

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17464

研究課題名（和文）膵臓癌と微小環境内の脂肪細胞との相互作用における転移・浸潤メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation for the mechanism about the interaction between pancreatic cancer and adipocyte in cancer stroma

研究代表者

武原 正典 (TAKEHARA, Masanori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・徳島大学専門研究員

研究者番号：60836675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵臓癌は悪性度の高い癌であり、発見された段階で周囲の主要血管への浸潤や遠隔転移をきたして手術不可能なことが多い。膵臓癌の特徴として癌組織内の豊富な間質が挙げられるが、その間質の作用や由来は明らかではない。本研究によって、膵臓癌が膵周囲の脂肪細胞を線維芽細胞様の癌関連脂肪細胞に脱分化させるとともに、癌関連脂肪細胞が膵臓癌のSAA1の発現を上昇させ、EMTを誘導し、遊走能・浸潤能の亢進、化学療法に対する薬剤耐性を誘導していると思われた。また、ヒト膵臓癌手術検体を用いた検討からは、SAA1の発現の有無は手術後の全生存期間と負の相関を認め、多変量解析においても独立した予後因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人における膵臓癌の死亡者数は男性で5位、女性で3位と罹患数に比べても多いのが特徴である。膵臓癌は発見時点で主要血管への浸潤や遠隔転移をきたし、手術不能なことが多い。膵臓癌の予後改善のためには早期発見、および膵臓癌に対する効果的な薬剤発見が必要であると考えられる。本研究では、脂肪細胞が膵臓癌組織内に含まれる豊富な間質の由来になっており、膵臓癌細胞と脂肪細胞との相互作用から膵臓癌細胞のSAA1発現が亢進し、転移・浸潤能の亢進、抗癌剤耐性化、EMT促進が起きていることを見いだした。今後、SAA1やそのpathwayを阻害することによって膵臓癌の治療、予後延長が可能となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a highly malignant cancer. The characteristic of pancreatic cancer is abundant stroma in cancer tissue. However, the action and origin of the stroma are not clear. In this study, we found that adipocytes co-cultured with pancreatic cancer cells morphologically changed into fibroblast-like cells and expressed fibroblast-specific gene markers, strongly suggesting de-differentiation of adipocytes toward cancer-associated adipocyte (CAA). We also demonstrated that CAA-conditioned medium enhanced migration/invasion capability and chemoresistance, and promoted EMT in pancreatic cancer cells, by upregulating SAA1 in those cells. Moreover, our data for surgically resected PDAC tissues revealed a significant correlation between SAA1 expression and survival times, suggesting that SAA1 is an independent prognostic marker for a poor prognosis in patients with PDAC.

研究分野：膵臓癌

キーワード：膵臓癌 癌微小環境 脂肪細胞 転移・浸潤 EMT SAA1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌死亡者数の増加

日本人における膵癌の死亡者数は男性で 5 位、女性で 3 位と罹患数に比べても多いのが特徴である。その原因として、発見時に大血管への浸潤や遠隔転移を起こし、手術不可能な症例が多く、また、抗がん剤による全身化学療法でも生存期間中央値が 1 年前後と非常に予後不良なことが挙げられる。

(2) 癌の浸潤・転移・増殖における癌微小環境の役割

癌組織には癌細胞のほかに、炎症細胞や血管・リンパ管、線維芽細胞が存在し、癌微小環境を形成している。癌微小環境を構成する細胞は、癌細胞と相互作用を起こし、癌の浸潤や転移の促進、増殖や薬剤耐性を亢進させることが近年報告されている。

