

令和元年6月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05418

研究課題名(和文) 転移を導く臓器特異的リーディングセルの解明と微小転移環境リモデリングの制御

研究課題名(英文) Identification of the organ-specific cancer leading cells and regulation of the tumor micro-environment remodeling which leads to cancer cell metastasis.

研究代表者

中村 雅史 (NAKAMURA, Masafumi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30372741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膵癌細胞の転移形成における腹膜中皮細胞や膵星細胞といった間質細胞と膵癌細胞の相互作用の解明を目的とした。膵癌細胞の浸潤において、腹膜中皮細胞はリーディングセルとして癌細胞を先導し、細胞外マトリックス・リモデリングによる癌細胞浸潤能を増強していた。また、膵星細胞はMMP2およびMT1-MMPによって基底膜破壊を行い、さらにリーディングセルとして機能することで癌細胞浸潤に寄与していると考えられた。今後は、リーディングセルとして機能する特異的間質細胞を同定し、それらの制御による新規膵癌転移制御法の開発を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は膵癌の予後を規定する転移メカニズムを解明するために、膵癌と間質細胞の相互作用に着目して研究を行い、腹膜中皮細胞や膵星細胞といった間質細胞の膵癌細胞の浸潤における新たな機序の解明を行った。間質細胞が寄与する新たな浸潤メカニズムが解明できたことにより、これらを制御する新規の膵癌転移制御方法の開発が可能となった。その制御法を臨床応用することによって今後の膵癌患者の予後改善に寄与し得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the interaction between the pancreatic cancer cells (PCCs) and the cancer-associated stroma cells, such as the peritoneal mesothelial cells (PMCs) and pancreatic stellate cells (PSCs), in vitro assays. PMCs pre-invaded into the collagen gels, and remodeled collagen fibers as increasing the parallel fiber orientation along to the direction of cell invasion. In the 3D co-culture system and mouse orthotopic models, PSCs promoted PCCs invasion into stroma, following the basement membrane destruction through the activation of MMP2 and MT1MMP in PSCs. These data suggest that stromal cells which promote cancer cell invasion via destruction of basement membrane, or remodeling of collagen fibers can be a new target to regulate the pancreatic cancer metastasis.

研究分野：医歯薬学

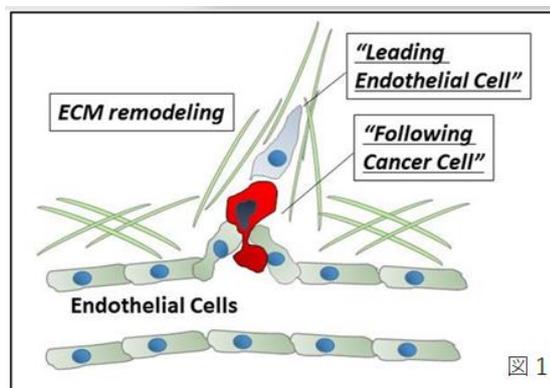
キーワード：膵癌 腹膜中皮細胞 リーディングセル 癌間質相互作用 間質リモデリング

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、他の消化器癌とは対照的にここ 30 年ほとんど生存率の改善が見られない取り残された癌である。膵癌は高い転移能を有し、肝や肺への血行性転移、リンパ組織へのリンパ行性転移、腹膜播種を認め、唯一の根治療法である外科的切除が不能となることもしばしばである。しかし、膵癌の予後を規定する転移メカニズムは十分には解明されておらず、その解明と治療への応用は急務である。

膵癌原発巣では、過剰な細胞外基質の増生である **desmoplasia** が特徴的微小環境因子として挙げられ、その形成主体である膵星細胞が癌の悪性形質に与える影響を示す報告が相次いでいる。一方、**desmoplasia** は転移巣においても存在することが明らかとなり (Clin Cancer Res, 2015, Whatcott et al.)、転移形成における間質細胞や細胞外基質の重要性が示唆されているが、転移成立におけるその具体的メカニズムはまだ解明されていない。癌細胞は、遠隔標的臓器の血管・リンパ管内皮細胞や腹膜中皮細胞といった間質細胞に接着し、遠隔臓器の間質への浸潤と定着を経て転移を成立させると考えられ、実際に他癌腫において、癌細胞の浸潤・転移過程において、腹膜中皮細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞などが先導、あるいは間質のリモデリングを介して促進的役割を果たしているとの報告がある

