

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10598

研究課題名(和文) スフェロイドによる膵癌微小環境再現と代謝物マッピングによる間質リモデリング解析

研究課題名(英文) Reproduction of the three dimensional coculture model reflecting pancreatic cancer microenvironment and metabolic analysis for the stromal remodeling by MALDI Mass-spectrometry Imaging.

研究代表者

坂井 寛 (SAKAI, Hiroshi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80611665

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)：本研究は、膵癌組織および膵癌微小環境再現モデルに対するマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング(MALDI-MSI)によって代謝物解析を行い、癌間質相互作用および間質リモデリングに特異的な代謝物を同定することを目的とした。膵癌細胞と膵星細胞の三次元共培養系を用いて膵星細胞のEndo180による間質リモデリング機構を明らかとした。また、凍結切片を用いるMALDI-MSIを施行するにあたりヒト膵癌組織由来オルガノイドを用いた膵癌微小環境モデルを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の質量分析法では、代謝物の抽出・濃縮が不可欠で組織内局在情報が失われてしまうが、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング(MALDI-MSI)を用いることで、メタボローム情報を組織上にマッピングすることが可能となった。本研究は、膵癌組織および3次元培養モデルに対するMALDI-MSIを用いた代謝物解析、間質リモデリングに特徴的な因子の同定を行った。膵癌組織に特徴的な代謝産物を同定し、そのメカニズムを明らかにすることによって早期診断・新規治療法確立の手がかりを探ることにつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, metabolite analysis was performed by MALDI-MSI on pancreatic cancer tissues and pancreatic cancer microenvironment reproduction models. We tried to detect metabolites specific to cancer - stromal interaction and stromal remodeling. The three-dimensional co-culture system clarified the mechanism of pancreatic stellate cells remodeling the stroma by Endo 180. In addition, for performing MALDI-MSI on frozen sections, we developed pancreatic cancer organoid models reflecting the tumor microenvironment derived from human pancreatic cancer. From now on, we will perform metabolome mapping by MALDI-MSI using the model, and continue to search for metabolites characteristic of the stromal remodeling.

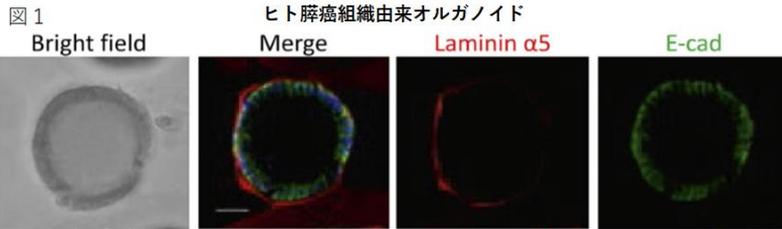
研究分野：医歯薬学

キーワード：MALDI-MSI Energy Charge 凍結組織アレイ バイオマーカー検索

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

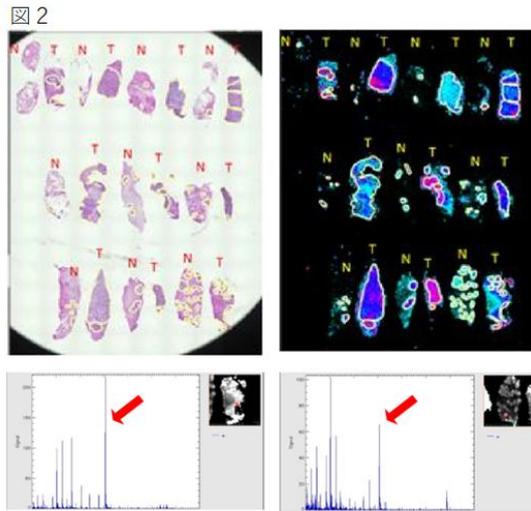
1. 研究開始当初の背景

膵癌は癌死の5位を占めながら100人中3人しか根治しない疾患である。80%の患者は切除不能進行癌で発見され、化学療法・放射線療法といった集学的治療が行われる。5年生存率はこの30年間ほとんど改善がみられず、他の消化器癌に比較しても、その治療効果は乏しい状況であり、治療成績を向上させるための新たな治療ターゲットが求められている。