(3) 膵癌微小環境における脂肪組織の役割

Bochet らは、乳癌細胞が周囲脂肪組織に浸潤することで脂肪細胞の形態・遺伝子発現が線維芽細胞様に変化すること、形態・性質の変化した脂肪細胞が乳癌の転移・浸潤を促進し、癌組織の間質増生を引き起こすことを報告した。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍微小環境における脂肪細胞と癌細胞との相互作用における膵癌の遺伝子発現の変化についてマイクロアレイ解析、IPA 解析を行って検討し、膵癌細胞の悪性度を上昇させる遺伝子を明らかにすることを目的とする。また、マイクロアレイ解析、IPA 解析で同定された種々の遺伝子について、膵癌細胞株にプラスミドや siRNA を導入し、遊走能、浸潤能、EMT マーカーの発現が変化するか検討する。ヒト膵癌手術検体を用いて、同定された分子がヒト膵癌で実際に発現しているかどうかの確認を行うとともに、マウス膵癌モデルを用いて、同定された分子の発現・機能を阻害することで膵癌の転移・浸潤が抑制されるか検討する。

3. 研究の方法

- (1) 種々の膵癌細胞株を CAA-CM で培養し、遊走能、浸潤能、EMT マーカーについて検討する。
- (2) CAA-CM で培養した膵癌細胞株から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析、IPA 解析を行う。
- (3) マイクロアレイ解析、IPA 解析で見いだされた遺伝子を標的として in vitro で解析を行う。
- (4) ヒト膵癌手術検体を用いて 3. で見いだされた分子の発現と術後の無再発生存期間、全生存期間との関連について免疫組織化学染色を用いて検討する。

4. 研究成果

- (1) 5 種類のヒト膵癌細胞株 (Panc-1, PK-45H, Mia PaCa-2, PK-1, PK-8) とマウス脂肪前駆細胞 (3T3-L1) から分化させた脂肪細胞とを共培養したところ、3T3-L1 から分化した脂肪細胞の脂肪滴は減少し、その形態も線維芽細胞様に変化した。線維芽細胞様に変化した脂肪細胞の遺伝子発現を RT-qPCR を用いて評価したところ、脂肪細胞マーカー (Fabp4, Pparg, Adipoq) の発現は減少しており、線維芽細胞マーカー (S100a4, α -sma) の発現は増加していた (図 1)。この線維芽細胞様に形質が変化した脂肪細胞を CAA とし、培養上清を回収して Panc-1, PK-45H を培養したところ、遊走能や浸潤能、5-FU に対する抗癌剤耐性は亢進し、Western blot による解析では EMT が誘導されていた (図 2)。

