

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04284

研究課題名(和文) 膵オルガノイドを用いたリーディングPSC誘導基底膜破壊機序解明と基底膜制御法開発

研究課題名(英文) Elucidation of leading PSC induced basement membrane destruction mechanism and development of the regulating method by using pancreatic organoids

研究代表者

大内田 研宙 (OHUCHIDA, Kenoki)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20452708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、膵癌オルガノイドを用いて、膵星細胞がいかにして膵癌組織の基底膜破壊を行い、膵癌細胞の浸潤を支持しているかを解明し、その制御法の開発を目的とした。膵癌オルガノイドは実際の膵癌組織と同様に基底膜を形成しており、膵星細胞との3次元共培養モデルによって膵星細胞が基底膜破壊を介して膵癌細胞浸潤を促している様子をリアルタイムで観察できた。また、膵星細胞によるMMP2およびMT1-MMPを介した基底膜破壊が膵癌細胞浸潤を支持していることがRNA干渉によるin vitro/in vivo試験を通して解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の予後を規定する癌浸潤メカニズムを解明するために、膵星細胞のleading cellとしての機能に着目して研究を行い、膵星細胞がMMP2およびMT1-MMPによる基底膜破壊を介して膵癌細胞浸潤を支持していることを解明した。膵星細胞のleading cellとしての機能を解明した研究はこれまでになく、これらを制御することで膵癌細胞浸潤を抑制する新規の制御法の開発が可能となった。その制御法を確立し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 this study, we investigated how pancreatic stellate cells (PSCs) disrupt the basement membrane of pancreatic cancer tissue and support the invasion of pancreatic cancer cells by using pancreatic cancer organoids, and aimed to develop a regulating method therefor. Pancreatic cancer organoids formed a basement membrane similar to the pancreatic cancer tissue, and a three-dimensional co-culture model with PSCs revealed that PSCs promoted pancreatic cancer cell invasion through basement membrane destruction in real time observation. In addition, it was clarified through in vitro / in vivo assays by RNA interference that the basement membrane destruction mediated by MMP2 and MT1-MMP of PSCs supported pancreatic cancer cell invasion. In the future, we will identify specific pancreatic stellate cells that function as leading cells and develop a novel method for regulating pancreatic cancer invasion by controlling them.

研究分野：医歯薬学

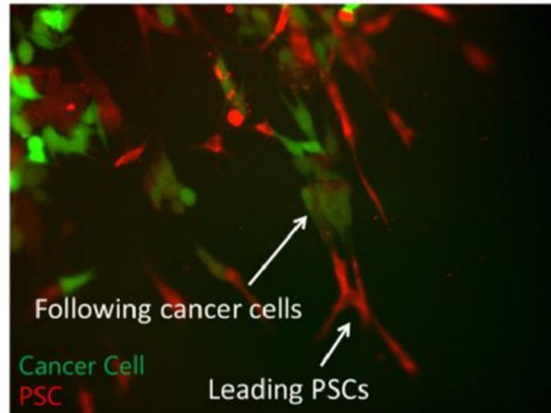
キーワード：膵癌 膵星細胞 リーディングセル 基底膜破壊 MMP2 MT1-MMP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