原発巣では癌関連線維芽細胞の機能に時空間的不均一性が存在 (JEM, 2015, Ohlund et al.) するが、転移巣においても癌細胞に対する間質細胞の応答性は多様であり、一部の細胞集団が間葉系細胞様の運動能を獲得しながら、転移形成を支持していることが示唆される。以上のことから、癌細胞によって誘導された標的臓器特異的な間質細胞が癌細胞の浸潤を先導し、周囲間質をリモデリングしながら転移成立に適した微小環境を形成していると考えられ (図 1)、今回我々は転移における腹膜中皮細胞や膵星細胞といった間質細胞による癌細胞の浸潤先導と、間質細胞の先導に伴う細胞外マトリックス・リモデリングによる癌細胞浸潤能増強という新たな機序の解明とその制御方法の開発を着想するに至った。



2. 研究の目的

膵癌の予後改善のためには転移の克服が欠かせないが、転移成立機序は十分に解明されていない。他癌腫では、腹膜播種形成の際に腹膜中皮細胞が癌細胞の浸潤を先導することが報告されている。我々は、転移成立過程では、腹膜中皮細胞や膵星細胞といった間質細胞が癌細胞を標的臓器間質へ先導し、周囲間質をリモデリングすることで癌の転移成立を支持・促進することを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腹膜中皮細胞による膵癌細胞の浸潤先導 (リーディング) 現象の同定。

In vitro において、コラーゲンゲル三次元共培養系を用いて腹膜中皮細胞と癌細胞の運動能を観察する。細胞には蛍光色素を導入し、共焦点レーザー顕微鏡によるタイムラプス観察を行う。(図 2)

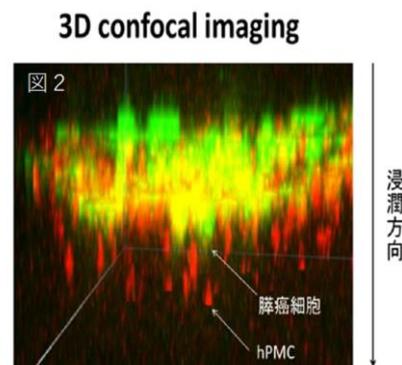
(2) リーディング間質細胞による細胞外マトリックス・リモデリングの同定とその機序の解明。

コラーゲンゲル三次元直接共培養系のコラーゲン線維の観察には全反射顕微鏡や第二高調波発生 (Second Harmonic Generation; SHG) を用いる。

(3) 遺伝子改変膵癌自然発生マウスおよび腹腔内移植による腹膜播種形成マウスモデルを用いた in vivo での腹膜中皮細胞による浸潤・転移促進能の評価。

遺伝子改変膵癌自然発生マウスの KPC (LSL-Kras G12D/+; LSL-Trp53 R172H/+; Pdx-1-Cre) マウスを用いて腹膜播種組織での癌細胞の浸潤形態を観察する。また、ヌードマウスを用いた癌細胞腹腔内単独移植群と腹膜中皮細胞共移植群との比較実験によって腹膜中皮細胞による癌細胞の浸潤・転移促進機能を明らかにする。

(4) 癌細胞浸潤・転移を先導する特異的リーディング間質細胞集団の同定。



ヒト膵癌切除組織より膵癌オルガノイドと膵星細胞を樹立し、それらを用いた3次元共培養モデルを作成する。そのモデルを用いて、癌細胞浸潤・転移に寄与する膵星細胞を同定し、膵星細胞における浸潤誘導に特異的な分子を検索する。標的分子に対する中和抗体や標的遺伝子のノックダウン/ノックアウトを用いた標的分子の阻害を行い、癌細胞の浸潤転移能への影響を検討する。