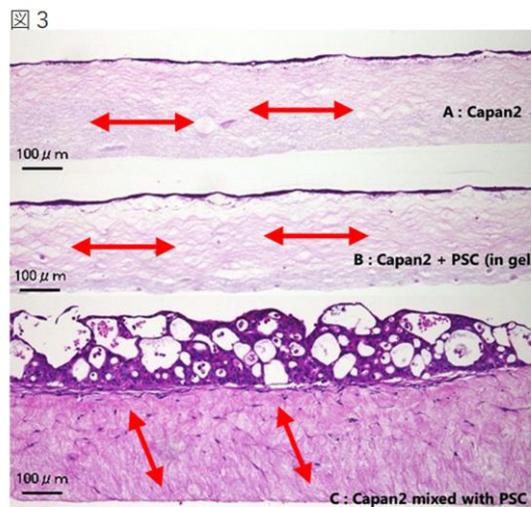
膵癌の特徴の一つとして間質が豊富で非常に硬い腫瘍を形成することがあげられる。それにより抗癌剤の到達が妨げられるだけでなく、癌間質相互作用により、腫瘍細胞の悪性度に関わる浸潤能・転移能獲得を促しているという報告がなされており（Nature, 2012, Amai Lujambio&Scott W. Lowe）、我々も同様の報告を行った（Gastroenterology, 2010, N Ikenaga）。これまでも間質を構成する細胞の役割に着目してきたが、オルガノイドとよばれる生体内に近い立体的な構築をもった腫瘍細胞の培養方法が確立され周囲微小環境との相互作用の評価が可能となり、その解析を進めている。（図1）

近年、機器の発展に伴い、DNAやRNAおよびタンパク質に加えて有機酸・アミノ酸など低分子化合物といった微量な代謝産物を分析できるようになった。代謝産物は最終的形質発現の集合であり、それらを網羅的に分析するメタボローム解析は癌間質相互作用に特異的な活性を特定・解明する上で重要な意味を持つと考えられる。従来の質量分析法では組織内局在情報が失われていたが、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング（MALDI-MSI）により凍結組織切片を用いたマッピングが可能となり、免疫染色など他の実験で得られた結果の相互参照が可能となった。（図2）



20個の凍結膵腺組織をアレイしたブロックのH&E像（左上）とMALDI-MSI像（右上）腫瘍部（左下）および正常（右下）部位におけるMALDI-MSI結果。矢印のピーク強度に大きな差が認められる

これまでに膵癌の悪性度を高める因子の検討を進め、複数の関連分子やmiRNA及び膵由来間質細胞や膵星細胞などが膵癌の浸潤能や転移能を増強することを明らかにしてきた（Surgery, 2013, D Eguchi; Surgery, 2012, K Nakata）。これら研究の過程で癌細胞が浸潤する際に膵星細胞による間質のリモデリングが起こっていることが明らかになり（図3）、これに着目しオルガノイドによる癌間質相互作用の解析を進めている。



癌間質相互作用に伴う間質リモデリング例。水平に配列していた間質成分が(A,B)、垂直方向に変化している(C)。

また、MALDI-MSIを用いた実験では、既に手術切除標本由来凍結癌組織中の代謝産物同定を進めており、これらの研究を通じて得られた知見及び技術により、膵癌の癌間質相互作用で生じる間質リモデリング機序を代謝物の観点から解明することが可能であり、それにより得られた癌浸潤に関わる新しい知見が新たな膵癌診断・治療の開発につながるのではないかと考え、本研究計画を構想するに至った。

2. 研究の目的

膵癌オルガノイドと膵星細胞の3次元共培養モデルを作成し、MALDI-MSIによって膵癌の特徴である高い浸潤能および間質の増生に特徴的な代謝産物を同定し、そのメカニズムを明らかにすることによって早期診断・新規治療法確立の手がかりを探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 手術切除標本由来組織を用いたメタボロームマッピング