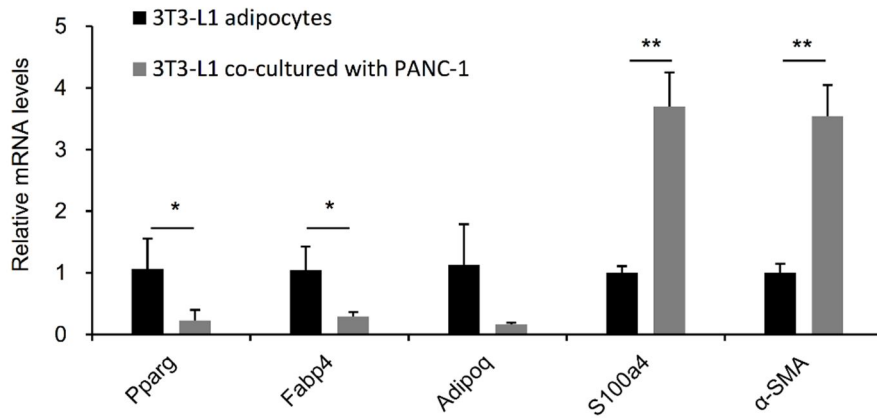


図 1. 共培養による脂肪細胞の遺伝子発現の変化

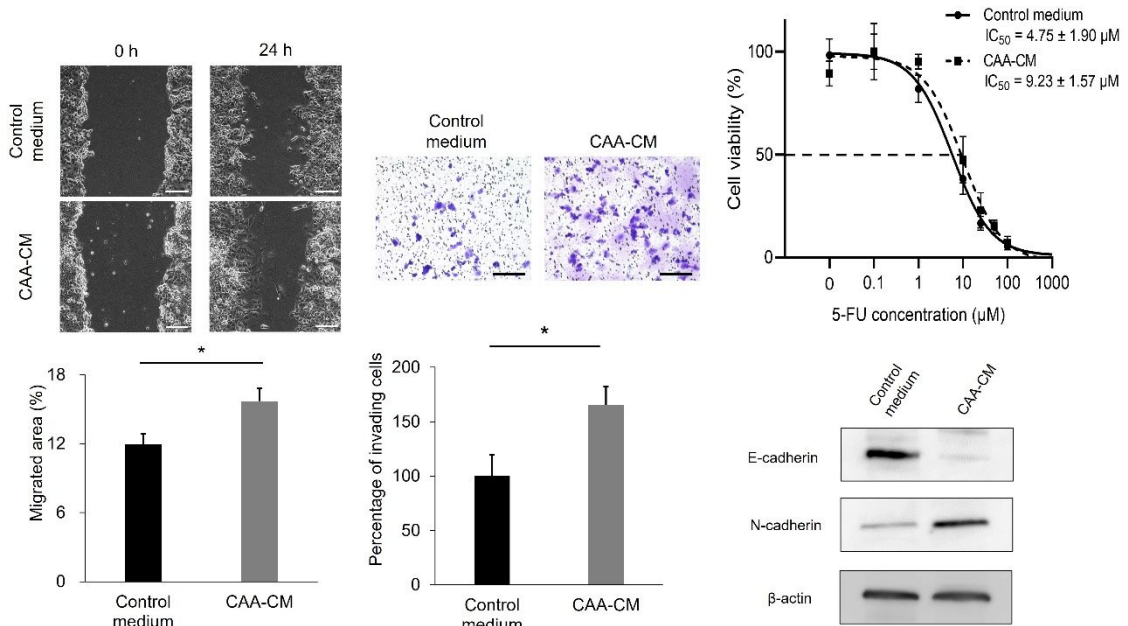


図 2. CAA-CM での培養による膵癌の遊走能・浸潤能・抗癌剤耐性・EMT の促進

- (2) CAA-CM を用いて Panc-1 細胞を培養し、mRNA を抽出し、通常の Panc-1 から抽出した mRNA をコントロールとして、マイクロアレイ解析を行ったところ、約 300 の遺伝子発現が Fold Change 2 の変化を示した。最も発現変化の大きかった遺伝子は SAA1 であった。IPA 解析を行うと、cell migration に関連した遺伝子群の発現が増加しており、SAA1 もそれに含まれていた。
- (3) SAA1 の発現上昇を介して膵癌細胞株の遊走能や浸潤能、EMT が誘導されていると仮定し、SAA1 siRNA を膵癌細胞株に導入して実験を行ったところ、SAA1 siRNA を導入することで遊走能・浸潤能、5-FU に対する抗癌剤耐性の低下が起こり、EMT の誘導も低下した(図 3)。

