

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17636

研究課題名（和文）AGEs-RAGE シグナルを介した、膵導管癌による膵星細胞への影響

研究課題名（英文）AGEs-RAGE signaling-mediated effects on pancreatic stellate cells by pancreatic ductal carcinoma

研究代表者

原 裕太郎 (Yutaro, Hara)

弘前大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60836732

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：浸潤性膵管癌と2型糖尿病の研究を行う中で、膵癌細胞が膵星細胞に与える影響を解析した。その中で、膵星細胞には複数の集団があることが予想される結果を得た。シングルセル解析により、膵星細胞が複数の細胞集団から構成され、Cxcl13をマーカーとした希少細胞集団が存在することが明らかになった。発現遺伝子解析から、Cxcl13陽性膵星細胞は血管新生および免疫活性化効果があることが予想された。FACSでCxcl13陽性膵星細胞をセルソーティングし、BL6マウス皮下移植実験を施行するとCxcl13陽性膵星細胞を共に移植した腫瘍は有意に小さくなることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸潤性膵管癌は、現在でも5年生存率が10%に満たない最も予後の悪い固形癌の一つである。さらに、近年世界的に増加しており、2030年には癌死の第二位になると見込まれている疾患である。しかし、画期的な治療方法が生み出されていない。癌関連線維芽細胞の研究は盛んに行われているが、膵星細胞の集団コントロールに着目している研究はない。癌関連線維芽細胞は癌細胞ではないため、癌関連線維芽細胞の初期化を計画すると起源細胞である膵星細胞のコントロールに着地する。また、間質細胞の制御による膵癌治療アプローチは新たな治療のパラダイムシフトになる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Type 2 diabetes (T2D) is known to be a risk factor for invasive pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). The PSC populations were broadly classified into the mesothelial cell population and the pancreatic fibroblast (Paf) population. Furthermore, the Paf population was classified as inflammatory PSC and myofibroblastic PSC (myPSC). Notably, a small population of cells with gene expression similar to Paf was identified. This cell population strongly expresses cxcl13. Gene ontology analysis revealed strong enrichment of upregulated angiogenesis. Furthermore, the cxcl13 positive PSC isolated from db almost completely disappeared. cxcl13 positive PSC and myPSC populations were sorted by flow cytometry and transplanted subcutaneously into BALB/c-nu/nu mice with the human pancreatic cancer cell line. Tumor size increased in myPSC while PSC significantly restricted tumor size.

研究分野：膵癌

キーワード：膵星細胞 浸潤性膵管癌 2型糖尿病 癌関連線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵導管癌 (PDC) は悪性度が非常に高く、予後不良な疾患であり、その機序の 1 つに間質の著明な線維化がある。PDC の進展には間質変化を代表とした腫瘍細胞周囲の微小環境が深く関わり、間質線維化は PDC に特徴的な病理組織学的所見の一つである。膵臓の線維化には特別な細胞が関与している。1990 年に Apte らによって、肝星細胞と同様な細胞の存在が膵臓で明らかとなり、膵星細胞 (PSC) と命名された (Apte MV, et al. Gut. 1998)。PSC は腺房細胞や血管の周囲に静止状態で存在し、刺激が加わることで活性化状態となり、自らの増殖とともに細胞外マトリックス (ECM) を多量に産生する。近年、PSC などの癌周囲 stroma とのクロストークが PDC の増殖、進展に関与し、epithelial to mesenchymal transition (EMT) により悪性度が増強すると言われている。T2DM は PDC の予後不良因子の一つである。我々は、T2DM 罹患期間は CDH1 プロモーターのメチル化を亢進し、PDC の予後を悪化させることを解明した (Saito, T, et al. Sci Rep. 2017)。その機序には、PDC の転移、浸潤能の増加が認められた。しかしながら、T2DM による PDC の間質線維化に対する影響はいまだ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、2 型糖尿病における RAGE を介した PDC の増殖と PSC とのクロストークを解明することを目的とした。癌に対する遺伝子治療が進んでいるが、膵癌治療において遺伝子治療は革命的な躍進は引き起こしていない。膵癌のドライバー遺伝子は、KRAS、SMAD4、CKDN2A、TP53 に集約されるが、遺伝子変異の種類に関わらず多くの症例において予後が悪い。膵癌の予後改善には、癌そのものに対するゲノム治療のみならず癌微小環境全体に対するアプローチが必要であることが予想される。癌ゲノム情報を超える次のステップとして、シングルセル解析を代表とした新規標的探索が重要である。

3. 研究の方法

(1) PDC 手術標本における T2DM による PDC 増殖、進展能への影響の検証

PDC 手術標本に対し、病理学的分化度・Ki-67 の評価、vimentin、E-cadherin、N-cadherin など間葉転換に関する免疫染色を行い、T2DM の有無により PDC 増殖、進展能に違いが出るかを検討した。

(2) AGE による PDC 増殖、進展能への影響 (in vitro)

ヒト PDC 細胞株 (MIA Paca、PANC-1、BxPC-3) に AGE を投与し、TGF- β などのメディエーターを解析する。vimentin、E-cadherin、N-cadherin 間葉系マーカーを RT-PCR を用いて解析する。PSC に対するメディエーターと PDC における形質の変化を評価する。