4. 研究成果

まず In vitro の実験系において、膵癌細胞 (pancreatic cancer cell; PCC) と腹膜中皮細胞 (peritoneal mesothelial cell; PMC) との相互作用について検討した。腹膜中皮細胞の存在下では膵癌細胞の遊走能や浸潤能が有意に促進され、増殖能やアノキス抵抗性も亢進することがわかった。3次元培養腹膜播種モデルにおいて、膵癌細胞と腹膜中皮細胞との共培養群では膵癌細胞単独群と比較して有意にコラーゲンゲル内へ浸潤する細胞の増加を認めた。(図3) また、腹膜中皮細胞はコラーゲンゲル内では癌細胞を先導するように浸潤し、コラーゲン線維は浸潤した細胞に沿って平行な線維方向が増加するようにリモデリングされていた。(図4)

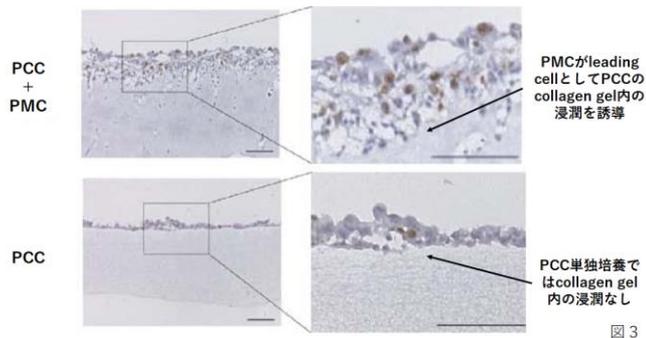
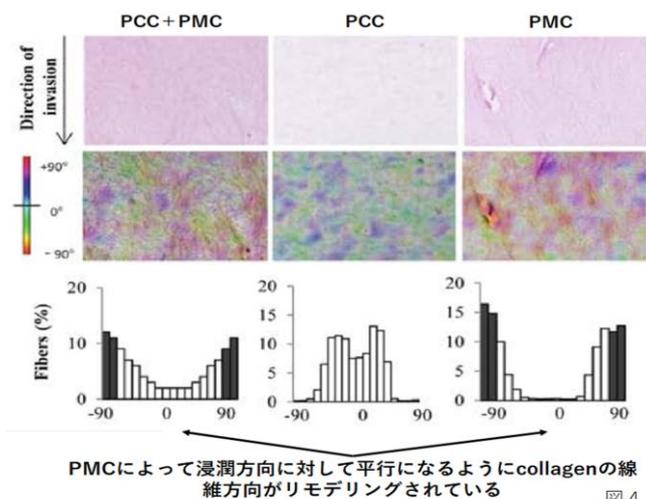


図3



PMCによって浸潤方向に対して平行になるようにcollagenの線維方向がリモデリングされている 図4

次に In vivo において膵癌細胞と腹膜中皮細胞の相互作用を検討した。KPCマウスの腹膜播種組織では、癌細胞が存在しない部位では腹膜中皮細胞が単層を保っている一方、浸潤境界においては腹膜中皮細胞が増殖し、癌細胞が筋層へ浸潤している様子が観察された。(図5)

また、膵癌細胞と腹膜中皮細胞の腹腔内共移植マウスモデルでは、膵癌細胞単独移植群に比べ有意に腹膜播種形成が促進されていた。(図6) 腹膜中皮細胞は腫瘍間質相互作用によって膵癌細胞の増殖を促進し間質組織内のコラーゲンリモデリング作用によって膵癌細胞の方向依存性の浸潤を促進する可能性が示唆された。

さらに、膵癌オルガノイドを用いて管状構造をもつ浸潤性膵管癌を再現し、リアルタイムイメージングで基底膜破壊から間質浸潤に至る局所微小浸潤の様子を観察し、その機序を検討した。膵癌オルガノイドは極性をもつ管状構造を呈し、ラミニン α 5、コラーゲンIVで染色される基底膜構造を有していた。(図7) ゲル内で、膵癌オルガノイドを膵星細胞と共培養したところ、直接共培養群において基底膜構造、管状構造を失い、ゲル内へ浸潤するオルガノイド数が有意に増加した。