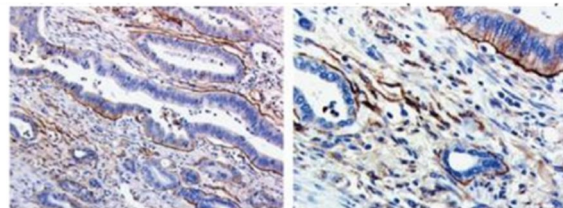
1. 研究開始当初の背景

膵癌は我が国における死亡率の第4位であり、ここ30年ほとんど生存率の改善がない。外科的切除が唯一の根治法であるが、多くは切除不能で、たとえ根治切除ができてもその5年生存率は15%であり、膵癌の新規治療法の開発は社会的要求度・貢献度・緊急性が高い。膵癌はDesmoplasiaを病理学的特徴とし、この豊富な癌間質は栄養血管と膵癌細胞の間隙を増大させ(Science, 2009)、特有の細胞外基質配列(Pancreas, 2012)によって癌細胞への薬剤到達を阻害し、膵癌の治療抵抗性を高めているとされる。癌細胞は癌間質相互作用でその悪性度を増すが(Nature, 2004)、その中で膵星細胞(Pancreatic Stellate Cell: PSC)は癌関連線維芽細胞(cancer associated fibroblast: CAF)としてDesmoplasiaを促し、種々の液性因子を分泌することで膵癌の悪性形質を誘導する責任細胞として注目されているが、その機構は未だ不明な点が多い。他癌腫では癌浸潤を先導するleading cellの存在が報告されており、扁平上皮癌では線維芽細胞がECM分解能により癌細胞に先んじて間質内を浸潤し、癌細胞の通る空間を形成することが観察されている(Nature Cell Biol, 2009)。

(図1) PSCがleading cellとして癌浸潤を先導する



(図2) 膵癌組織における基底膜染色(Laminin α5)



J.A. van der Zee et al., British Journal of Cancer, 2012.

我々はこれまでに膵癌細胞とPSCの3D共培養モデルでPSCが膵癌細胞を先導し、その際にPSCがコラーゲンゲル層を収縮し、線維方向を変化させてleading cellとしての役割をはたすことを明らかにした(図1)。一方、基底膜破壊は癌の進展における最初のステップであるが、我々の最近のオルガノイドを用いた研究では、癌基底膜に直接作用し基底膜破壊を先導するリーディングPSCの存在を示唆する知見が得られていた。さらには膵癌組織において分化型の管状腺癌などは正常膵管と同様に内腔と反対側に基底膜を有しており(図2)、基底膜の破壊や再生は、単に非浸潤癌が浸潤癌になる際だけでなく、浸潤癌自体が管状構造を維持しながら浸潤する際にも関わっている可能性が考えられた。現在までに膵オルガノイドを用いて基底膜構造をin vitroで再現でき、より生体内に近い環境で検討が行えるようになったことから、基底膜破壊の機序とこれを誘導するleading PSCを解析可能となった。そこで、基質リモデリングだけでなく、基底膜破壊/再生を介して微小浸潤から進行癌の局所浸潤や転移巣の周囲組織への浸潤まで含めた浸潤形態へのleading PSCの機能的関与を明らかにして、その機序の制御することによって癌進展制御を実現できるのではないかと考え、本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

膵オルガノイドによりin vitroで基底膜を再現し、膵星細胞存在下における癌細胞の基底膜破壊から周囲間質へ浸潤する過程をリアルタイムに解析することで、膵星細胞による基底膜破壊、基質リモデリングから間質浸潤への機序を解明し、その制御により癌浸潤(微小浸潤から進行癌局所浸潤まで)に対する新たな治療アプローチの創出することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト膵癌組織から膵癌オルガノイドおよびPSCの樹立および3次元共培養モデルの作成

膵癌オルガノイドは、コラーゲン分解酵素およびGentleMACS(Miltenyi Biotec社)を用いて切除組織から膵癌細胞を分取し、基底膜マトリックスを用いた3次元培養を行って細胞を培養した。培養液にWnt, Rspodin-1, EGF, TGF inhibitorなどのニッチ因子を加えることで、膵癌オルガノイドの樹立を行った。また、outgrowth法により膵星細胞の樹立も行った。これらをコラーゲンIゲルを用いて3次元共培養を行った。

3次元共培養を用いた、タイムラプスイメージングによる基底膜破壊を誘導するリーディングPSCの同定および機能解析

基底膜破壊から間質浸潤といった癌細胞の進展を再現するため、3次元培養モデルを用いて微小環境を再現し、その様子をタイムラプスを用いたリアルタイムイメージングで観察した。基底膜破壊および間質浸潤を誘導するリーディングPSCを同定し、その機能を解析した。