(3) 膵星細胞のシングルセル解析

8 週齢の BL6 マウスより重層単離法で PSC を単離し、シングルセル解析を施行する。

(4) Cxcl13 陽性膵星細胞のソーティング

8 週齢の BL6 マウスより重層単離法で PSC を単離し、DMEM/F12、10% 仔牛血清、1% 抗生剤で培養を行う。抗体は、APC-cxcl13 抗体と PE-sca1 抗体を使用し、BD FACSAriaTM Cell Sorter で Cxcl13 陽性膵星細胞のソーティングを行う。

(5) 皮下移植モデルの作成

T 細胞機能の欠如した BALBc/nu マウスに PDC 細胞株と Cxcl13 陽性膵星細胞を皮下移植する。4 週間腫瘍の観察を行う。その後、腫瘍を摘出し病理学的に組織型、癌増殖能そして免疫担当細胞の浸潤を解析する。

4. 研究成果

PDC 外科手術標本で、T2DM の有無による膵癌細胞の上皮間葉転換への影響に違いがあるかを、病理学的分化度、上皮間葉転換のマーカーを評価した。T2DM 患者群で膵癌細胞の E-cadherin 発現低下が起きていることを明らかにした。

続いて、ヒト PDC 細胞株 PANC-1、BxPC3 に AGE を投与し、EMT の程度を評価した。上皮間葉転換のマーカーである vimentin、E-cadherin、N-cadherin を RT-PCR を用いて解析したが、AGE 投与群と非投与群で有意差は見られなかった。細胞免疫染色で、vimentin、E-cadherin を染色し、PDC 細胞における形質の変化含め変化は見られなかった。

共培養装置で PDC 細胞株 (PANC-1、BxPC-3) と単離、培養した PSC を非接触下に共培養を行った。AGE 刺激 PDC 細胞株と AGE 非刺激 PDC 細胞株による PSC に対する影響を α -SMA、desmin の

細胞免疫染色とBD FACSAria II Cell Sorterにより解析した。AGE 刺激 PDC 細胞株ではPSCの活性化が引き起こされており、癌関連線維芽細胞様の形質を有するPSCの割合が増えることが明らかとなった。細胞免疫染色を施行すると、腭星細胞に複数の細胞集団が存在することが示唆され、腭星細胞の亜集団解析を先行して行う方針とした(図1)。

そこで、8週齢のC57BL6Jマウスおよびdb/dbマウスより重層単離法によりPSCを単離しシングルセル解析を施行した。活性化を引き起こさないために、60-70%の密度で培養を開始し、継代は施行せず、培養一週間以内で研究を実施することを徹底した。同条件のPSCに対して施行したシングルセル解析により、PSCの細胞不均一性およびCxcl13陽性腭星細胞の存在を証明した(図2)。

マーカー遺伝子としてsca1陽性かつCxcl13陽性細胞がCxcl13陽性PSCであることが明らかになった。Cxcl13陽性腭星細胞の発現遺伝子解析により、血管新生に関するエンリッチメントが増強していることが明らかになった(図3)。

皮下移植モデルを作成し、Cxcl13陽性PSCと共に移植した腫瘍(Cxcl13陽性PSC 1.0×10^5 + 腭癌細胞株 1.0×10^5)では腫瘍形成が起きないことが明らかになった。腫瘍細胞数を増やし移植したところ腫瘍形成を得た(Cxcl13陽性PSC 1.0×10^5 + 腭癌細胞株 2.0×10^5)。4週間の観察後に摘出した腫瘍のマイクロアレイ解析で、Cxcl13陽性PSCと共に移植した腫瘍では免疫応答が増強し、B細胞を中心としたリンパ球浸潤が亢進していることが明らかになった(図4AB)。以上の結果より、PSCにはCxcl13陽性PSCという希少集団が存在し、血管新生およびB細胞を中心とした腫瘍免疫を活性化することにより浸潤性腭管癌を抑制することが証明された。

