次元構造をとり、アルシアンブルー染色を行うと粘液の産生を確認できた。また、同所性(膵臓)移植、異所性(皮下)移植すると腫瘍形成を認め、組織染色ではヒト膵癌と同様 ductal adenocarcinoma 様の組織像を呈した。さらに、抗がん剤ゲムシタピンに対する感受性実験で in vivo で形成した皮下腫瘍の腫瘍抑制効果を示した。また、脾臓からの直接注入では肝臓や肺への転移を肉眼的に確認した(論文作成中)。

(3) マウス人工膵癌幹細胞とマウス embryonic stem (ES)細胞との共培養系の樹立



図のように in vitro でマウス人工膵癌幹細胞(mPDAC)(緑色)とマウス ES 細胞(赤色)が混在する sphere を形成する条件を確立した。膵癌細胞との相互作用の結果、マウス ES 細胞がどのような細胞に分化するのかを免疫組織学的に解析した予備実験の結果、TJ1, S100b といった神経系への分化誘導を認めた。これらの結果は、in vivo においても確認された(論文作成中)。この結果から、現在はヒト膵癌幹細胞株とヒト iPS 細胞の

共培養系の樹立へと研究を進展させている。

本研究結果から、全く新しい癌細胞の微小環境の再構築モデルができたと言える。類似の研究はこれまでになく、極めて独創的である。この成果が発展すれば、微小環境を標的とした創薬研究へと繋がり、難治性の膵臓がんの予後を改善することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Shimizu K, Nishiyama T, Hori Y. Gemcitabine enhances Kras-MEK-induced matrix metalloproteinase-10 expression via histone acetylation in gemcitabine-resistant pancreatic tumor-initiating cells. *Pancreas* 査読有 46: 268-275, 2017
Shinozaki K, Ajiki T, Murakami S, Matsumoto T, Akita M, Shimizu K, Hori Y. Novel cell line and animal model for human biliary tract cancer. *Internal Medicine Review* 査読有 1-6, 2016

〔学会発表〕(計14件)

堀裕二、癌遺伝子導入した膵臓組織幹細胞は tumor-initiating cell としての表現型を示す、第14回日本消化器外科学会、2016.11.3、神戸国際会議場(兵庫県)
Kojima N, Miyoshi M, Nishiyama S, Tsuchida Y, Hori Y. Gemcitabine Enhances Kras-MEK-induced matrix metalloproteinase-10 expression in gemcitabine-resistant pancreatic tumor-initiating cells. 第75回日本癌学会、2016.10.7、パシフィコ横浜(神奈川県)
Osaka S, Miyoshi M, Nishiyama S, Tsuchida Y, Kojima N, Hori Y. Pancreatic ductal adenocarcinoma primes the adjacent normal ducts to a precancerous phenotype. 第75回日本癌学会、2016.10.7、パシフィコ横浜(神奈川県)
井瀬悠希、清水一也、上野山恭平、西山悟史、土田悠加、堀裕二、癌遺伝子を導入した膵臓組織幹細胞は、癌幹細胞様の表現型を示す、第47回日本膵臓学会大会、2016.8.4 仙台国際会議場(宮城県)
西山悟史、清水一也、上野山恭平、井瀬悠希、土田悠加、堀裕二、膵腫瘍は隣接する正常膵管に異型性を誘導する、第47回日本膵臓学会大会、2016.8.4 仙

国際会議場(宮城県)
土田悠加、清水一也、上野山恭平、井瀬悠希、西山悟史、堀裕二、膵癌細胞においてゲムシタピンは Kras シグナル依存性に MMP-10 の発現を増強する、第47回日本膵臓学会大会、2016.8.4 仙台国際会議場(宮城県)
堀裕二、膵腫瘍は隣接する正常膵管に異型性を誘導する、第116回日本外科学会、2016.4.16 大阪国際会議場(大阪府)
Tsuchida Y, Nishiyama T, Nishiyama S, Hori Y. Novel therapeutic approach for gemcitabine-resistant human pancreatic cancer. 第74回日本癌学会、2015.10.8、名古屋国際会議場(愛知県)
Nishiyama S, Nishiyama T, Tsuchida Y, Hori Y. Interaction between laminin and Notch pathway in the microenvironment of pancreatic cancer cells. 第74回日本癌学会、2015.10.8、名古屋国際会議場(愛知県)
上野山恭平、清水一也、井瀬悠希、山崎千寛、西山嵩晃、西山悟史、土田悠加、堀裕二、膵腫瘍は隣接する正常膵管に異型性を誘導する、第47回日本臨床分子形態学会、2015.9.18、長崎大学(長崎県)
西山嵩晃、清水一也、井瀬悠希、上野山恭平、山崎千寛、西山悟史、土田悠加、堀裕二、がん遺伝子を導入した膵臓組織幹細胞はがん幹細胞様の表現型を示す、第47回日本臨床分子形態学会、2015.9.18、長崎大学(長崎県)
Yamasaki C, Shimizu K, Uenoyama K, Nishiyama T, Hori Y. Insulin-producing cells derived from the immortalized pancreatic stem cells. 第19回 International Association of Pancreatology、2015.8.27、Shanghai (China)
Uenoyama K, Shimizu K, Nishiyama T, Yamasaki C, Hori Y. Pancreatic ductal adenocarcinoma primes the adjacent normal ducts for a precancerous phenotype. 第19回 International Association of Pancreatology、2015.8.27、Shanghai (China)
Nishiyama T, Shimizu K, Uenoyama K, Yamasaki C, Hori Y. Oncogene-mediated mouse pancreatic stem cell shows pancreatic cancer stem cell phenotype 第19回 International Association of Pancreatology、2015.8.27、Shanghai (China)

〔図書〕(計1件)

堀裕一、南光堂、新膵臓病学、402-404、2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 一也 (SHIMIZU, Kazuya)
神戸大学・保健学研究科・保健学研究员
研究者番号：50335353

(2)研究分担者

堀 裕一 (HORI, Yuichi)
神戸大学・保健学研究科・教授
研究者番号：80248004