

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870388

研究課題名(和文)膵がん及び間葉系幹細胞、膵がん特異的タンパク質を標的とした膵がん早期診断法の開発

研究課題名(英文)Development of molecular imaging of pancreatic cancer by targeting cancer stem cell, mesenchymal stem cell or cancer-specific proteins

研究代表者

堤 康一郎 (TSUTSUMI, KOICHIRO)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40610910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵がん早期診断法の開発を目的として、膵がん幹細胞、間葉系幹細胞、膵がん特異的タンパク質をターゲットとしたイメージングの可能性を検討した。まず、膵がん臨床検体や培養細胞において、plectin-1、14-3-3、lipocalin-2などいくつかのタンパク質は高発現していたが、膵がん幹細胞、間葉系細胞の細胞表面マーカーは低発現であることが分かった。そこでタンパク質のうち、14-3-3 に対するイメージングプローブを作成し、マウス Xenograftモデルでの評価を行ったが、腫瘍集積性は十分でなかった。プローブの標的に対する結合能の評価をふまえた上で、プローブのさらなる改良が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To develop early diagnostic method of pancreatic cancer, we investigated molecular imaging of pancreatic cancer by targeting cancer stem cell, mesenchymal stem cell, or cancer-specific proteins. As a result of analyzing expression of stem cell markers and the proteins in clinical samples and cell lines, some proteins such as plectin-1, 14-3-3 and lipocalin-2 were over-expressed in cancer lesions, while stem cells markers were not expressed enough. Despite of synthesis of a imaging probe targeting 14-3-3 and injection of the probe in the mouse xenograft model, accumulation of the probe to the tumor was not enough for utilizing the imaging. Further evaluation of binding-capacity of the probe to 14-3-3 and creation of a probe with an enhanced capability of accumulation in tumor were needed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵がん イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

膵がんは本邦におけるがん死亡原因の第5位で、年々増加傾向にある。年間約2万5千人が罹患し、死亡数もほぼ同等の極めて予後不良の疾患である。その理由として、有効な治療法に乏しいこと、早期診断が困難であり診断時に既に周囲への浸潤や転移巣が多く存在することがあげられる。当該研究申請者は、切除不能膵がんに対する化学療法施行中の患者の血清中 CA19-9 と SPan-1 を毎月モニタリングすることでその変動率から早期の増悪判定が可能であり、無効な薬剤の早期中止と新たな薬剤の早期導入による2次化学療法導入率向上を図ることで予後改善が期待されることを報告した(Tsutsumi K, et al. Pancreatology. 2012)。しかし日常診療の経験から、早期診断、つまり微小な膵がん原発巣や転移巣の正確な診断を可能とさせる膵がん診断技術の飛躍的進歩が、予後改善に最も効果的かつ急務であるとする。

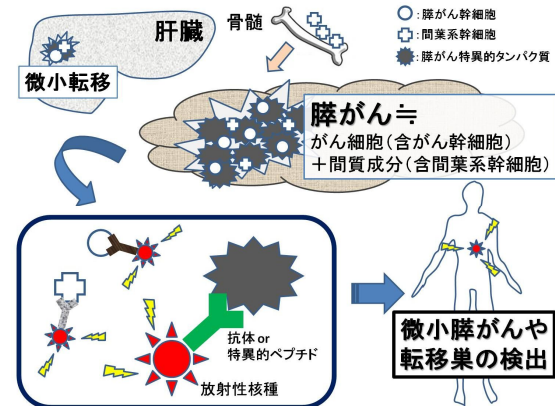
近年、膵がんを含めたがんには自己複製能をもったがん幹細胞が存在するという、いわゆるがん幹細胞説が提唱され、抗がん剤への耐性や再発、転移の原因として考えられている。一方、膵がんは豊富な間質成分を伴う特性があり、がんの浸潤への関与や、骨髄から誘導され転移の初期ステップにも影響するとされる間葉系幹細胞を含むことが明らかにされた。今後、これら幹細胞や間質を標的とした革新的な治療法の開発も期待されている(Hamada S. Shimosegawa T. In: Grippo PJ, Munshi HG, editors. Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment. Trivandrum (India): Transworld Research Network; 2012. Chapter 6.)

## 2. 研究の目的

当該申請研究では、膵がんの根源である膵がん幹細胞や間葉系幹細胞を標的としたイメージングによる膵がんの早期診断および正確な転移巣診断法の確立への基盤開発を行う。膵がん幹細胞のマーカーとして CD44 陽性/CD24 陽性/ESA 陽性、または CD133 陽性(Cancer Res 67:1030-1037, 2007/ Cell Stem Cell 1:313-323, 2007)、間葉系幹細胞のマーカーとして CD105 陽性、CD90 陽性、CD73 陽性などが明らかにされており、これらを発現解析、分子イメージングに用いることとした。

また膵がんに関するプロテオーム解析結果を利用して、膵がん特異的に発現するタンパク質を標的とした高感度または高特異的な PET プローブ創出による早期診断の可能性についても、早急な臨床応用を目指して解明していく。当該申請研究では、これまでに SPECT での報告がある plectin-1 (Clin Cancer Res 17: 302-309, 2011) と galectin-3 に加え、有力候補として calgizzarin (S100A11), stratifin (14-3-3), lipocalin-2, major vault protein (MVP),

gelsolin, caldesmon-1, annexin A2, mesothelin についても検討する。



## 3. 研究の方法

(1) 膵がん幹細胞、間葉系幹細胞特異的マーカー、膵がん特異的タンパク質の in vitro, ex vivo での発現評価による膵がん高感度または高特異的分子の抽出

