

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17611

研究課題名（和文）膵癌における癌周囲間葉系細胞の分類と機能解析

研究課題名（英文）Classification and functional analysis of mesenchymal cells in pancreatic ductal adenocarcinoma

研究代表者

前平 博充（Maehira, Hiromitsu）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：30564918

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）：癌部由来膵線維芽細胞（tPFB）8例と非癌部由来膵線維芽細胞（nPFB）3例を細胞株として樹立し、それぞれの遺伝子発現の表現型が異なることを発見した。tPFBと膵癌細胞株（T3M-4, MIPaCa-2）との非接触型共培養では、iCAFマーカーの遺伝子発現が数百倍に上昇した。これはIL-1をtPFBに作用させた時と同じ結果であった。in vitroで膵癌細胞株とtPFBの共培養による膵癌細胞の増殖能の変化を検討すると、tPFBによる増殖促進効果は認めなかったが、in vivoでヌードマウスに対する癌細胞と線維芽細胞の共移植を行うと、癌単独と比較して非常に早い腫瘍増大を示すことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在盛んに研究されているCAFの不均一性の証明と一致して、表現型の異なる2種類の線維芽細胞株を樹立できたことで、CAFの表現型の違いと機能の違いについて、前臨床で解析する手段が得られた。実際に、癌由来の線維芽細胞は実際にin vivoで腫瘍増大に寄与しており、この線維芽細胞の表現型と機能の違いを解析することで、CAFの癌との相互作用を明らかにすることができる。こうしたCAFの不均一性と機能についての研究が進むことで、CAFやCAFが出す癌に対するシグナルを標的とした新たな治療戦略が登場することが予想され、膵癌の予後改善につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We established 8 cancer-derived pancreatic fibroblasts (tPFB) and 3 non-cancer-derived pancreatic fibroblasts (nPFB) as cell lines, and found that the gene expression phenotypes of each were significantly different. Non-contact co-culture of tPFB and pancreatic cancer cell lines (T3M-4, MIPaCa-2) increased gene expression of iCAF markers several hundred fold. This was the same result as when IL-1 added on tPFB. In vitro co-culture of pancreatic cancer cell lines and tPFB revealed no effect of tPFB on the proliferation of pancreatic cancer cells. However, it was found that co-transplantation of cancer cells and tPFB into nude mice in vivo showed much faster tumor growth compared to cancer alone.

研究分野：pancreatic cancer

キーワード：膵癌 癌微小環境 癌関連線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

癌は周辺の細胞と相互作用をすることで生存、成長していく。癌微小環境には線維芽細胞、血管内皮細胞、周皮細胞、免疫細胞といった多彩な細胞が存在しているが、その中でも線維芽細胞は、細胞外基質の主な供給源であり、癌の進展に関与すると注目を集めている。線維芽細胞は癌微小環境において、癌から様々なシグナルを受け、その表現型を変化させ、癌の増殖・浸潤・転移・薬剤耐性・免疫逃避に寄与する。膵癌は消化器癌の中で最も予後不良な癌腫であり、腫瘍間質に強い線維化が生じることが特徴である。そのため、膵癌治療において線維化を含む腫瘍間質の機能を解析することは重要である。膵癌における腫瘍間質の線維化は、癌関連線維芽細胞(CAF)などの間葉系細胞により誘導されるが、一般的にヒトの膵癌微小環境に存在するCAFにはmyCAFと呼ばれるTGF- β 1やSMAなどの筋線維芽細胞マーカーを高発現する集団とiCAFと呼ばれるIL-1やIL-6などの炎症性サイトカインを高発現する集団が存在することが知られている。しかし、それらのCAFが腫瘍にどのように影響しているかは依然として不明である。CAFの機能を検討した報告では、SMAやFAPといった線維芽細胞のマーカーを用いてCAFを標的とした様々な治療モデルが検討されたが、その結果は腫瘍進行を促進するものから抑制するものまで様々であり、腫瘍促進性のみならず、腫瘍抑制性のCAFの存在が示唆された。我々はこれまでに膵癌におけるCAFには分子学的な多様性が存在すること、Vimentin陽性かつSMA陰性のCAFの多い腫瘍が予後不良であることを明らかにした(図1)。しかし、この特徴を持つCAFあるいは持たないCAFが実際に膵癌においてどのように誘導され、腫瘍にどのような機能を付与するのかが解明できていない。このようなCAFの表現型と機能の解析が進むことは、CAFを標的とした新規治療法の開発につながると考えている。

