

令和元年6月11日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10600

研究課題名（和文）治療誘導性secretomeにかかわる膵癌微小環境の新たな機序解明とその制御

研究課題名（英文）Elucidation and control of the microenvironment of pancreatic cancer

研究代表者

真鍋 達也（Manabe, Tatsuya）

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：60546464

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）：膵癌では治療感受性の異なる細胞が分泌するsecretomeや間質リモデリング能力が治療抵抗性の原因と考え、治療誘導性のsecretomeに注目して微小環境の機序を検討した。現在までに、我々が確立した微小環境モデルにおいて、癌の浸潤、遊走に関わるsecretome因子が複数同定できているので、今後は、最終目標である治療抵抗性に関わるsecretome因子の同定を勧めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討で癌の浸潤、遊走に関わるsecretome因子が複数同定できているので、治療抵抗性に関わるsecretome因子の同定を勧めていき、新たな治療戦略の一助になることを期待する。

研究成果の概要（英文）：Secretome or activity of stromal remodeling may cause refractory pancreatic cancer. The system of microenvironment around pancreatic cancer was examined regarding therapy-inducible secretome. Using our established microenvironment model, several secretomes affecting cancer invasion and migration were identified. In the future, secretome affecting treatment resistance would be identified as a final goal.

研究分野：腫瘍学、外科学

キーワード：膵癌 膵癌微小環境 治療誘導性secretome 治療抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌の5年生存率は5%と低く、固形癌の中で最難治癌であり、新規膵癌治療法の確立は社会的急務である。高い浸潤・転移能と治療抵抗性が膵癌の難治性に寄与するが、従来の腫瘍細胞のみを対象とした研究からは革新的な治療法の開発に至らず、現在、癌微小環境を含めた研究・治療戦略を立案する視点が重要となっている。

今日、膵癌では治癒切除が唯一の根治治療であるが、80%の患者が進行癌で見つかり、その多くは既に切除不能である。非切除膵癌患者に対する化学療法として、第一選択薬であるGemcitabineが予後を改善するとの報告(JAMA, Oettle 2007)から、Gemcitabine + Erlonitib 併用群が Gemcitabine 単独に比べ有効であること (J Clin Oncol, 2007, Moore)、最近では海外第相試験(MPACT 試験)において、Gem 単独と比較し、nab-PTX 併用群が OS、PFS、奏効率のいずれにおいても有意に優れていること (N Engl J Med, 2013, Hoff) が報告されたが、いまだ予後不良であり、新たな治療薬の開発や治療抵抗性の改善が切望されている。

これまでに、癌細胞集団には heterogeneity が存在し、少数の治療抵抗性癌細胞クローンの存在により、早期に分子標的薬に対して薬剤耐性を獲得することが報告されているが、詳細な機序に関しては明らかでない (Cancer Cell, 2014, Shi)。最近、メラノーマにおいて、分子標的薬の投与により癌細胞の中の一部の治療感受性細胞集団が secretome を分泌することで周囲の癌細胞の治療抵抗性が高まることが報告された (Nature, 2015, Obenaus)。secretome は、細胞外基質成分や細胞から分泌される液性因子などのタンパク質を含み、細胞間相互作用に関わるが、癌関連 secretome の報告は少ない (Mol Oncol, 2010, Kulasingam)。また、分子標的薬の投与によって、メラノーマ間質がリモデリングされ、線維芽細胞が活性化されることにより治療抵抗性が高まることも報告されている (Cancer Cell, 2015, Hirata)。これらの報告から、膵癌においても、各種治療により誘導される secretome の変化が間質リモデリングを誘導し、治療抵抗性を高める原因となっている可能性がある。

2. 研究の目的

heterogeneity がある膵癌においては、治療によって治療感受性がある特定の細胞集団が分泌する secretome やこれらの細胞が引き起こす膵癌間質のリモデリングが治療抵抗性の原因となっているのではと考えた。治療誘導性の secretome にかかわる膵癌微小環境の新たな機序を解明し、それらを制御することにより、治療抵抗性の改善を目指したこれまでにない治療法の開発につなげることを目的とする。我々は、これまでの膵癌細胞、PSC の heterogeneity に注目した詳細な細胞間ネットワークについて解明を進めてきた。本研究では、これらの経験をもとに、治療誘導性 secretome の与える影響を、癌細胞と微小環境両者の heterogeneity に着目して研究を行う。

