

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09046

研究課題名(和文) 膵癌細胞の浸潤機序 - 浸潤を先導するleading cellsの同定・解析 -

研究課題名(英文) The mechanism of invasion in pancreatic cancer cell - Identification and analysis of leading cells to invasion -

研究代表者

清水 祐紀子 (SHIMIZU, Yukiko)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10404021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：三次元培養で膵癌細胞と膵星細胞を共培養した結果、癌細胞の浸潤に先導して膵星細胞の浸潤があり、膵星細胞がleading cellsの役割を持つ。浸潤する膵星細胞は、コラーゲン線維の配列を変化させ細胞外マトリックスの改変をもたらし、浸潤方向に沿う平行線維を増加させた。また、Endo180は膵癌細胞よりも膵星細胞で発現が強く、膵癌細胞とEndo180を抑制した膵星細胞との共培養においては、膵星細胞の浸潤は有意に抑制され、浸潤する癌細胞も有意に減少した。膵星細胞はEndo180の機能を介して基質リモデリングを行い、コラーゲン線維の配列を変化させることで癌の浸潤を促進している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Using three-dimensional matrix remodeling assay, we found that pancreatic stellate cells (PSCs) frequently invaded the collagen matrix with pancreatic cancer cells (PCCs), which invaded behind the invading PSCs. In addition, invading PSCs changed the alignment of collagen fibers, resulting in extracellular matrix (ECM) remodeling and an increase in the parallel fibers along the direction of invading PSCs. Endo180 expression was higher in PSCs than in PCCs, Endo180 knockdown in PSCs attenuated the invasive abilities of PSCs and co-cultured PCCs. Endo180-knockdown PSCs suppressed tumor growth and changes in collagen fiber orientation in co-transplantation with PCCs. Our findings suggest that PSCs lead the local invasion of PCCs by physically remodeling the ECM, possibly via the function of Endo180.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 膵星細胞 leading cells 基質リモデリング Endo180

1. 研究開始当初の背景

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 (Pancreatic stellate cell: PSC) が同定され PSC の制御が desmoplasia をコントロールする鍵となると考えられ、現在 PSC の研究が世界中で進められているが、その機構は不明な点が多い。

癌の浸潤機序として、浸潤を先導する leading cells が存在すると考えられる。また、癌細胞の間質への浸潤は、細胞外基質 (Extracellular matrix: ECM) の分解と形成されたスペースへの細胞遊走から構成されるが、癌細胞も PSC 同様、エンドサイトーシスによりコラーゲンを細胞内に取り込み分解していることが最近報告され (Quintanilla-Dieck, J Invest Dermatol, 2008)、細胞の新たな ECM リモデリング機序の存在を示唆するものとして注目されている。また PSC 自体も ECM の高い取り込み・分解能を有していることから、癌浸潤を先導する役割を担っている可能性があり、PSC もまた癌浸潤を先導する “leading cells” の候補と考えられる。

2. 研究の目的

癌細胞は上皮間葉移行 (EMT) により浸潤・転移能を獲得する。EMT は PSC により誘導されることが明らかとなっているが、その誘導のメカニズムは明らかとなっていない。また、浸潤の過程において局所では、EMT cell、non-EMT cell、PSC がそれぞれ協調して浸潤していると考えられているが、そのメカニズムも明らかでない。癌の浸潤機序として、浸潤を先導する leading cells が存在し、それらが ECM を分解し、細胞が遊走するスペースを確保すると考えられており、leading cells の同定、およびその浸潤機序を解明する。最終的には leading cells をターゲットとした特異的分子標的治療を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

まず、leading cells を同定するために、コラーゲン・ゲルを用いた 3 次元共培養モデルを作成し、浸潤を先導する細胞群を同定する。さらにそれらが、EMT cell なのか PSC なのか、組織免疫化学染色を用いて同定し、並びにその誘導機序を明らかにする。さらに、膵星細胞の phenotype 別解析により癌の EMT 誘導を主導する PSC もしくは、浸潤を先導する PSC を同定する。