以上から、臨床検体からCAFのサブタイプを発見し、臨床データと照らし合わせることでそれらのCAFの機能を考察することが可能であるため、発見したCAFの特徴および腫瘍増悪に寄与する分子学的機序をin vitroおよびin vivoでの実験で明らかにすることにより、予後不良な膵癌治療の新たな治療戦略を開発すべく、本研究をスタートさせた。

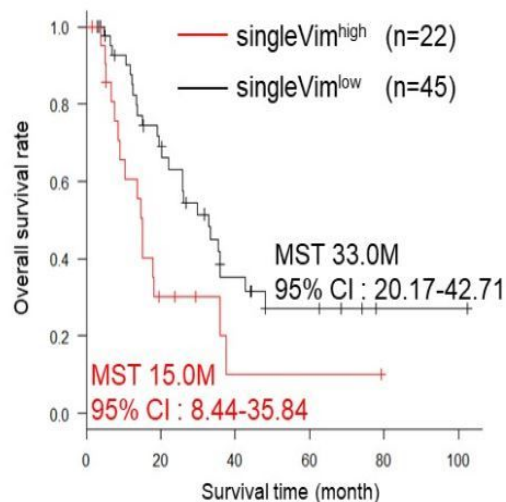


図1 癌関連線維芽細胞における SMA と Vimentin の発現程度と全生存率
SMA 陽性 Vimentin 陰性 CAF が多い群で予後良好な傾向を認めた。

2. 研究の目的

膵癌における腫瘍間質の線維化は、CAF などの間葉系細胞により誘導される。我々は膵癌におけるCAFには分子学的な多様性が存在し、その中でも Vimentin 陽性かつ SMA 陰性のCAFの多い腫瘍が予後不良であることを明らかにした。これにより、CAFを含む間葉系細胞のサブタイプごとの機能を把握し、治療標的を絞っていくことが膵癌の治療戦略に重要と考える。そこで、今回の研究は、臨床検体から正常な膵臓由来の線維芽細胞と膵癌部分由来の線維芽細胞を樹立し、それぞれの線維芽細胞のサブタイプの違いと膵癌細胞に対する作用および膵癌細胞から受ける影響について解析し、CAFによる膵癌悪性化の機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

・臨床検体から正常膵組織と膵癌組織を採取し、正常部分由来膵線維芽細胞(nPFB)と腫瘍部分由来膵線維芽細胞(tPFB)を樹立させる。

・nPFBとtPFBにおける遺伝子発現の特徴を検証する。

・tPFBにおけるヒト膵癌細胞株との共培養によるtPFBおよびヒト膵癌細胞株の遺伝子発現の変

化を検証する。

・樹立した膵癌細胞株と膵線維芽細胞とを共培養し、腫瘍増大効果を検討する。

4. 研究成果

・当院で手術治療を受けた46名の患者から線維芽細胞株の樹立を試み、nPFB 3例とtPFB 8例を10世代以上継代可能なヒト膵臓由来線維芽細胞株として樹立することに成功した(図2)。tPFBはnPFBと比較して、増殖がはやく形態学的に細長い細胞体を持っていた。

・nPFBとtPFBそれぞれの遺伝子発現の特徴は、両者ともに線維芽細胞のマーカーである*PODOPLANIN*, *PDGFR*の高い発現を認め、筋線維芽細胞マーカーの*-SMA*, *COL1A1*に差はないが、nPFBにおいて*IL-1*, *IL-6*などの炎症性サイトカインがtPFBと比較して高いことを発見した。以上から、表現型の異なる2つの膵臓由来線維芽細胞株の樹立に成功した。

