

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 同所性移植で得られたヒト膵臓がん細胞由来の治療標的分子に関する研究  
(英語) Research on Cancer Treatment Targets Obtained from Human Pancreatic Cancer Cell Lines Derived from Orthotopic Transplantation into Mice

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院医学系研究科 教授  
宮園 浩平

所属 役職 氏名： (英語) Kohei Miyazono, MD, PhD  
Professor, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 全体の統括及び膵臓がん細胞株の標的分子の同定と機能解析  
開発課題名： (英語) Management of the Whole Project and Identification and Functional Analyses of the Human Pancreatic Cancer Cell Lines

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院医学系研究科 教授  
宮園 浩平

所属 役職 氏名： (英語) Kohei Miyazono, MD, PhD  
Professor, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

がん微小環境では、さまざまな細胞間での直接的な相互作用や、サイトカインなどの液性因子を介した間接的な相互作用によって腫瘍の形成や進展が時空間的に制御されており、がん微小環境は新規のがん治療標的として近年注目されている。本研究では、膵臓への同所性移植 (orthotopic transplantation) モデルを用いて、ヒト膵臓がん細胞から悪性度の高いがん細胞株を樹立する。同所性移植で得られた高悪性膵臓がん細胞株を、親株や異所性移植 (heterotopic transplantation) で得られた細胞株と比較しつつ、(1) その浸潤能・転移能を特徴づける細胞生物学的特質と抗がん剤耐性機構について研究を行う。さらに、(2) 同所性移植細胞株に特異的に発現し、膵臓がんの浸潤・転移・抗がん剤耐性に重要な役割を果たす遺伝子を同定し、その機能を *in vitro* および *in vivo* で明らかにする。

### (1) 同所性移植由来膵臓がん細胞株の樹立と細胞生物学的特性に関する研究

#### 項目 1) 新規同所性移植由来膵臓がん細胞株の樹立

これまでにヒト膵臓がん細胞株 4 種を用いて同所性移植由来膵臓がん細胞株を樹立してきた。こうした同所性移植由来膵臓がん細胞株が悪性度の高い性質を持つようになる分子機構を明らかにするために親株からいくつかのクローンを得て、それぞれのクローンから同所性移植由来膵臓がん細胞株を樹立した。その結果、それぞれのクローンから得た細胞株が同所性移植によって、新たに悪性形質を獲得することが確認できた。

#### 項目 2) 同所性移植由来膵臓がん細胞株の細胞生物学的特徴の検討

樹立した同所性移植由来ヒト膵臓がん細胞株 4 種 (SUIT-2、Panc-1 のほか MiaPACA-2、BxPC-3) について、親株や異所性移植由来細胞株と比較しつつ、その細胞生物学的特徴を検討した。特に SUIT-2 と Panc-1 を中心に研究を行った。

#### 項目 3) 同所性移植由来膵臓がん細胞株のがん幹細胞性・薬剤耐性能の検討

種々の幹細胞マーカーの発現とその役割の検討を行い、幹細胞マーカーのうち ABCG2、Nestin、SOX2 などの発現亢進が SUIT-2 細胞や Panc-1 細胞の同所性移植株で見られた。

### (2) 同所性移植由来膵臓がん細胞株からの治療標的分子の同定

#### 項目 4) 同所性移植由来膵臓がん細胞株の遺伝子発現プロファイルの検討

SUIT-2 と Panc-1 について RNA-seq を行い、遺伝子発現プロファイルの解析を行った。

#### 項目 5) 同所性移植由来膵臓がん細胞株で同定した標的分子の検討 (既知の分子の検討)

同所性移植由来膵臓がん細胞株で同定した標的分子のうち、Nestin について解析を行った。

## 英文

In tumor microenvironment, direct interaction between cancer cells and various types of stromal cells, as well as their indirect interaction through soluble factors, including cytokines, play pivotal roles in spatio-temporal regulation of the formation and progression of cancer. Thus, studies on tumor microenvironment are valuable for development of new strategies for molecular target therapy of cancer. In this project, we establish highly malignant cancer cell lines from human pancreatic cancer cells using an orthotopic transplantation model into nude mice. We compare the properties of the cells established by orthotopic transplantation

(termed 3P cells) with their parental cells and the cells established by heterotopic transplantation (3sc cells), and study the biological characteristics of the cells, especially their invasive and metastatic abilities and responsiveness to anti-cancer drugs. In addition, we identify some genes which are specifically expressed in the 3P cells, and play important roles in invasion, metastasis, and drug resistance of pancreatic cancer cells. We further investigate the function of these gene products in vitro and in vivo.

#### (I) Establishment of human pancreatic cancer cell lines by orthotopic transplantation and biological characterization of the established cell lines

##### 1) Establishment of human pancreatic cancer cell lines by orthotopic transplantation

We have established pancreatic cancer cell lines by orthotopic transplantation from 4 different human pancreatic cancer cell lines. To elucidate the molecular mechanism how these cells acquire malignant phenotypes through orthotopic transplantation, we isolated several cell clones from parental cells, and established new cell lines from these cell clones by orthotopic transplantation. We have found that cell lines derived from a single cell clone acquire malignant phenotypes after orthotopic transplantation, suggesting that tumor microenvironment not only “selects”, but also “educates” the cancer cells to acquire malignant phenotypes.