4. 研究成果

(1) 低酸素環境下における膵星細胞によって細胞外基質のリモデリングが制御される。

低酸素下で膵星細胞が作成した細胞外マトリックス上では、正常酸素下と比較して癌細胞の運動距離が増加していた。また、低酸素下において癌細胞の浸潤を導く特定の細胞集団、いわゆる leading cell として、PLOD2 発現のある膵星細胞が細胞外基質のリモデリングにより癌間質の配列を調整し、癌細胞の浸潤を誘導 (図 1) することを示し原著論文として発表した。

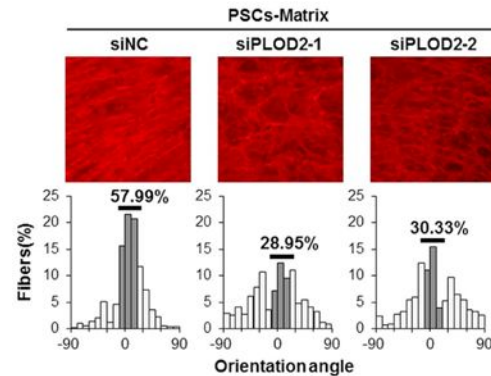


図 1 低酸素下での PSC 中の PLOD2 のノックダウンは、3-D マトリックス中の平行繊維の割合を減少させた。

(2) PSC は、膵癌細胞 (Pancreatic cancer cell: PCC) の局所浸潤を導き、促進する。3D マトリックスリモデリングアッセイにおいて、タイムラプス画像は、PSC1 によって生成された浸潤経路に従って PCC が浸潤したことを明らかにした (図 1)。コラーゲンマトリックス中で、単培養と比較し PSC1 の共培養では、浸潤細胞の数は有意に増加した ($P < 0.001$)。次に、H&E で染色されたコラーゲンマトリックスのパラフィン切片を用いて測定した浸潤細胞の数および最大浸潤距離は、単培養モデルと比較して共培養モデルで有意に増加した ($P < 0.001$)。

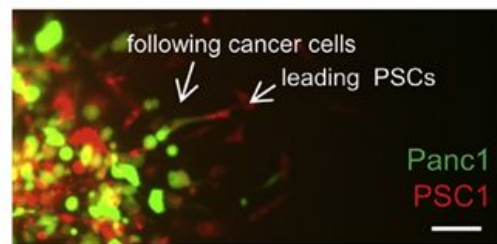
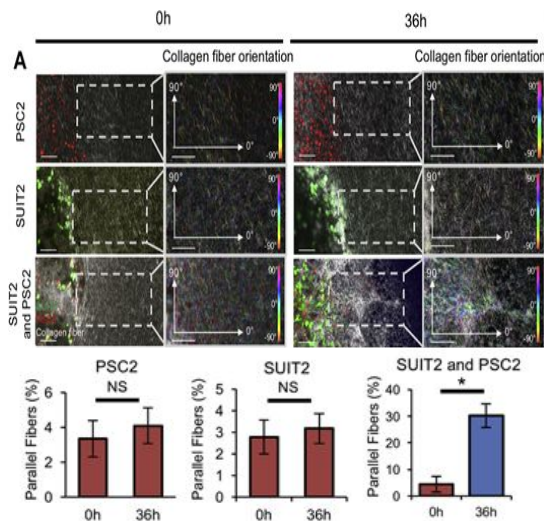


図 2 コラーゲンマトリックス中の共培養 24 時間後にコラーゲンマトリックスに侵入した膵癌細胞: Panc1 細胞 (緑色) および PSC1 細胞 (赤色) の代表的な蛍光顕微鏡画像。

(3) PSC は、ECM を物理的にリモデリングすることにより、PCC の局所浸潤を導く。反射共焦点顕微鏡法を用いてコラーゲンマトリックスの変化を観察した。PCC: SUIT2 と PSC2 の共培養 36 時間後の 3D マトリックスリモデリングアッセイでは、浸潤している PSC2 の周囲で反射率が増加した (図 2)。次に、コラーゲン繊維の角度を測定したところ、SUIT2 と PSC2 を共培養した 36 時間後に、浸

潤する PSC2 の方向に沿った平行繊維が有意に増加することが見出された ($P < 0.001$, 図 3)。対照的に, SUI2 または PSC2 がコラーゲンマトリックス中で単培養された場合, 細胞はコラーゲンマトリックスにわずかに侵入し, コラーゲンファイバーの角度はほとんど変化しなかった (図 2, 3)。これらの結果は, 浸潤 PSC が, コラーゲン繊維配列の変化を伴うコラーゲンマトリックスを物理的



