

令和 4 年 9 月 9 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07518

研究課題名(和文) 樹立したヒト膵腺房細胞癌細胞株を用いた発がん細胞分化に関する研究

研究課題名(英文) Research on carcinogenesis and cell differentiation using established human pancreatic acinar cell carcinoma cell line

研究代表者

喜多 絵美里 (Kita, Emiri)

千葉県がんセンター(研究所)・消化器内科・医長

研究者番号：20773980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵腺房細胞癌は希少な癌種であり、癌化メカニズムや薬剤の有効性に関して不明な点が多い。今回、ヒト膵腺房細胞癌由来オルガノイドの培養に成功し、組織学的検索、蛋白質発現解析および遺伝子解析を行い、膵腺房細胞癌の特徴が保持されていることを確認し、その基礎的なデータを収集することが可能となった。また、培養細胞を用いて薬剤スクリーニングを行い、ボルテゾミブを新規治療候補薬として同定するとともに、遺伝子改変を行うことで、癌幹細胞関連マーカーの癌化プロセスへの関与を検討することが可能となった。これらの結果は本細胞株の膵腺房細胞癌研究における有用性を示唆するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵腺房細胞癌は膵腫瘍の中でも希少な癌種であり癌化メカニズムは未解明であった。今回オルガノイド培養法で得られた腺房細胞癌由来オルガノイドはより生体に近い3次元培養環境下で培養可能であり、なおかつ2次元培養細胞に比して増殖が速く安定しており、遺伝子変異の導入や薬剤スクリーニングなど、保存検体では難しい種々の各種解析を行える他、マウスに皮下腫瘍を形成させることでin vivoの検討も可能であることが確認された。得られた細胞は実際にボルテゾミブが有効であることを発見し、細胞の遺伝子改変により癌化メカニズムに関する検討も可能であったことから、本研究は臨床的にも学問的にも意義深いものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic acinar cell carcinoma is a rare type of cancer, and there are many unknowns regarding the mechanism of carcinogenesis and the efficacy of drugs. In this study, we succeeded in culturing human pancreatic acinar cell carcinoma-derived organoids and performed histological search, protein expression analysis, and genetic analysis to confirm that the characteristics of pancreatic acinar cell carcinoma were retained and to collect basic data on the disease. In addition, drug screening was conducted using cultured cells to identify bortezomib as a novel therapeutic candidate, and genetic modification enabled us to examine how cancer stem cell-associated markers are involved in the oncogenic process. These results suggest the usefulness of this cell line in the research of pancreatic acinar cell carcinoma.

研究分野：消化器内科

キーワード：腺房細胞癌 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

膵腫瘍は多くが膵管癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma: PDAC) であり、膵腺房細胞癌 (pancreatic acinar cell carcinoma: PACC) は 1% と稀な腫瘍である。組織学的には膵正常腺房と類似の構造を呈し、外分泌機能を持ち、膵酵素産生が高頻度で認められる。半数以上は遠隔転移を有する段階で発見されるが、まれな腫瘍であり有効な化学療法は定まっていないのが現状である。

三次元オルガノイド培養法は、生体に近い生理的な環境下で半永久的に細胞を増殖させることが可能な培養法であり、創薬のための前臨床モデルとして、その有用性に注目が集まっている。近年様々な癌種にも応用され、得られたがん患者由来オルガノイドは原発巣の形態学的特徴や遺伝子異常、不均一性などを保持していると言われている。我々はこれまでにマウスオルガノイドへの遺伝子導入に基づく腸、肺、胆管 (Ochiai M, et al, Carcinogenesis, 2019)、膵 (Matsuura T, et al, Carcinogenesis, 2019) の発がんモデルや化学発がんモデル (Naruse M, et al, Carcinogenesis, 2020) を確立しており、今回、希少癌である PACC 患者由来腫瘍細胞から得られた 3 次元培養腫瘍細胞を用いて、PACC の病態解明および治療法の開発に資する細胞株の樹立、解析を行うこととした。

2. 研究の目的

ヒト膵腺房細胞癌由来微量検体から 3 次元オルガノイド培養法により増幅させた培養細胞は貴重な研究資料であるため、詳細かつ網羅的な解析により細胞株としての特性を明らかにした上で、研究への利用可能性を検証することを目的とし、本研究を行った。