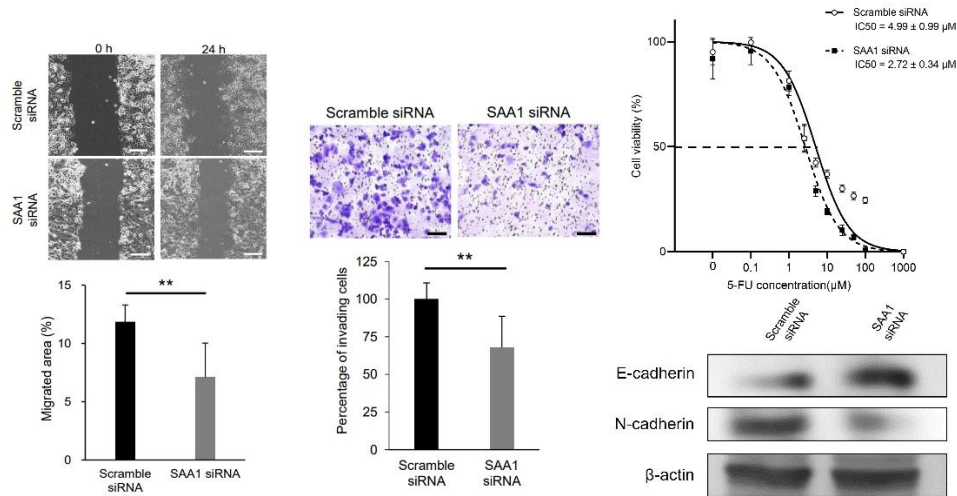


図 3. SAA1 knock down による遊走能・浸潤能・薬剤耐性・EMT の阻害

(4) 倫理審査委員会の承認を得た上で、当院で手術が施行されたヒト膵癌手術検体 61 例を対象として SAA1 の免疫染色を行った。SAA1 の発現の有無、および SAA1 発現と手術後の無再発生存期間、全生存期間を解析したところ、SAA1 は 46 例に陽性となり、SAA1 の発現と全生存期間には負の相関が認められた(図 4)。また、年齢・性別・T stage・N stage・分化度・CA19-9・周術期化学療法の有無などの要因と多変量解析を行ったところ、CA19-9 と SAA1 発現が独立した予後規定因子であった。

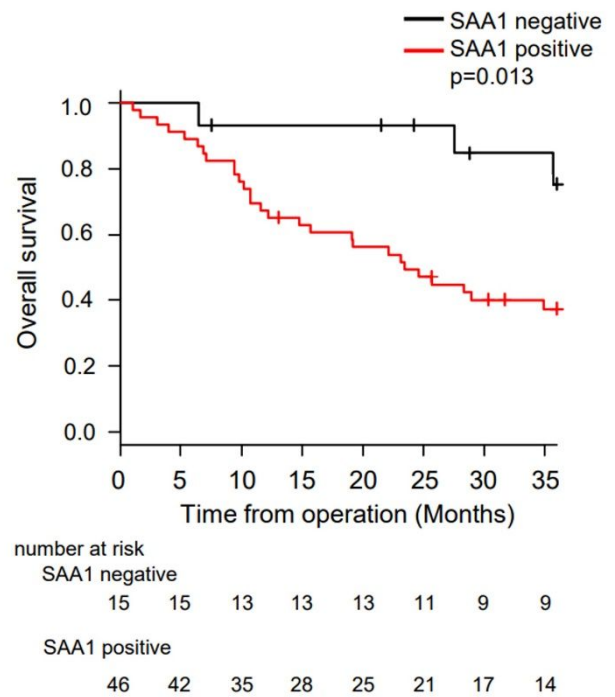


図 4. SAA1 発現の有無と全生存期間の相関

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Takehara Masanori, Sato Yasushi, Kimura Tetsuo, Noda Kazuyoshi, Miyamoto Hiroshi, Fujino Yasuteru, Miyoshi Jinsei, Nakamura Fumika, Wada Hironori, Bando Yoshimi, Ikemoto Tetsuya, Shimada Mitsuo, Muguruma Naoki, Takayama Tetsuji	4. 巻 111
2. 論文標題 Cancer associated adipocytes promote pancreatic cancer progression through SAA1 expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2883 ~ 2894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14527	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 武原正典, 佐藤康史, 川口智之, 野田和克, 福家 慧, 北村晋志, 岡本耕一, 宮本弘志, 六車直樹, 高山哲治.
2. 発表標題 癌関連脂肪細胞は膵癌のSAA1発現を誘導し、転移・浸潤を促進する
3. 学会等名 癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehara Masanori, Sato Yasushi, Noda Kazuyoshi, Fukuya Akira, Okada Yasuyuki, Miyamoto Yoshihiko, Wada Hironori, Okamoto Koichi, Miyamoto Hiroshi, Muguruma Naoki, Takayama Tetsuji.
2. 発表標題 Interaction Between Pancreatic Cancer Cells and Adipocytes Promote Pancreatic Cancer Progression Through Overexpression of Saa1
3. 学会等名 Digestive Disease Week (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------