に改変することによって, PCC の局所浸潤をもたらすことを示唆している。

図 3 SUI2 (緑) と PSC2 の 0 時間・36 時間後の反射共焦点顕微鏡法によるコラーゲン繊維画像 (左パネル)、ImageJ ソフトウェアにより作成したコラーゲン繊維配列 (右パネル)。およびその繊維角度の比較 (下パネル)。* $P < 0.001$ 。

(4)PSC における Endo180 ノックダウンは, 先導する PSC および PSC と共培養した癌細胞の浸潤能を低下させる。

Endo180 は, ECM リモデリング因子であり, コラーゲン結合および内在化受容体である。さらに, Endo180 は, PCC よりも PSC でより高度に発現される []。癌ゲノムアトラス (TCGA) RNAseq データより, 178 のヒト PDAC サンプルの Endo180 発現レベルに基づいて 3 つのグループに分けたところ, 膵腺管癌 (PDAC) 患者における Endo180 高発現と全生存率とに有意な相関があることが示されたため, PSC における Endo180 ノックダウンの影響を調べた。PSC2 の Endo180 をノックダウンしたところ, PSC2 と SUI2 との共培養による 3D マトリックスリモデリングアッセイにおいて, Endo180 の抑制によって PSC2 の浸潤能が低下することが明らかになり, SUI2 の最大浸潤距離はより短縮した ($P < 0.05$, および $P < 0.001$)。次に, コラーゲンマトリックスを固定し, H&E 染色した切片では, SUI2 を対照 siRNA でトランスフェクトした PSC と比較して siEndo180 でトランスフェクションした PSC と共培養した場合, 浸潤細胞数の有意な減少を示した ($P < 0.001$)。

(5)Endo180 ノックダウン PSC は, インビボで共移植された膵臓癌モデルにおける腫瘍増殖および局所浸潤を減少させる。

ヌードマウスの膵尾部に PSC2 (対照 shRNA, shEndo180-1, または shEndo180-2) を SUI2 と共移植し, 2 週間後に腫瘍体積を評価した。3 群間で腫瘍体積を比較すると, 対照 shRNA 群の腫瘍体積は, shEndo180-1 および shEndo180-2 群の腫瘍体積よりも有意に増大していた ($P < 0.005$)。さらに, Sirius レッド染色を行い腫瘍前面における ECM の量を調べたところ, shEndo180 群と比較して, 対照 shRNA 群ではシリウス赤色陽性領域が有意に増加した ($P < 0.001$)。

最後に, ImageJ ソフトウェアを使用して腫瘍前面のコラーゲン線維の角度を調べたところ, 対照 shRNA 群では浸潤の方向に沿って平行な繊維を認め, shEndo180 群では腫瘍表面に接線方向の繊維を認めた (図 4)。これらの結果より, PSC が ECM を改変しコラーゲン線維を変化させることにより癌細胞浸潤を誘導, 促進し, また Endo180 は PSC の侵襲的および ECM リモデリング能力に関連する因子であることを示唆している。

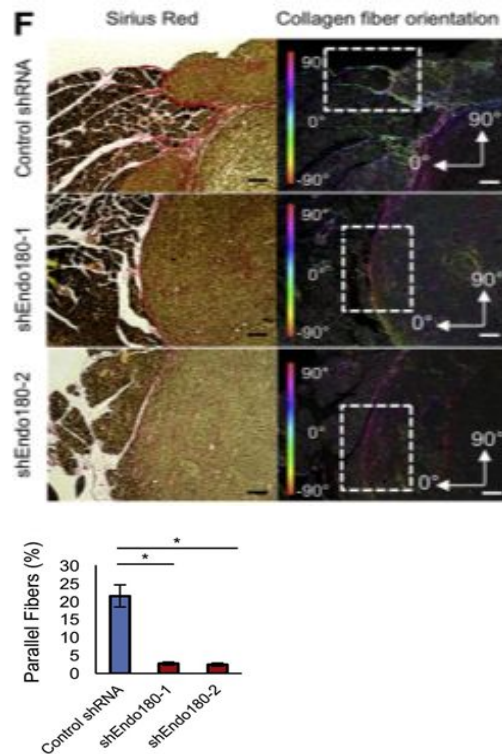


図 4 対照 shRNA と shEndo180 群との間の腫瘍前面におけるコラーゲン繊維角度の比較。スケールバーは 100 μm 。* $P < 0.001$ 。

< 引用文献 >

N. Ikenaga, K. Ohuchida, K. Mizumoto, S. Akagawa, K. Fujiwara, D. Eguchi, et al., Pancreatic cancer cells enhance the ability of collagen internalization during epithelial-mesenchymal transition, PLoS One 7 (2012), e40434.

