

## 論 文 要 旨

### Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) modulates the chemosensitivity of CD133-expressing pancreatic cancer cells to gemcitabine

【 インターフェロン  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) は、CD133 発現の  
膵臓癌細胞のゲムシタビン治療感受性を調整する 】

林 知実

#### 【序論および目的】

膵臓癌の化学療法は現在のところゲムシタビン(GEM)が標準治療薬であるが、効果は不十分であり未だ予後の悪い疾患である。近年、癌の抗癌剤耐性・放射線耐性や、転移・再発などに癌幹細胞 (CSCs) が深く関与することが報告されている。今回、申請者らは膵臓癌の CSCs マーカーの1つである CD133 に注目し、ヒト膵癌細胞株 (Capan-1) を用いて CD133 発現膵癌細胞の GEM 耐性と、インターフェロン  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) の GEM 感受性に対する調整効果を検討したので報告する。

#### 【材料および方法】

ヒト膵癌細胞株 5 種類の CD133 発現をフローサイトメトリーにて解析すると、細胞株間で発現に分散がみられた。そこで薬剤感受性を検討するにあたっては、CD133 発現が約 47%みられる細胞株 (Capan-1) を実験に用いた。GEM に対する薬剤感受性について、MTT assay、Flow cytometry、Western blotting を用いて解析し、CD133 陽性細胞と陰性細胞の BrdU assay と Flow cytometry による細胞周期解析を行った。さらに、IFN $\alpha$  に対する薬剤感受性に関して同様の実験を行うとともに、IFN $\alpha$  のシグナル経路についても検討した。次に、GEM と IFN $\alpha$  を併用した場合の薬剤感受性について、in vitro、in vivo 実験を行った。In vivo 実験では、BALB/c-nu/nu マウスに CD133 陽性細胞を皮下移植し形成された腫瘍に対して、生理食塩水、IFN $\alpha$  単独、GEM 単独、IFN $\alpha$ +GEM 併用の 4 群を投与し抗腫瘍効果について検討した。Capan-1 の CD133 陽性細胞が癌幹細胞様の性質を有するか否かについて、Flow cytometric analysis、Sphere forming assay、Migration and invasion assay、Tumorigenic assay を用いて検討した。統計分析に関しては、群間比較は  $\chi^2$  検定、T 検定により行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### 【結 果】

1) Capan-1 膵癌細胞の増殖は、GEM 投与で抑制されるが、Flow cytometry、Western blotting 解析では、CD133 陽性細胞分の比率が陰性細胞分と比較して増加し、蛋白発現も増加していた。

- 2) 細胞周期解析では、GEM 投与により CD133 陰性細胞は S 期からアポトーシスに移行するのに対し、CD133 陽性細胞は S 期への移行が抑制され G1/G0 期での蓄積が認められた。
- 3) IFN $\alpha$  における解析では、CD133 陽性細胞の比率の減少がみられ、蛋白発現も減少していた。細胞周期解析では、IFN $\alpha$  を投与すると CD133 陽性細胞は G1/G0 期から S 期への移行が増加し、GEM の併用で CD133 陽性細胞のアポトーシス増加が認められた。
- 4) CD133 陽性細胞を BALB/c-nu/nu マウスに皮下移植し薬剤耐性実験を行った結果、IFN $\alpha$  と GEM の併用群では、GEM、IFN $\alpha$  単独投与群と比較して、有意に腫瘍増殖抑制効果を示した。
- 5) Capan-1 の CD133 陽性細胞の特性を検討した結果、CD133 陽性細胞は無血清培地で sphere form を形成し、高い細胞遊走能と浸潤能、NOD/SCID マウス移植では高い腫瘍形成能を示し、癌幹細胞様の性質を維持していた。