3. 研究の方法

研究 1. 細胞株としての特性評価

今回用いたヒト膵腺房細胞癌由来細胞株について、オルガノイドから皮下腫瘍を作成し原発巣と比較し組織学的検討を行う。腺房細胞 (癌) マーカーの発現に関し、免疫組織学的検討、ウエスタンブロットを行い、たんぱく発現解析を行う。本細胞株では皮下腫瘍を作成することも可能であり、原発巣の手術検体、オルガノイド、皮下腫瘍を経たオルガノイド、それぞれにおける遺伝子変異の詳細に関して、409 癌関連遺伝子を標的とした次世代シーケンシング解析を行い比較を行うとともに、Comprehensive genomic hybridization (CGH) を追加してコピー数変化 (copy number variation, CNV) についても解析を行う。また、膵腺房細胞癌に特徴的な変化に関して RNA 解析を行う。

細胞株の機能解析に関しては、PACC に CD133 を導入し PDAC への分化転換や腫瘍形成能の増強が誘導されるかを検討する。CD133 は腺房細胞では発現していないが、導管細胞マーカーであり、多くの癌で癌幹細胞マーカーとしても知られ、さらに一部の癌では癌幹細胞性との機能的関連も報告されている。

研究 2. 治療薬・治療標的の探索

これまで細胞株が存在しなかったため、薬剤感受性に関するアッセイは実施不可能だった。膵癌で汎用される抗がん剤である Gemcitabine や nab-paclitaxel に加え、阻害剤キットを用いて一般的な薬剤感受性の評価を行う。これらのデータをもとに、標的候補の経路を抽出する。

4. 研究成果

(1) 膵腺房細胞癌由来オルガノイドの特性評価

膵腺房細胞癌由来オルガノイドの組織学的特徴に関する検討

膵腺房細胞癌患者の膵生検検体よりオルガノイド培養法にて腫瘍細胞を培養し、増幅させ、免疫不全マウスの皮下に移植し皮下腫瘍を得た。この皮下腫瘍が原発巣の性質を維持しているかを確認するため組織学的な検討を行ったところ、腫瘍は肉眼的に境界明瞭で壊死を伴い、組織像でも両染色細胞質を持つ細胞が一部腺腔形成を伴う充実性構造を呈して増殖しており、原発巣と同様の組織像であった。また、たんぱく発現に関する検討では、BCL10 陽性、トリプシン陽性、CD133 陰性であり、PACC として矛盾しない所見であった。

オルガノイドにおける遺伝子変異の保持

PACC 細胞株において原発腫瘍に特徴的な変異が保存されているかを検証するため、次世代シーケンシング (next-generation sequencing, NGS) 解析を行い、細胞株において遺伝子変異はおおむね保持されており、CDKN2A の 9 塩基欠失および ATRX の 1 塩基欠失はオルガノイドで濃縮される傾向を示した。また、手術検体では EP400 に変異アレル保有率 (variant allele frequency, VAF) が約 20% のミスセンス変異があったのに対し、オルガノイドでは同一の変異がほぼ 100% となっており、loss of heterozygosity (LOH) の存在が示唆された。手術検体で検出された CDKN2A の 9 塩基欠失が皮下腫瘍由来オルガノイドでは全く検出されなくなったが、CGH にて解析を進めると、手術検体では 1 コピーの 9 番染色体短腕が皮下腫瘍由来オルガノイドでは 0 コピーに減少しており、塩基欠失が解消されたわけではなく、より大規模な領域の欠損に進展したものと考えられた。

一方で、腺房細胞への分化を伴う膵癌 44 例を対象に遺伝子プロファイリングを行なった研究では、BRCA 等の DNA 修復関連遺伝子の変異が 45% の症例で認められ、これらとは相互排他的に BRAF および RAF の融合遺伝子が 23% で見られたとされ (Chmielecki et al, Cancer Discov, 2014)、本細胞株においても BRAF に関する RNA 解析を行った。PACC に特徴的な融合遺伝子の中で最も頻度の高い SND1-BRAF について逆転写 PCR で検索したが、融合遺伝子に特異的な転写産物は検出されない結果であった。

CD133 は PACC の組織構造と腫瘍進展に重要な影響を及ぼさない

CD133 が PACC にどのような影響をもたらすかを観察すべく、PACC 細胞株に CD133 を導入し評価を行うこととした。まず、GFP をレンチウイルスベクターによってオルガノイド細胞株に導入し、効率良く遺伝子導入が可能な事を確認し、空ベクター (pCDH)、野生型 (WT)、および上記の 2 箇所に変異を導入した恒常的活性型 (EE)、恒常的不活性型 (FF) をそれぞれ細胞株に導入した。位相差顕微鏡での観察では、4 種のオルガノイドの形態に明らかな差は認めなかった。次に、皮下腫瘍を作成し評価を行った。腫瘍の容積は EE で増大する傾向があったものの有意差は認めず、組織像にも明らかな変化は認めなかった。これらの観察からは、CD133 は PACC において癌幹細胞性の増強や PDAC への誘導を示す作用はないものと考えられた。一方で、CD133 の導入による BCL10 陰性化例が認められたが、腫瘍に変化は認められず、BCL10 は PACC の形質維持に必須ではないことが示唆された。