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 2 件)

Koikawa K, Ohuchida K, Takesue S, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Endo S, Abe T, Okumura T, Horioka K, Sada M, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohuchida R, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M. Pancreatic stellate cells reorganize matrix components and lead pancreatic cancer invasion via the function of Endo180. *Cancer Letters*, 14(3):3141-3147, 2018, 査読有, doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.010
Sada M, Ohuchida K, Horioka K, Okumura T, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility, *Cancer Letters*, 372(2):210-218, 2016, 査読有, doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.016

〔学会発表〕(計 10 件)

肥川和寛、大内田研宙、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史、膵星細胞が誘導する新たな膵癌局所微小浸潤機序の解明、第 25 回日本消化器関連学会週間 第 15 回日本消化器外科学会大会、2017
肥川和寛、大内田研宙、安藤陽平、岐部晋、中山宏道、武居晋、阿部俊也、遠藤翔、奥村隆志、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史、膵星細胞における Endo180 発現の意義および治療標的因子としての検討、第 48 回日本膵臓学会大会、2017
肥川和寛、大内田研宙、安藤陽平、岐部晋、中山宏道、武居晋、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史、膵癌局所浸潤を先導する leading cell - 膵星細胞がつくる膵癌局所微少環境の機序解明 - 、第 38 回癌免疫外科研究会、2017
Koikawa K, Ohuchida K, Kibe S, Ando Y, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Okumura T, Moriyama T, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M, Endo180 regulate phosphorylation of myosin light chain 2 activity and increase the ability of extracellular matrix remodeling in leading pancreatic stellate cells, The 47th Annual Meeting of American

Pancreatic Association, 2016

肥川和寛、大内田研宙、佐田政史、真鍋達也、大塚隆生、大内田理一、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、膵癌浸潤を先導する leading cell 膵星細胞の基質リモデリング機能と浸潤機序の解明、第 71 回日本消化器外科学会総会、2016

肥川和寛、大内田研宙、佐田政史、阿部俊也、遠藤翔、奥村隆志、吉田真樹、千々岩芳朗、堀岡宏平、森山大樹、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、大内田理一、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、膵星細胞は基質リモデリングにより、leading cell として膵癌浸潤を先導する、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016

佐田政史、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、堀岡宏平、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、小田義直、中村雅史、低酸素下膵星細胞による癌間質マトリックス・リモデリングは膵癌浸潤能を増強する、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016

Koikawa K, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Horioka K, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Ohuchida R, Ueki T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M, Pancreatic Stellate Cells Lead and Promote the Local Invasion of Cancer Cells, by Physically Remodeling the Extracellular Matrix with Collagen Fiber Alignment in Pancreatic Cancer, American Pancreatic Association 46th Annual Meeting, 2015

肥川和寛、佐田政史、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、真鍋達也、大塚隆生、高畑俊一、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、田中雅夫、膵癌細胞の浸潤機序-浸潤を先導する leading cells の同定・解析-、JDDW2015 第 23 回消化器関連学会週間、2015

佐田政史、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、堀岡宏平、水内祐介、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、高畑俊一、植木隆、永井英司、水元一博、小田義直、中村雅史、田中雅夫、低酸素誘導性 LOX による癌間質リモデリングが膵癌浸潤能に与える影響の検討、第 23 回日本消化器関連学会週間、2015

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 祐紀子 (SHIMIZU, Yukiko)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10404021

(2) 研究分担者

難波江 俊永 (NABAE, Toshinaga)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10467889

水元 一博 (MIZUMOTO, Kazuhiro)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：90253418

大内田 研宙 (OHUCHIDA, Kenoki)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：20452708
(2017 年度)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()