3. 研究の方法

膵癌細胞株や患者由来の細胞を用いて、微小環境モデルを作成し、微小環境にかかわる secretome に関して検討した。治療に関わる因子の同定を試みた。

4. 研究成果

膵癌微小環境に特徴的な 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 secretome の変化を分析するため、膵癌細胞と膵星細胞の3次元共培養系を用いて、secretome の一部である間質リモデリング因子の検索を行った。この共培養モデルでは膵癌細胞を単独培養した場合と比べて、膵星細胞いわゆるPSCとの共培養した場合、膵癌細胞の遊走能、および、浸潤能が有意に亢進した。また、タイムラプスを用いたりリアルタイム顕微鏡観察を行ったところ、膵癌細胞の浸潤に先立って、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ていた。以上から、膵癌微小環境中に存在する膵星細胞は、間質リモデリングに寄与する何らかの secretome 因子を放出していることが明らかになった。そこで、このPSC細胞集団に特有な分子を同定するために、RNAレベル、蛋白レベル、あるいは代謝産物レベルで、網羅的に検索した。さらに膵癌オルガノイドモデルを用いることで、PSCが基底膜を破壊してオルガノイドのコラーゲンゲル内への浸潤を促進する現象も明らかになった。既存の細胞株だけでなく、患者由来の膵癌細胞においても、患者由来のPSCによって浸潤が導かれることが明らかになった。このモデルを用いて、さらに特定の分子に関して解析をすすめたところ、MMP2が膵星細胞において分泌しており、これがこの現象に関与していることが明らかになった。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MMP2を抑制し、同モデルにおいて、膵癌細胞の浸潤能を評価したところ、Invitro および in vivo において、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も有意に低下していた。Vivoのモデルでは、腫瘍辺縁の浸潤部と非浸潤部のコラーゲン繊維の向きや量に著名な差があり、この secretome 因子としてのMMP2の関与を深く意義付けるものであった。

以上から、膵星細胞はMMP2 によってマトリゲルやコラーゲンを含む間質のリモデリングを行っていると考えられた。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めざしたが、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。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。現在、このモデルを用いた解析をすすめている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nakayama H, Ohuchida K, Yoshida M, Miyazaki T, Takesue S, Abe T, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Shirahane K, Manabe T, Ohtsuka T, Toma H, Tominaga Y, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Degree of desmoplasia in metastatic lymph node lesions is associated with lesion size and poor prognosis in pancreatic cancer patients, *Oncol Lett*, 14(3)3141-3147, 2017, 査読有, DOI: 10.3892/ol.2017.6549

〔学会発表〕(計4件)

中山宏道、大内田研宙、安藤陽平、岐部晋、武居晋、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、大塚隆生、中村雅史、膵癌転移の新知見：癌細胞塊のリンパ管内皮透過性亢進による転移形成促進機構の発見、第73回日本消化器外科学会総会、2018年

中山宏道、大内田研宙、相良亜希子、米永晃子、安藤陽平、岐部晋、武居晋、肥川和寛、巖子龍、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、藤田逸人、永井俊太郎、岡部安博、大塚隆生、水元一博、中村雅史、膵癌リンパ節転移におけるリンパ管内皮細胞の役割についての検討、第49回日本膵臓学会大会、2018年

Nakayama H, Ohuchida K, Takesue S, Kibe S, Ando Y, Abe S, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Shirahane K, Tominaga Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M, A novel mechanism in lymphatic metastasis of pancreatic cancer, The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association, 2017年

中山宏道、大内田研宙、武居晋、安藤陽平、岐部晋、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、巖子龍、吉田真樹、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、膵癌のリンパ節転移における新たな機序の解明、第117回日本外科学会定期学術集会、2017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：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：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

研究分担者氏名：池永 直樹

ローマ字氏名：(IKENAGA, Naoki)

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): 90759755

(2016年度)

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

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。