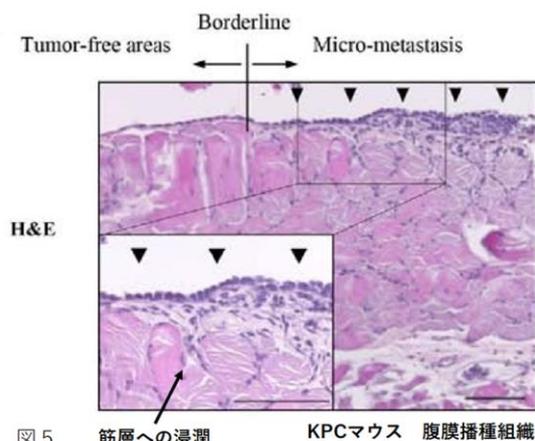
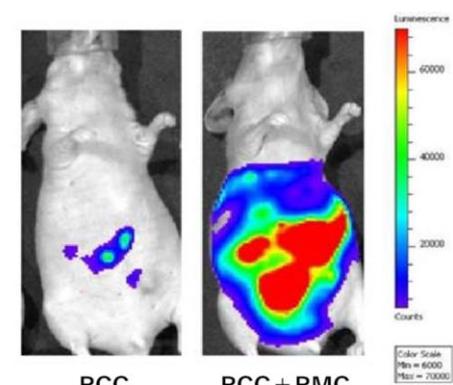
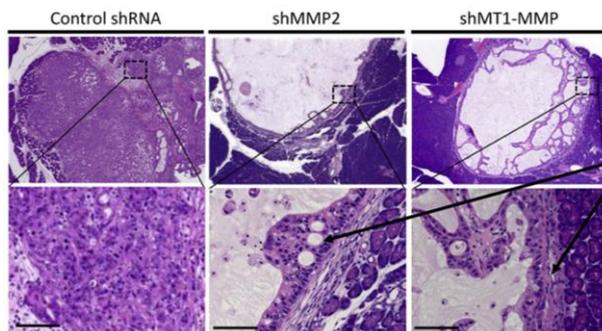
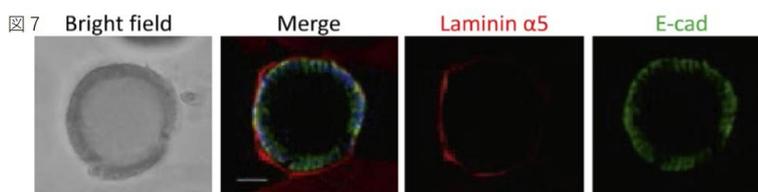


図5 筋層への浸潤 KPCマウス 腹膜播種組織



膵癌細胞と腹膜中皮細胞の腹腔内共移植マウスモデルにおいて腹膜播種形成は有意に促進 図6

また、タイムラプス撮影による観察では、周囲の存在する膵星細胞がオルガノイドへ直接コンタクトした直後から基底膜破壊が起こる様子が観察され、基底膜破壊とそれに引き続く癌細胞の浸潤に膵星細胞が深く関わっている可能性が示唆された。そこで、我々は膵星細胞が発現しているMMP2 および MT1-MMP が基底膜破壊に関わっているのではないかと考え、膵星細胞の MMP2 または MT1-MMP をノックダウンし、膵癌細胞の浸潤・転移能を評価した。ノックダウン



MMP2またはMT1-MMPノックダウンしたPSCと共移植した群では基底膜が破壊されず維持されていた。

膵癌オルガノイド+膵星細胞 同所移植マウスモデル

図 8

した膵星細胞と膵癌オルガノイドを3次元共培養すると、膵癌細胞の浸潤能は有意に低下した。また、in vivoにおいて膵癌オルガノイドと膵星細胞を同所移植したモデルでは、MMP2またはMT1-MMPノックダウンした膵星細胞を共移植した群において有意に腫瘍形成能が抑制され、オルガノイドの基底膜破壊が減少し、管腔構造が維持されていた。(図8)

