

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20163

研究課題名（和文）膵線維化モデル組織の構築とエネルギー代謝に基づく膵臓がんの理解

研究課題名（英文）Development of pancreatic fibrosis tissues for pancreatic cancers

研究代表者

篠原 満利恵（Shinohara, Marie）

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：00789133

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）：本研究では、膵臓の線維化の中心的な役割を担う、膵星細胞と膵腺房細胞、膵臓がんの共培養組織を異なる培養酸素濃度雰囲気下で培養し、星細胞の挙動と機能を評価した。低酸素培養により、膵星細胞の増殖を確認した。また、平面培養系において、間葉系がん細胞では、星細胞が底面に伸展し、がん細胞が増殖する一方で、上皮系がん細胞では、がん細胞の増殖に伴い、星細胞の減少が確認された。すなわち、異なる細胞種の組み合わせにより多様な線維化モデルの形成と挙動解析が可能となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵線維化培養モデルの構築は、糖尿病や膵硬変、膵臓がんなど様々な膵臓疾患に対する基礎研究のツールとして期待される。既往の研究では、膵星細胞のみに関して培養酸素濃度の影響を評価するものが多かった。本研究の検討により、重層化共培養組織、三次元凝集体での検討が可能であることが示された。また、細胞の組み合わせにより異なる膵星細胞の挙動が見られたことにより、多様な線維化モデル構築が可能となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to evaluate the activation of pancreatic stellate cells, which play a central role in pancreatic fibrosis, by co-culturing them with pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells in a different oxygen atmosphere. Proliferation of pancreatic stellate cells was confirmed by hypoxic culture. In the planar culture system, basal elongation of stellate cells and proliferation of cancer cells were observed in mesenchymal cancer cells, while in epithelial cancer cells, a decrease in stellate cells was observed along with proliferation of cancer cells. In other words, the combination of different cell types is expected to enable the formation and behavior analysis of various fibrosis models.

研究分野：生体医工学関連

キーワード：膵臓 線維化 膵がん 膵星細胞

1. 研究開始当初の背景

膵臓の線維化は慢性膵炎または膵臓がんで見られ、進行すると糖尿病や膵硬変を引き起こす。線維化が起こる過程で中心的な役割を担っているのは、膵腺房組織や膵管の周りを取り囲んでいる膵星細胞であり、線維化の過程で、炎症性サイトカインなどの刺激により活性化した膵星細胞が筋線維芽細胞様に変化し、多量の細胞外基質を産生する。線維化が起こることで組織は低酸素状態となり、さらに細胞ストレスにより炎症が起こり、線維化が進行していく。膵星細胞が1996年に発見されてから、その機能や疾患への関与などについて盛んに検討されてきた。特に難治性がんである膵臓がんの増殖が線維化により抑制される現象や、癌細胞と膵星細胞との相互作用が報告され、ますます膵星細胞や線維化の研究の重要度が高まった。しかしながら、膵星細胞の活性化と線維化のメカニズムは未だ不明な点も多く、特に、線維化状態になる過程の低酸素応答に関する検討はほとんど行われていない。そのため、線維化過程における低酸素状態を模倣した培養系の開発が重要である。

2. 研究の目的

本研究では、膵臓がん治療の基礎研究や創薬応用に役立つ膵線維化モデル培養組織の構築にむけた培養系の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膵腺房細胞と膵星細胞の共培養凝集体形成

膵腺房細胞と膵星細胞の三次元組織を形成するため、底面にマイクロウェル構造を持つ培養基板 (Shinohara et al., 2014) を用いた。生体内の膵星細胞は腺房細胞に比べて少ないため、播種時の混合比率を変えて検討を行った。また、培養容器底面からの酸素供給を遮断した培養系での検討を行った。

(2) 膵臓がん細胞と膵星細胞の共培養組織形成

表現型の異なる膵がん細胞と膵星細胞を酸素透過性、非透過性培養基板上で培養し、膵星細胞の形態変化や増殖能、各種マーカー発現について検討した。

4. 研究成果

(1) 膵腺房細胞と膵星細胞の共培養凝集体形成

ラット由来膵腺房細胞株とヒト由来膵星細胞を異なる混合比率でマイクロウェル基板上に播種し、凝集体を形成させた。播種翌日には凝集体を形成可能であった。培養2日目に一方の培養容器底面の酸素供給を遮断し、その後4日培養を継続したところ、酸素供給を遮断した群では、膵星細胞の顕著な増化と膵腺房細胞の減少が見られた。一方、酸素供給側では膵星細胞の数に顕著な変化は見られなかった (図1)。