リーディング PSC による基底膜破壊を誘導する標的因子の同定および標的因子ノックダウン PSC の樹立

基底膜破壊に関わっていると考えられる標的因子を同定し、sh-RNA を用いた標的因子のノックダウンを行った。

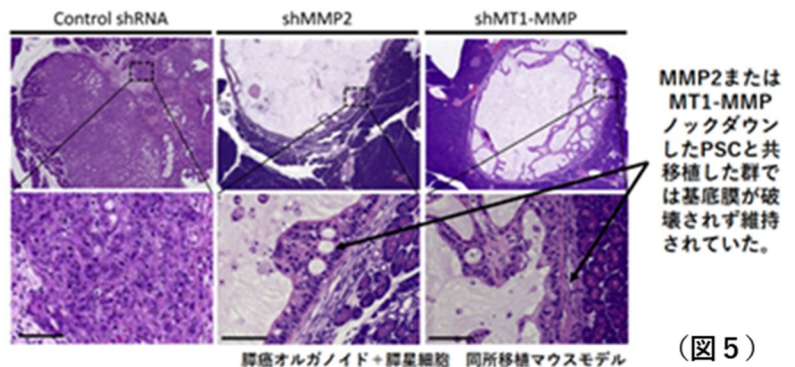
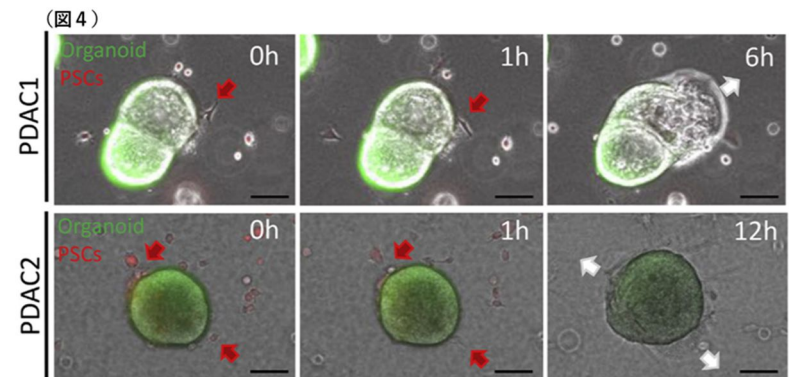
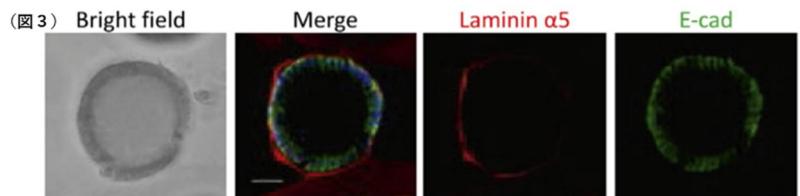
In vitro / in vivo における標的因子抑制による PSC 基底膜破壊および膵癌細胞の浸潤抑制の確認

標的因子をノックダウンした PSC と膵癌オルガノイドを用いた 3 次元共培養モデルおよびマウスへの同所共移植モデルを用いて、膵癌オルガノイドの基底膜破壊および膵癌細胞の浸潤能について評価し、同因子抑制による膵癌浸潤抑制につながるかを検証した。