まずは基礎的検討として、膵癌・膵炎・正常膵組織の手術切除標本（各5例）を用いて空間分析密度を高めた高解像度マッピングを含むメタボロームマッピングを行う。

(2) ヒト膵癌細胞と膵星細胞の3次元共培養モデルを用いた間質リモデリングにおける標的因子の同定

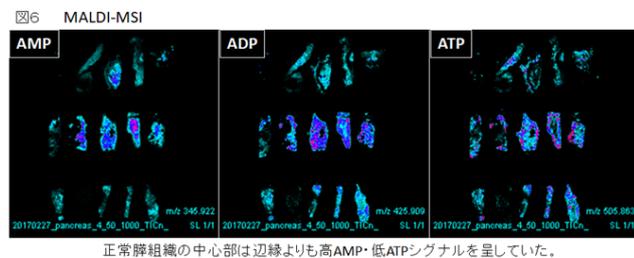
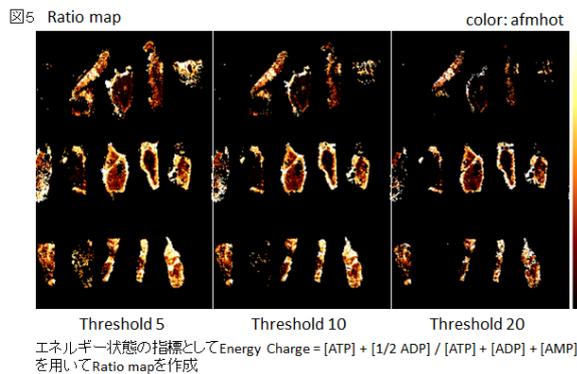
膵癌細胞と膵星細胞を用いてコラーゲンゲル3次元共培養系を作成し、間質リモデリングにおける標的因子を検索する。

(3) ヒト膵癌オルガノイドと膵星細胞を用いた3次元共培養モデルの作成およびMALDI-MSIによるメタボロームマッピング

より生体内を反映したヒト膵癌オルガノイドを用いた3次元共培養モデルの凍結切片を作成し、MALDI-MSIによるメタボロームマッピングを行い、上記標的因子および間質リモデリングにおける代謝産物を検証する。

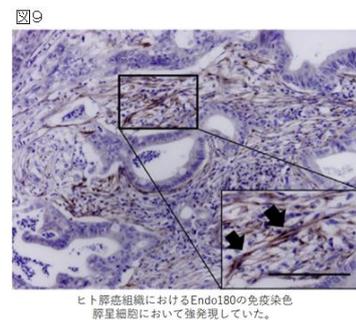
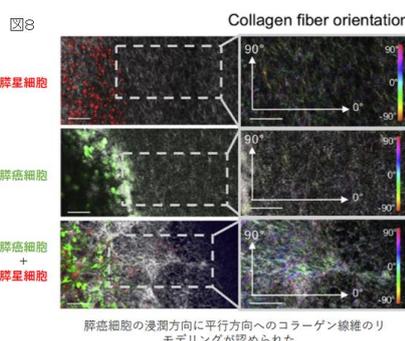
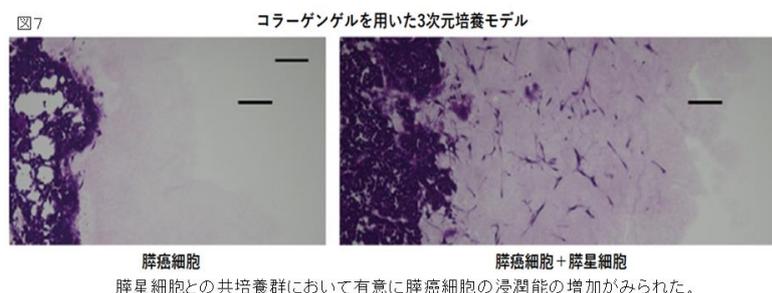
4. 研究成果