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

培養環境による膵腺房細胞癌由来オルガノイドの形態変化に関する検討

本研究で用いた PACC オルガノイドは 3 次元培養下、無血清オルガノイド培養液を用いる環境において増殖することを確認している。細胞株の培養としては血清を添加した平面培養が一般的でもあり、PACC 由来オルガノイドの 2 次元培養環境下での変化について検討を行った。平面培養下で、10%の FBS のみを添加した培養液を用いた場合には全く増殖せず短期間で死滅し、無血清オルガノイド培養液で増殖した細胞は、典型的な細胞株とは異なり、底面との接着面が小さく上方に向かって発育し、一部は集塊となって浮遊しつつ増殖を継続した。増殖曲線を作成したところ、倍化時間は 3 次元培養で 1.7 日、平面培養で 2.4 日と 3 次元培養で増殖が速い傾向が見られた。

(2)治療候補薬の同定

PACC は希少疾患であり有効的な化学療法はなく、薬剤効果についてスクリーニングを行った。腫瘍細胞は 2 次元でも安定した増殖が得られていたが、半浮遊の形状によって薬剤効果判定が不正確になる可能性があるため、3D 培養での評価を行った。条件検討の結果、U 底の 96 ウェルプレートを使用することで、マトリゲル使用量を抑えつつ均等な細胞播種が安定的に実現可能なことを見出した。まず、膵癌に対する一般的治療薬への反応性を検討したところ、細胞生存率はパクリタキセルではコントロールと比較して約 80%低下、ゲムシタピンでは約 60%低下したが、いずれも完全な死滅には至らなかった(図 1)。この際、スキャナーで撮影した画像の解析から算出した生細胞の面積と ATP 濃度に比例する蛍光強度が相関することを確認し、イメージングによる薬剤の効果判定を行った。スクリーニングとして、364 種の薬剤を 10nM としてイメージングによる評価を行った。結果は、コントロールを含む大多数の薬剤が正規分布様の集団を形成したが、数種類の薬剤が明らかな有効性を示しており、これらのうち 6 種に対して単剤ごとにイメージングベースで効果を検証したところ、2 種では効果を再現できなかったものの、2 種では中等度の、残り 2 種では高度の治療効果を認めた(図 2)。そのうちのひとつであるボルテゾミブはすでに多発性骨髄腫をはじめとして、すでに臨床で用いられている薬剤である。Armstrong らの報告したマウス由来の ACC 培養細胞は c-kit 阻害剤やボルテゾミブで顕著な効果を示しており(Armstrong MD et al, Journal of Cancer, 2011)、ボルテゾミブの抗腫瘍効果は、NF- κ B 経路の阻害、血管新生の抑制、小胞体ストレスの増強の 3 種が知られている(Hideshima T et al, Molecular Cancer Therapeutics, 2011)。作用機序としては I κ B の分解阻害による NF- κ B 経路の阻害が挙げられるが、本細胞株における検討では、NF- κ B 阻害剤である N-アセチル-L-システインと IKK 阻害剤である BMS-345541 と IKK-2 inhibitor が無効であったことから、本細胞株におけるボルテゾミブの効果は NF- κ B 非依存的な経路によること、培養環境では血管新生は関与しないため、小胞体ストレスの増強が主な抗腫瘍作用である可能性が示唆された。ボルテゾミブは膵管癌においては第二相試験にて有効性は示されておらず(WANG H et al, Anticancer Research, 2012)、マウスの同系同所移植系を用いた基礎検討では逆説的に血管増生を生じ腫瘍径を増大させるという報告がされているが、PACC は間質の豊富な PDAC とは異なり間質はわずかであるため、ボルテゾミブが PACC の治療薬となる可能性は十分あり、今後検討を重ねていく予定である。ボルテゾミブの他、ライソゾームの酸性化を阻害しオートファジー阻害剤としても利用されるバフィロマイシン A1 も本細胞株に強い効果を示し、TSC1 のノックアウトで発がんするマウスモデルと同様にラパマイシンも一定の効果があった。