#### 【結論及び考察】

膵癌患者の予後不良の要因の一つとして CD133 発現膵癌細胞の浸潤・転移との関連性や抗癌剤に対する治療抵抗性が報告されている。GEM は膵癌の標準治療薬として広く用いられているが、その効果は十分ではない。本研究において、ヒト膵癌細胞株 (Capan-1) の CD133 陽性細胞は、GEM に対して治療抵抗性を示した。すなわち、CD133 陽性細胞が静止期細胞 (G0/G1) に停滞することで、S 期に抗腫瘍性効果を示す GEM に対して耐性を示すことが明らかになった。一方、サイトカインの一つである IFN $\alpha$  は遺伝子発現の調節や、細胞増殖抑制効果、細胞周期調節など様々な生物学的な機能を持つことが知られている。CD133 陽性細胞に対する IFN $\alpha$  の調整効果を検討した結果、IFN $\alpha$  は G0/G1 期にある CD133 陽性細胞を S 期に移行させることで GEM への感受性を誘導し、アポトーシスを増加させることにより抗腫瘍効果を示すことが判明した。その分子機構の一つとして、Mnk1 経路の関連性が推測されたが、まだ不明な点が多い。さらに、腫瘍細胞側因子として、CD133 陽性細胞の細胞特性を検討した結果、CD133 陽性細胞は癌幹細胞様の性質を持つ細胞集団であり、その特性とされる抗癌剤耐性を示した。以上の結果から、IFN $\alpha$  は膵癌における癌幹細胞様細胞に対して細胞周期の調整を介して GEM との併用効果を増強することが示唆された。今後、IFN $\alpha$  などのサイトカインと癌幹細胞との相互作用の分子機構解明が癌幹細胞治療に繋がる可能性がある。

(Article first published online: Cancer Sci 13 MAR 2012 掲載)

# 論文審査の要旨

|      |           |       |       |         |
|------|-----------|-------|-------|---------|
| 報告番号 | 総研第 211 号 |       | 学位申請者 | 林 知実    |
| 審査委員 | 主査        | 松山 隆美 | 学位    | 博士 (医学) |
|      | 副査        | 中川 昌之 | 副査    | 古川 龍彦   |
|      | 副査        | 東 美智代 | 副査    | 井戸 章雄   |

## Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) modulates the chemosensitivity of CD133-expressing pancreatic cancer cells to gemcitabine

インターフェロン $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) は、CD133 発現膵臓癌細胞の  
ゲムシタビン治療感受性を調整する

膵臓癌は悪性度が高く、診断時の手術可能症例は 15%以下であり、手術不能症例には化学療法や放射線療法が行われている。また、治癒切除後にも早期に再発・転移を来す症例が少なくなく、その予後は極めて不良である。近年、固形癌において、self-renewal (自己複製能)や tumorigenesis (腫瘍形成能)の特性をもつ癌幹細胞の研究が進んでおり、抗癌剤や放射線耐性、さらに転移・再発などに癌幹細胞が深く関与することが報告されている。膵臓癌でも同様に僅かに残存した治療抵抗性の癌幹細胞が、再発・転移に関わっていると推測される。そこで申請者らは、膵臓癌幹細胞マーカーの 1 つであると考えられている CD133 に着目し、ヒト膵癌細胞株 (Capan-1) の CD133 発現膵癌細胞に対して、臨床使用と安全性が確立された膵臓癌標準治療薬のゲムシタビン(GEM)と広範囲な生物学的機能を有するインターフェロン $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )を用いて、膵癌幹細胞に対する新規治療法の可能性について検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかになった。

- 1) CD133 陽性膵癌細胞は免疫不全マウスでの高い腫瘍形成能や GEM 耐性などの癌幹細胞様の特性をもつ癌細胞集団であった。
- 2) CD133 陽性膵癌細胞は S 期細胞を標的とする GEM 治療に対して G0/1 期に集積し、薬剤感受性が低下していることが示された。
- 3) GEM と IFN- $\alpha$  の併用は in vitro と in vivo で単独投与に比して CD133 陽性膵癌細胞に対してより高い抗腫瘍効果を示した。
- 4) IFN- $\alpha$  による Mnk1/ISG15 経路は腫瘍増殖抑制を示す経路の一つであることが示唆された。
- 5) IFN- $\alpha$  併用効果は、G0/1 期にある CD133 陽性膵癌細胞を S 期に誘導することで、GEM 感受性を増強することが示唆された。

本研究は、膵癌における癌幹細胞様分画に対して IFN- $\alpha$  の細胞周期の調整を介して GEM との併用により抗腫瘍効果を増強することを明らかにした。すなわち、IFN- $\alpha$  などのサイトカインの癌幹細胞への作用の分子機構解明が癌幹細胞治療に繋がる可能性を示した。さらに、GEM と IFN- $\alpha$  の併用療法による膵癌に対する臨床試験への応用が期待される。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