まず、ヒト手術切除検体より膵癌、慢性膵炎および正常膵組織を各5例ずつ採取し、MALDI-MSIを用いたメタボロームマッピングを行い、一部サンプルに対しては空間分析密度を高めた高解像度マッピングを行った。(図4) エネルギー状態の指標としてEnergy charge (EC = (ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP))を用いて画像の再構築を行った。(図5) 腫瘍組織においてはECが高い傾向が見られた。一方で、以前検討を行った乳腺組織とは異なり、正常膵組織サンプルは中心部で低いECを示していた。同部位ではサンプル辺縁の膵組織よりも高AMPおよび低ATPシグナルを呈していた。(図6)



次に、膵癌に特徴的な desmoplasia と呼ばれる間質成分増生を含む間質リモデリングにおける代謝物の変化を分析するため、膵癌細胞と膵星細胞の3次元共培養系による間質リモデリング因子の検索を行った。膵癌細胞単培養群と比較して、膵星細胞との共培養群において膵癌細胞の浸潤能が有意に亢進していた。(図7)

また、膵癌細胞の浸潤に伴い、膵星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、コラーゲン線維をリモデリングすることにより浸潤する膵癌細胞に沿って平行



な線維方向を増加させた。(図8)

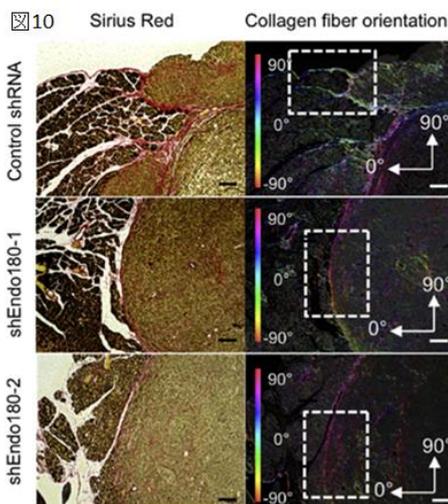
以上から、膵星細胞による間質リモデリングに寄与する因子を検索したところ、コラーゲンを細胞内に取り込む上で必須のタンパクとされる Endo180 が膵星細胞において強発現していた。(図9)

同因子が膵星細胞による間質リモデリングに寄与していると仮定し、膵星細胞での Endo180 ノックダウンを行い、膵癌細胞の浸潤能を評価した。In vitro および in vivo において、膵星細胞の Endo180 をノックダウンすることにより膵癌細胞の浸潤能の有意な低下を認め、膵星細胞による間質リモデリングを有意に抑制した。(図10)

以上から、膵星細胞は Endo180 によってコラーゲンを細胞内に取り込むことで間質リモデリングを行っていると考えられ、間質リモデリング関連タンパク質としての Endo180 および膵星細胞に取り込まれたコラーゲン線維の代謝産物の検索を行うため、より生体内に近い膵癌と膵星細胞の3次元共培養モデルの作成を行った。これまでの共培養モデルでは細胞間接着が疎であり、凍結切片の薄切時にゲル構造が壊れてしまうため困難であった。そこでこれまでの共培養モデルを改良し、膵癌オルガノイドと膵星細胞を用いた実際の組織形態を反映した微小組織モデルの作成を行った。

(図11) 同組織は膵癌オルガノイドと膵星細胞を ultra low attachment round bottom plate を用いた liquid overlay technique によって作成でき、膵癌オルガノイドと膵星細胞間の接着を強固とした。さらに、同組織を iPgel によって再固定後に凍結切片を作成することで癌周囲微小環境を壊すことなく培養組織の薄切が可能となった。

(図12) 今後はこの微小組織モデルを用いた MALDI-MSI によるメタボロームマッピングを行い、間質リモデリング関連タンパク質としての Endo180 および膵星細胞に取り込まれたコラーゲン線維の代謝産物の検索を検討している。