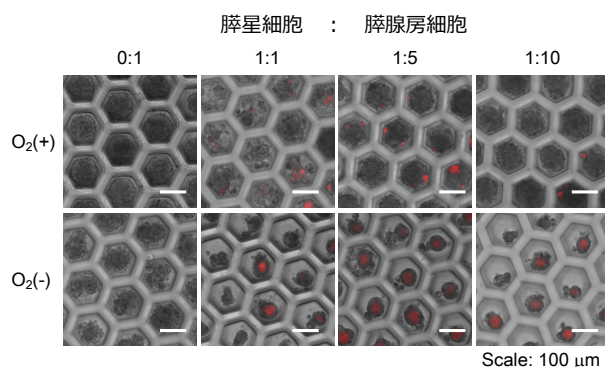


図1. 膵腺房細胞と膵星細胞 (赤) の共培養凝集体形成

(2) 膵臓がん細胞と膵星細胞の共培養組織形成

表現型の異なるヒト由来膵がん細胞（上皮系，間葉系）と膵星細胞を酸素透過性・非透過性培養プレート上に播種し共培養した。播種密度は膵がん細胞に対して膵星細胞を 1 割とした。上皮系がん細胞との共培養では，膵星細胞は膵がん細胞の凝集している箇所に局在し，培養日数が経過すると死滅する様子が観察された。一方，間葉系膵がん細胞との共培養では，膵星細胞が培養底面で接着伸展，増殖し，膵がん細胞が重層化された。また，上皮系，間葉系共に酸素供給により膵がん細胞の増殖が顕著に見られた。

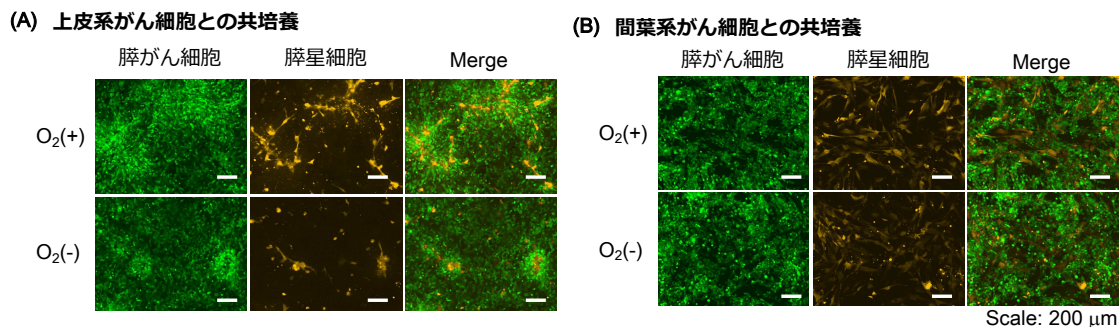


図 2. 平面培養系における膵がん細胞（緑）と膵星細胞（赤）の共培養組織形成

また，(1)と同様に，マイクロウェル基板に膵がん細胞と膵星細胞を播種し，共培養凝集体を形成した（図 3）。上皮系がん細胞，間葉系がん細胞共に播種翌日には凝集体が形成され，間葉系がん細胞との共培養では，膵星細胞が凝集体中央に局在している様子が確認された。形成した凝集体は，培養基板から回収可能であった。間葉系がん細胞として使用した細胞が未分化がん由来であったことより，回収時に凝集が弱く小さなクラスター用に解離が見られた。本手法は，凝集体形成後に異なる培養酸素濃度下で培養を継続可能であり，低酸素下において，間葉系がん細胞の凝集傾向が見られた一方で，細胞数の減少も見られた。上皮系がん細胞では培養酸素濃度による細胞数の顕著な差は見られなかった。

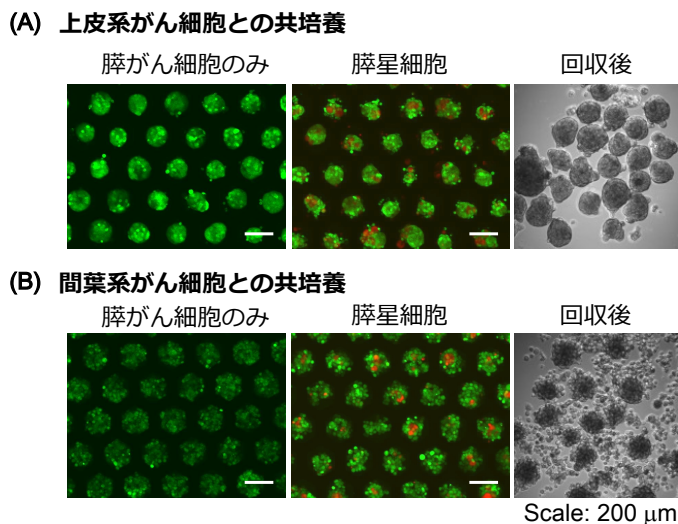


図 3. 膵がん細胞（緑）と膵星細胞（赤）の共培養凝集体形成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Essaouiiba Amal, Jellali Rachid, Shinohara Marie, Scheidecker Benedikt, Legallais Cécile, Sakai Yasuyuki, Leclerc Eric	4. 巻 330
2. 論文標題 Analysis of the behavior of 2D monolayers and 3D spheroid human pancreatic beta cells derived from induced pluripotent stem cells in a microfluidic environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology	6. 最初と最後の頁 45 ~ 56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiotec.2021.02.009	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 -

1. 著者名 Tokito Fumiya, Shinohara Marie, Maruyama Masashi, Inamura Kosuke, Nishikawa Masaki, Sakai Yasuyuki	4. 巻 131
2. 論文標題 High density culture of pancreatic islet-like 3D tissue organized in oxygen-permeable porous scaffolds with external oxygen supply	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 543 ~ 548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.12.009	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

〔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
---------	---------