|  |         |       |       |         |
|--|---------|-------|-------|---------|
| 報告番号   | 総研第211号 |       | 学位申請者 | 林 知実    |
| 審査委員   | 主査      | 松山 隆美 | 学位    | 博士 (医学) |
|  | 副査      | 中川 昌之 | 副査    | 古川 龍彦   |
|  | 副査      | 東 美智代 | 副査    | 井戸 章雄   |
| <p>主査および副査の5名は、平成24年9月10日、学位申請者林 知実君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 今回の研究で数種類のヒト膵癌細胞株の中から、Capan-1 を使用した理由は何か。<br/> (回答) Capan-1 ではフロサイトメトリー解析で、45%前後の CD133 発現を認めた。その他の細胞株は数%の発現のみであり、薬剤感受性試験に関する発現の増減を評価するのに Capan-1 が最も適切であると判断した。</p> <p>質問2) CD133 に注目した理由は何か。<br/> (回答) 当科で原発性膵癌切除例の組織免疫学的検査を行った結果、CD133 の発現は 1~15%にみられ、CD133 陽性群が陰性群に比べて有意に予後不良であった。この結果を基に、膵癌の薬剤耐性に CD133 発現細胞の関与が推測され、CD133 発現細胞と非発現細胞を用いたゲムシタピン(GEM)感受性試験を行うことにした。</p> <p>質問3) CD133 マーカー以外で検討を行ったか。<br/> (回答) 現在までに、膵癌の癌幹細胞マーカーとして、CD133、CD44+CD24+ESA の報告があるが、各文献で結果にばらつきがある。我々は、CD133 以外に、ALDH や SP(side population)細胞などを用いて実験を行っているが、癌幹細胞マーカーの特定までには至っていない。一方、最近の報告でも癌幹細胞のマーカーや分子の発現を示したものがほとんどで、癌幹細胞を特異的に標的とした治療法まで示したものはみられない。今後、更に正常と癌幹細胞との間に存在する特異的な分子の違いを見出すことができれば、癌幹細胞を標的とする診断・治療の構築に近づくと思われる。</p> <p>質問4) CD133 は膵癌の癌幹細胞マーカーであると言って良いか。<br/> (回答) 最近の報告では、CD133 が癌幹細胞マーカーであるかどうかについて意見が分かれている。我々が行った in vitro の実験では、Capan-1 の CD133 陽性細胞は無血清培地で sphere を形成し、陰性群に比べて遊走能・浸潤能が有意に高かった。In vivo の実験では CD133 陽性群が陰性群に比べて有意に腫瘍形成能が高かった。さらに CD133 陽性群が GEM に耐性を示していた。以上の結果から、Capan-1 で CD133 陽性細胞は癌幹細胞に似た性質を持つことが示唆された。しかし、様々な細胞株で CD133 の発現にばらつきがあり、CD133 陰性細胞でも癌幹細胞様の性質を持つ場合もあることから、CD133 陽性細胞が膵癌の原始癌幹細胞であるとは言い難く、原始癌幹細胞が分化した後の phenotype の1つである可能性が考えられた。今後、未知の原始癌幹細胞マーカーの特定や癌幹細胞様の性質を持つ CD133 の特性に関する研究が必要である。</p> <p>質問5) 今回の研究で、GEM にインターフェロン<math>\alpha</math>(IFN-<math>\alpha</math>)を併用した理由は何か。<br/> (回答) 1990年代の臨床報告で進行膵癌症例に対する 5-FU と IFN-<math>\alpha</math> の併用研究があり、有効性が示唆されていた。最近の報告で、卵巣癌の Hoechst 33342 細胞株内に癌幹細胞様の性質を持つ SP 細胞群が存在し、IFN-<math>\alpha</math> 投与により SP 細胞の比率の減少が認められている。さらに造血幹細胞に対して IFN-<math>\alpha</math> 投与により分化誘導が誘発されたという報告もあった。我々は細胞静止期に多いとされる癌幹細胞が、IFN-<math>\alpha</math> により静止期より脱出することで抗癌剤感受性が高まると考えた。また、IFN-<math>\alpha</math> が肝炎や腎癌の治療に用いられており、基礎研究から今後の臨床応用に結びつきやすい薬剤である。しかし、膵癌の癌幹細胞に対する IFN-<math>\alpha</math> の効果は、まだ十分に解明されていない。</p> <p>質問6) IFN-<math>\alpha</math> のように GEM の効果を高める薬剤は何か。他のサイトカインや分子標的薬などについても考えたか。<br/> (回答) ほかの IFN<math>\beta</math>、IFN<math>\gamma</math> などについてはまだ実験を行っていないが、サイトカインが癌幹細胞に何らかの関連があることは推定される。最近、GEM と sonic hedgehog や mTOR シグナルを遮断する薬剤との併用が、癌幹細胞分画の減少や腫瘍の縮小を引き起こしたという報告がある。</p> <p>質問7) GEM 単独と比較して、IFN-<math>\alpha</math> を併用するとアポトーシスが増える理由は何か。</p> |         |       |       |         |