以上より、膵癌細胞の腹膜播種形成や転移浸潤において、腹膜中皮細胞や膵星細胞といった間質細胞が細胞外マトリックスのリモデリングや癌細胞基底膜の破壊を介してリーディングセルとして機能し、癌の転移成立を支持していると考えられた。

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 3 件)

- ① Abe T, Nakata K, Kibe S, Mori Y, Miyasaka Y, Ohuchida K, Ohtsuka T, Oda Y, Nakamura M, Prognostic Value of Preoperative Nutritional and Immunological Factors in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, *Ann Surg Oncol*, 25(13):3996-4003, 2018, 査読有, DOI: 10.1245/s10434-018-6761-6
- ② Koikawa K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Takesue S, Endo S, Abe T, Okumura T, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Letters*, 1(425), 65-77, 2018, 査読有, DOI:10.1016/j.canlet.2018.03.031
- ③ Koikawa K, Ohuchida K, Takesue S, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Endo S, Abe T, Okumura T, Horioka H, 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*, 1(412), 143-15, 2018, 査読有, DOI:10.1016/j.canlet.2017.10.0104

[学会発表] (計 8 件)

- ① Koikawa K, Ohuchida K, Yonenaga A, Sagara A, Ando Y, Kibe S, Takesue S, Nakayama H, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M, Endo180 Expression and Histologic Categorization in Cancer Stroma is an Independent Prognostic Index in Pancreatic Cancer, American Pancreatic Association Annual Meeting 2018, 2018 年
- ② Koikawa K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Takesue S, Endo S, Abe T, Okumura T, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma, Pancreas 2018, 2018 年
- ③ Iwamoto C, Ohuchida K, Okumura T, Koikawa K, Takesue S, Nakayama H, Endo S, Kibe S,

- Ando Y, Shindo K, Nakata K, Miyawaki K, Murata M, Akashi K, Nakamura M, Hashizume M, BM-derived cells differentiated into multilineage hematopoietic cells regulate invasion and proliferation of pancreatic cancer, *Pancreas* 2018, 2018 年
- ④ Koikawa K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Takesue S, Yan Z, Abe T, Okumura T, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Okabe Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M, Pancreatic Organoids Elucidate the New Mechanisms of Pancreatic Cancer Local Invasion, The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association, 2017 年
- ⑤ Iwamoto C, Ohuchida K, Okumura T, Koikawa K, Takesue S, Nakayama H, Endo S, Kibe S, Ando Y, Abe T, Miyawaki K, Murata M, Akashi K, Nakamura M, Hashizume M, BM-Derived Cells Are Involved in the Tumor Microenvironment and Promote Invasion of Pancreatic Cancer, The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association, 2017 年
- ⑥ Abe T, Nakata K, Mori Y, Miyasaka Y, Ohuchida K, Ohtsuka T, Nakamura M, Comparison of the prognostic value of preoperative factors in patients with pancreatic cancer, he 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association, 2017 年
- ⑦ 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 年
- ⑧ Abe T, Ohuchida K, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M, Novel role of peritoneal mesothelial cells that lead to pancreatic cancer peritoneal dissemination formation, The 47th Annual Meeting of American Pancreatic Association, 2016 年

〔図書〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：大塚 隆生

ローマ字氏名：(OHTSUKA, takao)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：20372766

研究分担者氏名：大内田 研宙

ローマ字氏名：(OHUCHIDA, kenoki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号（8 桁）：20452708

研究分担者氏名：宮坂 義浩

ローマ字氏名：(MIYASAKA, yoshihiro)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号（8 桁）：40507795

(2016 年度)

研究分担者氏名：森山 大樹

ローマ字氏名：(MORIYAMA, taiki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：70586859

(2016 年度)

研究分担者氏名：三好 圭

ローマ字氏名：(MIYOSHI, kei)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：70755272

研究分担者氏名：江口 大樹

ローマ字氏名：(EGUCHI, daiki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：共同研究員

研究者番号 (8 桁)：90726390

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：