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

これらのことから、PACC の腫瘍形成および維持にはタンパク質分解経路や mTOR 経路の活性化が関与している可能性が示唆された。

図 1

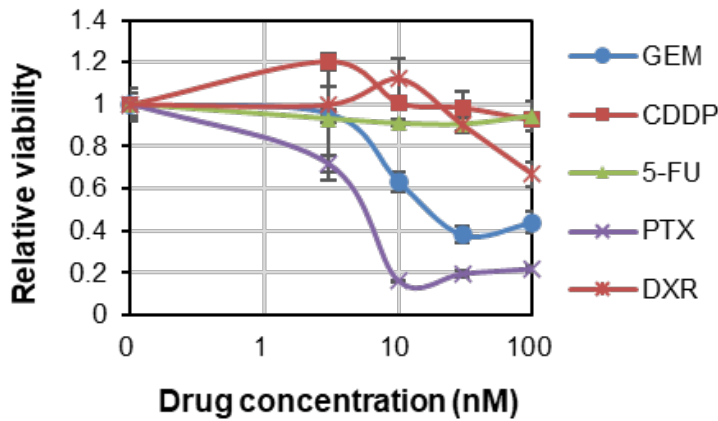
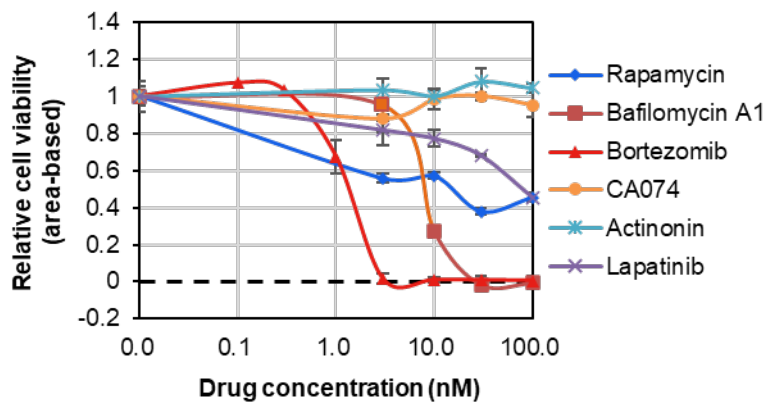


図 2



(3) 考察

本研究において、希少がんである PACC の患者由来オルガノイド株が、組織像や免疫染色および免疫プロットによって PACC の性質を有していること、次世代シーケンサーによる変異および LOH の解析やアレイ CGH による染色体異常の検討により、遺伝子変異の観点からも原発巣および PACC の性質を維持している事が確認された。また、樹立した細胞株を得たことで、これまで困難であった薬剤感受性試験や遺伝子導入を含む機能解析を行う事が可能となり、PACC に有望な新規候補薬剤が発見され、CD133 導入による腫瘍の変化を確認することも可能となり、PACC に関する新たな知見を得ることができた。今後は、本研究から得られた結果をもとに、PACC の腫瘍形成に関与する遺伝子の機能解析、*in vivo* での薬剤感受性試験などを検討している。また、本細胞株は腺房細胞としての性質を保持しており、通常型膵管癌の前癌病変としての腺房導管化生に関する検討や、膵腺房細胞の細胞への転換による耐糖能への影響に関する検討など、腫瘍の枠組みを超え膵疾患における有用性を探索すべく、引き続き検討をすすめていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, Hoshi D, Kato S, Ochiai M, Hori M, Yamamoto S, Tatsuno K, Imai T, Aburatani H, Nakajima A, Hippo Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis.	6. 最初と最後の頁 490-501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgz122	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10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星 大輔
2. 発表標題 ヒト膵腺房細胞癌株の樹立と解析
3. 学会等名 患者由来がんモデル講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星 大輔
2. 発表標題 ヒト膵腺房細胞癌株の樹立と解析
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 喜多絵美里
2. 発表標題 進行胆膵がん患者胆汁中腫瘍細胞のオルガノイド培養とその臨床応用
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 筆宝義隆
2. 発表標題 オルガノイドを用いたex vivo発がんモデルの確立とがん予防への応用
3. 学会等名 第27回日本がん予防学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 筆宝義隆
2. 発表標題 マウスおよび患者由来のがんオルガノイドモデル確立と創薬への応用
3. 学会等名 日本学術会議シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星大輔
2. 発表標題 膵腺房細胞癌のオルガノイド培養
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星大輔
2. 発表標題 膵腺房細胞癌のオルガノイド培養
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星大輔
2. 発表標題 膵腺房細胞癌のオルガノイド培養
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 喜多給美里
2. 発表標題 膵・胆道癌における胆汁検体を用いたオルガノイド培養法の樹立
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 喜多給美里
2. 発表標題 切除不能胆膵癌における胆汁検体を用いた新規オルガノイド培養法の樹立
3. 学会等名 第97日本消化内視鏡学会総会
4. 発表年 2019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	筆宝 義隆 (Hippo Yoshitaka) (30359632)	千葉県がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・部長 (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------