(回答) GEM は時間依存性の抗癌剤であり、細胞周期の S 期に働き DNA 合成を阻害しアポトーシスを引き起こす。Capan-1 の CD133 陽性細胞は GEM 投与で S 期から G0/G1 期に移行し、薬剤耐性を起こしたが、IFN- $\alpha$  を投与すると、CD133 陽性細胞は G0/G1 期から S 期に移行した。GEM を併用することにより、アポトーシスが引き起こされたと考えられた。以上の結果から、IFN- $\alpha$  は cell cycle を調整し、GEM 併用療法を行った CD133 陽性細胞の増殖抑制やアポトーシス促進をもたらせたと考えられる。

質問 8) IFN- $\alpha$  はどのような機序で G0/G1 期から S 期へ誘導させているのか。

(回答) IFN- $\alpha$  の抗腫瘍効果のシグナル経路として、JAK-STAT、Mnk/ISG15 経路が関係している。IFN- $\alpha$  の CD133 陽性細胞に対する細胞周期や分化誘導のシグナル経路についても、上記経路が関係している可能性がある。今後の研究が必要である。

質問 9) In vivo 実験で、IFN- $\alpha$  と GEM の併用療法は、コントロール群、GEM または IFN- $\alpha$  単独群に比べて有意に Capan-1 細胞の異種移植片の成長を抑制したが、その作用機序は何か。

(回答) 我々の実験結果では、CD133 陽性細胞異種移植片腫瘍の免疫組織学的染色や FACS 解析でも in vitro のデータと同様の CD133 の染色性の違いがみられた。以上から IFN- $\alpha$  により腫瘍内でも cell cycle を調整し、IFN- $\alpha$  と GEM の併用療法で著明なアポトーシスが引き起こされる可能性が考えられた。しかし、同じような膵癌モデルの in vivo 実験の報告では、IFN- $\alpha$  と GEM の併用療法は、抗血管新生効果によりアポトーシスを有意に引き起こしていた。これらの結果は、IFN- $\alpha$  は、in vivo での腫瘍抑制効果に対して、様々な生物学的作用をもつ可能性が考えられる。

質問 10) IFN- $\alpha$  により ISG15 が高発現したが、ISG15 はどのような働きをしているのか。

(回答) ISG15 は、IFN- $\alpha$  により誘導されるユビキチン様タンパク質であり、様々なタンパク質を修飾することで、多様な生命現象に関与する。ISG15 のターゲットタンパク質への結合は E1, E2, E3 の 3 種の酵素が連続的に作用することによって触媒される。しかし ISG15 付加の生体内機能および生化学的意義は未だ不明である。

質問 11) In vivo 実験で、CD133 陽性細胞の皮下異種移植片実験の他に、膵実質への同所移植実験は行なったか。

(回答) CD133 陽性細胞の膵実質への同所移植実験を行ない、局所腫瘍や肝転移腫瘍の評価を現在行なっているが、まだ十分な結果は得られていない。

質問 12) 臨床学的治療として、IFN- $\alpha$  と GEM の最適な投与時期は。

(回答) 今回の実験では、IFN- $\alpha$  と GEM を同時期に投与しているが、最近の論文で IFN- $\alpha$  投与し、数時間後に抗癌剤投与すると抗腫瘍効果が高められたという報告がある。投与時期についてはさらなる検討が必要である。

質問 13) Capan-1 以外の膵癌細胞株でも CD133 陽性細胞で免疫不全マウスへの腫瘍形成能は高いのか。

(回答) Panc1 細胞株については、FACS 解析で CD133 比率は 1.5% であり、一方で CD44+CD24+ESA+ の比率が高かった。さらに Panc1 細胞株では、CD44+CD24+ESA+ 細胞は無血清培地で sphere を形成し、In vivo では CD44+CD24+ESA+ 細胞において有意に腫瘍形成能が高かった。この結果から、Panc1 細胞株については、CD44+CD24+ESA+ 細胞が癌幹細胞様の機能をもつ可能性が示唆された。その他の細胞株については現在解析中である。

質問 14) 今後の展望は。

(回答) IFN- $\alpha$  による癌幹細胞調節の機序に対して更なる解析が必要である。IFN- $\alpha$  は肝癌や腎癌ですでに臨床使用されており、副作用や効果の面から臨床に導入しやすい薬剤である。今後は IFN- $\alpha$  併用療法における膵癌に対する臨床試験への応用が期待される。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。