膵癌細胞と膵星細胞の同所移植モデル
膵星細胞のEndo180ノックアウト群において間質リモデリングが抑制された。

図11 膵癌オルガノイドと膵星細胞を用いた微小組織モデル

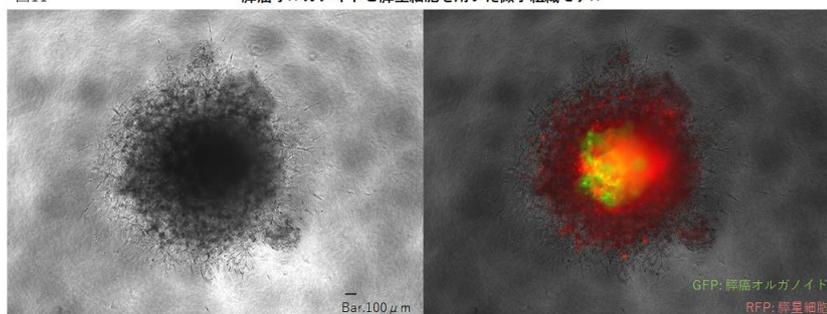
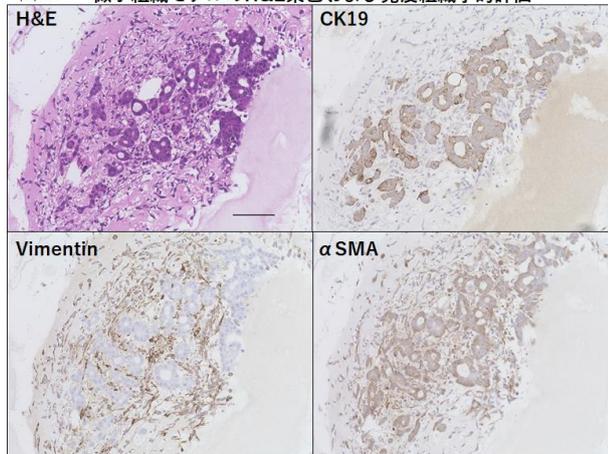


図12 微小組織モデルのH&E染色および免疫組織学的評価



癌周囲微小環境を壊すことなく薄切および組織学的評価が可能となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Nobuhiro Torata, Makoto Kubo, Daisuke Miura, Kenoki Ohuchida, Yusuke Mizuuchi, Yoshinori Fujimura, Eisuke Hayakawa, Masaya Kai, Yoshinao Oda, Kazuhiro Mizumoto, Makoto Hashizume, Masafumi Nakamura, Visualizing Energy Charge in Breast Carcinoma Tissues by MALDI Mass-spectrometry Imaging Profiles of Low-molecular-weight Metabolites, *Anticancer Res*, 38(7):4267-4272, 2018, 査読有, DOI: 10.21873/anticancer.12723
- ② 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

- ③ Abe T, Ohuchida K, Koikawa K, Endo S, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Cancer-associated peritoneal mesothelial cells lead the formation of pancreatic cancer peritoneal dissemination, *Int J Oncol*, 50(2), 457-467, 2017, 査読有, DOI:10.3892/ijo.2016.3829
- ④ Okumura T, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Koikawa K, Iwamoto C, Miura D, Mizuuchi Y, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells, *Oncotarget*, 8(11), 18280-18295, 2017, 査読有, DOI: 10.18632/oncotarget.15430

[学会発表] (計 7 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, 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
- ③ 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
- ④ Okumura T, Ohuchida K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M, Adipose Tissue Derived Stromal Cells Accelerate Tumor Progression and Desmoplasia of Pancreatic Cancer, The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association, 2017 年
- ⑤ 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
- ⑥ Okumura T, Ohuchida K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M, Fatty Acid Uptake via CD36 Enhances Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells, The 47th Annual Meeting of American Pancreatic Association, 2016 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

[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：
 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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：水元 一博
ローマ字氏名：(MIZUMOTO, kazuhiro)
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）：90253418

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
（2018年度）

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。