##### 2) Cell biological properties of human pancreatic cancer cell lines obtained through orthotopic transplantation

The highly malignant pancreatic cancer cells (3P cells) derived from 4 different pancreatic cancer cell lines (SUIT-2, Panc-1, MiaPACA-2, and BxPC-3) were used in this project. We compared cell biological properties of the 3P cells with their parental cells and corresponding 3sc cells. Especially, detailed studies have been performed using the 3P cells derived from SUIT-2 cells and Panc-1 cells.

##### 3) Stem cell-like properties and drug-resistance of human pancreatic cancer cell lines obtained through orthotopic transplantation

Expression of various stem cell markers were examined in the 3P cells. We have found that expression levels of ABCG2, Nestin, and SOX2 are increased in the 3P cells derived from SUIT-2 and Panc-1 cells compared to their parental cells and corresponding 3sc cells.

#### (II) Identification of molecular targets from human pancreatic cancer cell lines obtained through orthotopic transplantation

##### 4) Gene expression profile of human pancreatic cancer cell lines obtained through orthotopic transplantation

We have performed RNA-seq analyses using SUIT-2 and Panc-1 cells, and compared the gene expression profiles of the 3P, 3sc and parental cells.

##### 5) Functional analysis of the genes identified from human pancreatic cancer cell lines obtained through orthotopic transplantation: analysis of known targets

We have performed functional analysis of Nestin, which was identified in highly malignant pancreatic cancer cell lines.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 4 件)

1. Ando M, Kawazu M, Ueno T, Koinuma D, Ando K, Koya J, Kataoka K, Yasuda T, Yamaguchi H, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Sai E, Yamashita Y, Asakage T, Miyazaki Y, Kurokawa M, Miyazono K, Nimer SD, Yamasoba T, Mano H. Mutational landscape and antiproliferative functions of ELF transcription factors in human cancer. *Cancer Res.* 2016, 76 (7), 1814-1824.
2. Sakurai T, Isogaya K, Sakai S, Morikawa M, Morishita Y, Ehata S, Miyazono K, Koinuma D. RNA-binding motif protein 47 inhibits Nrf2 activity to suppress tumor growth in lung adenocarcinoma. *Oncogene.* 2016, 35 (38), 5000-5009.
3. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016, 8 (5), pii: a021873.
4. Miyazawa K, Miyazono K. Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017, 9 (3), pii: a021873.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. TGF- $\beta$ ファミリーからみた内科学 (特別講演), 口頭, 宮園浩平, 第 113 回日本内科学会総会・講演会 (東京), 2016/4/15~17, 国内
2. ヒト膵臓がんのマウス移植モデルを用いた新規治療分子の探索, ポスター, 高橋恵生, 江幡正悟, 宮園浩平, 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (別府), 2016/5/30~6/1, 国内
3. 微小環境のがん細胞形質に及ぼす影響, 口頭, 高橋恵生, 江幡正悟, 鯉沼代造, 宮園浩平, 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会 (米子), 2016/7/21~22, 国内
4. TGF- $\beta$  signaling: Mechanisms of action and clinical application (教育講演), 口頭, Miyazono K, 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会 (東京), 2016/7/28~30, 国内
5. Analysis of pancreatic cancer cells in different tumor microenvironment, 口頭, Takahashi K, Ehata S, Koinuma D, Miyazono K, 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2016/10/6~8, 国内
6. TGF- $\beta$ ファミリー: その多彩な作用とがん (特別講演), 口頭, 宮園浩平, 第 2 回 AMED がん若手研究者ワークショップ (東京), 2016/11/29~30, 国内
7. 微小環境によるがん細胞の悪性化形質の獲得機構, ポスター, 高橋恵生, 江幡正悟, 宮園浩平, 第 2 回 AMED がん若手研究者ワークショップ (東京), 2016/11/29~30, 国内
8. TGF- $\beta$ ファミリーとがん: その多彩な作用と臨床応用 (プレナリーセミナー) 口頭, 宮園浩平, 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2016/11/30~12/2, 国内
9. Characterization of highly malignant renal cancer cells exposed to renal microenvironment, ポスター, Nishida J, Ehata S, Miyazono K, Keystone Symposia "Cell Plasticity within the Tumor Microenvironment" (Montana, USA), 2017/01/08~12, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. TGF- $\beta$ ファミリーシグナルから疾患を解き明かす, 宮園浩平, 第 27 回科学技術交流フォーラム「基礎生物学の極み」(東京), 2017/2/17, 国内.
2. アカデミアと企業が描くアカデミアシーズ実用化の未来について (パネルディスカッション), 宮園浩平, ジャパン・キャンサーリサーチ・プロジェクト平成 28 年度企業向け成果発表会 (東京), 2017/3/3, 国内.

(4) 特許出願

該当なし。