図1

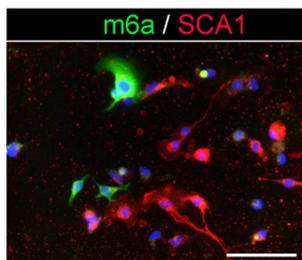


図2

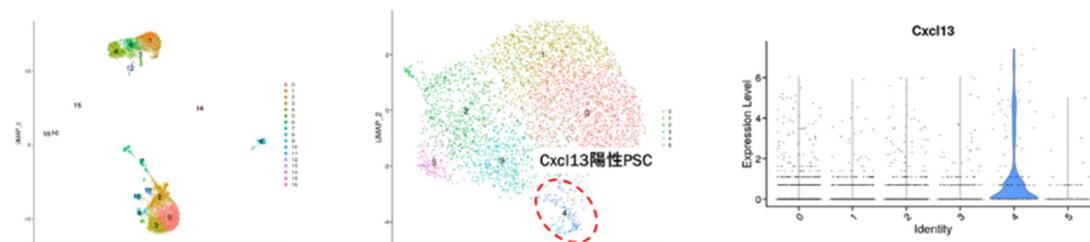
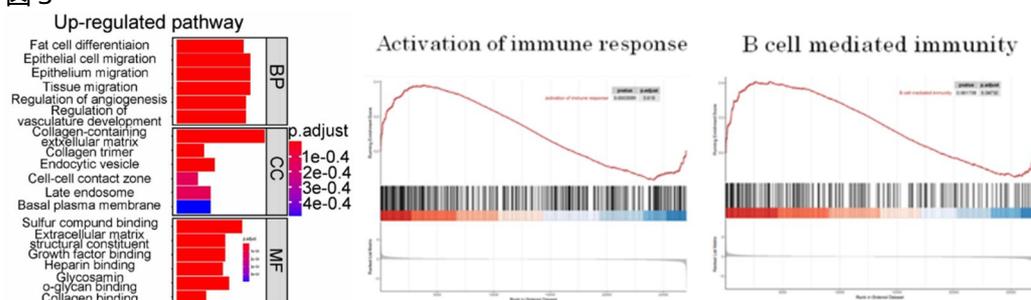
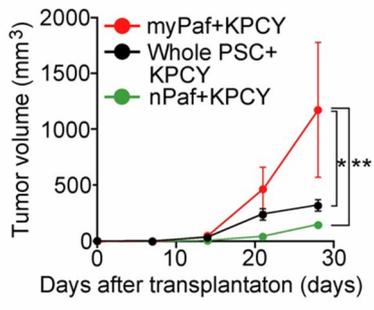


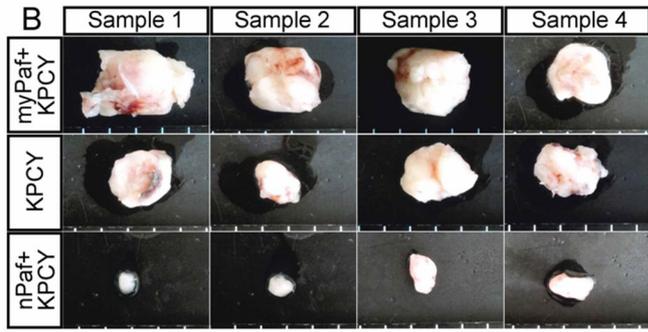
図3



A



B



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Pan Xuekai, Mizukami Hiroki, Hara Yutaro, Yamada Takahiro, Yamazaki Keisuke, Kudoh Kazuhiro, Takeuchi Yuki, Sasaki Takanori, Kushibiki Hanae, Igawa Akiko, Hakamada Kenichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Diabetes mellitus impacts on expression of DNA mismatch repair protein PMS2 and tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 132 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hara Yutaro, Mizukami Hiroki, Yamazaki Keisuke, Yamada Takahiro, Igawa Akiko, Takeuchi Yuki, Sasaki Takanori, Kushibiki Hanae, Murakami Kotaro, Kudoh Kazuhiro, Ishido Keinosuke, Hakamada Kenichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Dual epigenetic changes in diabetes mellitus associated pancreatic ductal adenocarcinoma correlate with downregulation of E cadherin and worsened prognosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology: Clinical Research	6. 最初と最後の頁 354 ~ 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cjp2.326	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yutaro Hara, Hiroki Mizukami, Takahiro Yamada, Keisuke Yamazaki, Norihisa Kimura, Keinosuke Ishido, Kenichi Hakamada
2. 発表標題 SINGLE-CELL RNA SEQUENCING REVEALS HETEROGENEITY AND A RARE POPULATION OF PANCREATIC STELLATE CELLS: TYPE 2 DIABETES INDUCES PANCREATIC STELLATE CELLS TO BECOME CANCER-ASSOCIATED FIBROBLAST-LIKE CAUSING PANCREATIC STELLATE STEM CELL LOSS
3. 学会等名 DDW2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 Yutaro Hara, Hiroki Mizukami, Takahiro Yamada, Keisuke Yamazaki, Norihisa Kimura, Keinosuke Ishido, Kenichi Hakamada
2. 発表標題 Single-cell rna sequencing reveals heterogeneity and a rare population of pancreatic stellate cells
3. 学会等名 Joint Congress of the 26th Meeting of International Association of Pancreatology and the 53rd Annual Meeting of Japan Pancreas Society (国際学会)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 原 裕太郎、水上 浩哉、竹内 祐貴、木村 憲央、石戸圭之輔、袴田 健一
2. 発表標題 膵癌の予後を決めるE-cadherinはCDH1メチル化とmiR-100-5pにより制御される
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 原 裕太郎、水上 浩哉、遅野井 祥、井川 明子、工藤 和洋、袴田 健一
2. 発表標題 AGEs-RAGE signalを介したPSCの活性化によりIL-6の分泌能が亢進する
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 原 裕太郎、水上 浩哉、竹内 祐貴、工藤 和洋、袴田 健一
2. 発表標題 2型糖尿病は複数の異なる後天的遺伝子修飾機序により E-cadherin の発現を低下させ、浸潤性膵管癌の予後を悪化する
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年～2022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
---------	---------