4. 研究成果

まず、ヒト膵癌組織から膵癌オルガノイドおよび膵星細胞をそれぞれ樹立し、基底膜構成成分である Laminin 5 を蛍光免疫染色法により染色することで膵癌オルガノイドの基底膜構造を確認した(図3)。次に、樹立した膵癌オルガノイドと膵星細胞をコラーゲン I ゲル内で 3 次元共培養を行い、基底膜破壊から癌細胞浸潤に至る経過を、タイムラプスイメージングを用いてリアルタイムに観察を行った。PSC と共培養したモデルでは、膵癌オルガノイドは基底膜および管腔構造を失い、膵癌オルガノイド単培養よりも頻りにコラーゲン I マトリックス内に浸潤した。その際に、膵癌オルガノイドに隣接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(図4)。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。すると、膵星細胞の MMP2 または MT1-MMP ノックダウンは、膵星細胞によるオルガノイドの基底膜破壊を有意に弱め、管腔構造を維持させた。これらの結果から膵星細胞による直接接触が、膵星細胞上の MT1MMP に結合する MMP2 を介した膵癌の基底膜破壊および間質浸潤を誘導することが示唆された。

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5) 以上より、膵癌細胞の浸潤において、膵星細胞が MT1-MMP を介して癌細胞基底膜を破壊し、leading cell として癌細胞の浸潤を支持していると考えられた。また、こうした leading PSC の制御が膵癌細胞の浸潤能の抑制につながると考えられた。



(図5)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okumura T, Ohuchida K, Nakamura M	4. 巻 1882
2. 論文標題 An In Vitro Three-Dimensional Organotypic Model to Analyze Peripancreatic Fat Invasion in Pancreatic Cancer: A Culture System Based on Collagen Gel Embedding	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 135 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8879-2_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koikawa Kazuhiro, Ohuchida Kenoki, Ando Yohei, Kibe Shin, Nakayama Hiromichi, Takesue Shin, Endo Sho, Abe Toshiya, Okumura Takashi, Iwamoto Chika, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Nagai Eishi, Mizumoto Kazuhiro, Hashizume Makoto, Nakamura Masafumi	4. 巻 425
2. 論文標題 Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 65 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.03.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Iwamoto C, Ohuchida K, Ando Y, Shinkawa T, Ohtsubo Y, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyawaki K, Ohtsuka T, Akashi K, Eto M, Nakamura M
2. 発表標題 BM-Derived Cells Destruct Basement Membrane and Induce Local Invasion of Pancreatic Cancer
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本千佳、大内田研宙、安藤陽平、新川智彦、大坪慶志輝、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、宮脇恒太、赤司浩一、江藤正俊、中村雅史
2. 発表標題 膵癌微小環境を構築する骨髄由来細胞が膵癌浸潤を先導する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本千佳、大内田研宙、武居晋、進藤幸治、宮脇恒太、赤司浩一、橋爪誠、江藤正俊、中村雅史
2. 発表標題 膵臓に誘導され膵癌微小環境を構成する骨髓由来細胞が膵癌浸潤を制御する
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岐部晋、大内田研宙、新川智彦、大坪慶志輝、松本奏吉、相良亜希子、米永晃子、馮海旻、関維雨、安藤陽平、武居晋、中山宏道、巖子龍、進藤幸治、森山大樹、仲田 興平、永井俊太郎、宮坂義浩、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 膵癌局所浸潤部における癌関連腺房導管異型性は癌局所浸潤に寄与する
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Endo180 Expression and Histologic Categorization in Cancer Stroma is an Independent Prognostic Index in Pancreatic Cancer.
3. 学会等名 49th Annual Meeting of the APA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 Pancreas 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米永晃子、肥川和寛、大内田研宙、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 膵オルガノイドを用いた浸潤性膵管癌の新たな局所微小浸潤機序の解明
3. 学会等名 第49回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Pancreatic organoids elucidate the new mechanisms of pancreatic cancer local invasion
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩本 千佳 (IWAMOTO Chika) (10752842)	九州大学・大学病院・特任助教 (17102)	
研究分担者	大塚 隆生 (OHTSUKA Takao) (20372766)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	村田 正治 (MURATA Masaharu) (30304744)	九州大学・先端医療イノベーションセンター・特任教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤田 逸人 (FUJITA Hayato) (40611281)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	池永 直樹 (IKENAGA Naoki) (90759755)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	宮坂 義浩 (MIYASAKA Yoshihiro) (40507795)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	