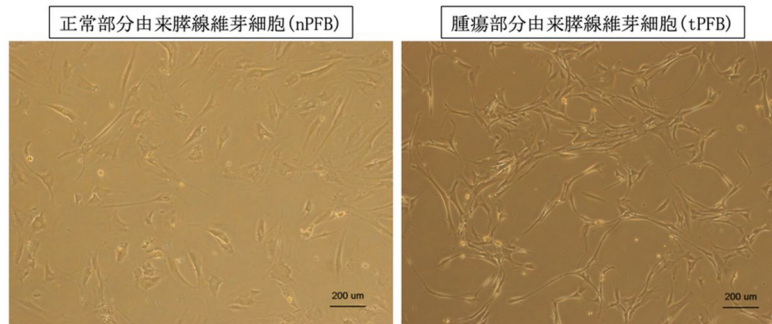


図2 表現型の異なる2種類の膵臓由来線維芽細胞の樹立

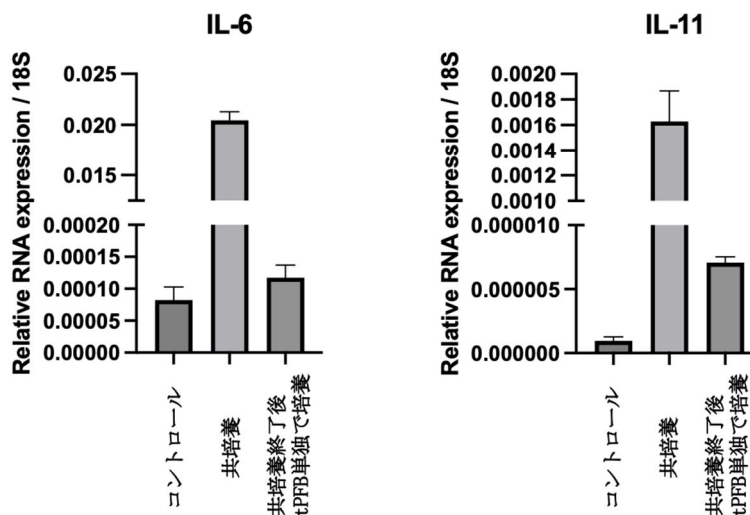


図3 腫瘍部分由来膵線維芽細胞(tPFB)と膵癌細胞株(T3M-4)の非接触型共培養によるtPFBの遺伝子発現変化の解析
tPFBは癌細胞との7日間の共培養によりinflammatory cancer-associated fibroblastに近い遺伝子発現へと変化した。また、共培養を終了し、7日間tPFBを単独で培養すると元の遺伝子発現レベルに低下した。

・tPFBは癌の進展に促進的に関与していることが予想されたため、ヒト膵癌細胞株(T3M-4, MIA PaCa-2)との相互作用を解析したところ、非接触型共培養を行うことで炎症関連線維芽細胞マーカー(*IL-6*, *IL-11*)が著しく上昇することを発見した(図3)。これは、*IL-1*をtPFBに作用させた際に認められる遺伝子発現の変化と同じであった。さらに共培養をやめ、tPFBのみで培養を継続すると元の表現型に戻ることを発見した(図3)。以上から、tPFBは癌細胞から液性因子を受け取り、iCAFに近い表現型に可塑性を保ったまま分化することがわかった。このような線維芽細胞の表現型の変化は、癌の悪性化と密接に関わっていると考えられ、分化した線維芽細胞に関しても、今後機能解析を進めていく予定である。また、癌細胞側の遺伝子発現変化について検討すると、ヒト膵癌細胞株(T3M-4)では非接触型共培養を行うことで細胞増殖関連マーカー(*CYCLIN D1*)に変化を認めなかったが、上皮間葉転換のマーカー(*TWIST1*, *ZEB1*)が上昇することを発見した。

・in vitroで膵癌細胞株とnPFBあるいはtPFBの非接触型共培養による膵癌細胞の増殖能の変化を検討すると、nPFBとtPFBいずれも共培養による膵癌細胞の増速促進効果は認めなかった。今後、低栄養環境など条件設定を行い、増殖促進効果を確認する予定である。

以上が今回の研究成果である。今回の一番の功績は、ヒト膵臓由来およびヒト正常膵臓由来線維芽細胞株を樹立できたことで、前臨床で癌細胞と線維芽細胞の相互作用を解析する手段を獲得したことである。現在、盛んに研究されているCAFの不均一性の証明と一致して、表現型の異なる2種類の線維芽細胞株を樹立することができたことで、これらの細胞の表現型と機能の違い、癌細胞に対する作用の違いを解析することで、CAFの癌との相互作用について研究していくことが可能となった。さらに、癌由来の線維芽細胞は、癌と共培養を行うことでその表現型を可塑性を保ったまま変化させることから、CAFは存在する環境により癌細胞に対する作用が異なる可能性が高く、CAFの機能を解析するには、癌微小環境を可能な限り再現した環境下で実験を進める必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前川 毅、三宅 亨、前平博充、谷眞至、上本伸二
2. 発表標題 膵癌におけるアスコルビン酸の抗腫瘍効果と低酸素環境の影響
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2023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
---------	---------