- ・膵がん幹細胞特異的マーカー：  
CD44v6, CD24, ESA, CD133
- ・間葉系幹細胞特異的マーカー：  
CD105, CD90, CD73
- ・膵がん特異的タンパク質候補：  
plectin-1, galectin-3, S100A11, 14-3-3, lipocalin-2, MVP, gelsolin, caldesmon-1, annexin A2, mesothelin
- ・膵がん培養細胞：  
Panc-1, MIAPaCa2, SUIT-2, KLM-1, T3M4, ASPC-1, BxPC-3
- ・間葉系培養細胞：  
hMSC (タカラバイオ(株))

膵がん培養細胞における発現解析：  
各特異的マーカーの発現を各々の特異的抗体を用いて、Western blotting (WB) と Flow cytometry により解析する。細胞の蛍光免疫染色も行い、Flow cytometry の結果と合わせてマーカーの組み合わせについても検討する。

膵がん臨床検体における発現解析：  
膵がん手術検体を用い、蛍光免疫組織染色を行い、各特異的マーカーの発現頻度、強度、局在について検討する。

膵がんモデルマウスにおける発現解析：  
Nude マウスに膵がん培養細胞を接種して膵がんモデルマウスを作製する。がん組織のマクロでの評価を行うと共に、病理解析、蛍光免疫組織染色を行い、各特異的マーカーの発現強度、局在、共在について検討する。

(2) 抽出した分子を標的とした分子イメージングによる膵がん検出能の解明

膵がん幹細胞および間葉系幹細胞特異的

マーカーを利用したイメージング：

1. の検討から抽出した膵がんを高感度または高特異的なマーカーに対する抗体の蛍光標識プローブを作製し、膵がんモデルマウスを用いて蛍光イメージングを行い、プローブの局在や膵がん検出能を評価する。

膵がん特異的タンパク質を利用したイメージング：

1. の検討から抽出した膵がんを高感度または高特異的なタンパク質に対して特異的に相互作用する SPECT および PET プローブを合成し、膵がんモデルマウスを用いて、それぞれのイメージング法によるプローブの局在や膵がん検出能を評価する。

### (3) 膵がん早期診断、転移診断への応用

2. の検討から膵がん検出能の高いプローブを抽出し、さらに以下の検討を行う。

微小膵がんモデルマウスでの膵がん検出能を評価

膵がん転移モデルマウスでの肝臓や全身への転移検出能を評価

SPECTとPET画像の比較やプローブの組合せ(膵がん幹細胞マーカーと間葉系幹細胞マーカー、複数の膵がん特異的タンパク質など)による感度、特異度向上の可能性を検証

## 4. 研究成果

### (1)

まず膵がん幹細胞、間葉系幹細胞株のマーカーについて、膵がん臨床検体を用いた免疫染色での発現評価を行ったところ、予想に反して、がん部での特異的な発現に乏しく、また特異的に発現していても高発現ではなかった。早期診断を目指したイメージングのターゲットとしては適当ではないと判断した。一方、併行してすすめていた、膵がん細胞株7種と正常膵管上皮細胞株を用いた、WBとFlow cytometryの結果、plectin-1、14-3-3とlipocalin-2が明らかに膵がん細胞株で高発現しており、候補タンパク質として選抜した。これらタンパク質は、臨床検体を用いた免疫染色でも、比較的、感度、特異度高く発現していた。

以上から、膵がん早期診断を目指したイメージングの検討として、タンパク質をターゲットとした評価を優先的に行うこととした。

### (2)

14-3-3の発現は、WBやRT-PCRの結果、7種の膵がん細胞株のうちBxPC3で最も高く、MIA-Paca-2で最も低かった。また膵がんのマウスXenograftモデルから抽出した腫瘍の免疫染色でも、14-3-3の発現を確認した。14-3-3に結合するとされるペプチドA(Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 7438-7441)を基にイメージングプローブ(<sup>67</sup>Ga-DOTA-ペプチドA)を作成後、マウスXenograftモデルに投与し、経時的に屠殺し、各種臓器の放射線を測定した。その結果、腫瘍血液比

(T/BI) 腫瘍筋肉比(T/M)は、それぞれ2時間値で2.637、1.927であり、イメージングに用いるには腫瘍集積は低い結果であった。しかし、プローブの他臓器(腎、肝、腸)への集積はペプチドプローブの割には低く、1時間の時点でほとんど排泄されているようであった。この性質を維持しつつ腫瘍集積を向上させることができればイメージング可能と考えている。

引き続き、プローブの標的に対する結合能の評価の上、プローブの自体の改良を加え、膵がん早期診断のためのイメージングプローブ作成を目指して、研究を継続していく方針である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

「該当なし」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堤 康一郎 (TSUTSUMI, Koichiro)

岡山大学 大学病院 助教

研究者番号：40610910

### (2) 研究協力者

上田 真史 (UEDA, Masashi)

岡山大学 医歯薬学総合研究科 准教授

研究者番号：40381967