

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22817

研究課題名（和文）Axon guidance moleculeの制御による膵癌神経浸潤抑制

研究課題名（英文）Suppression of Pancreatic cancer neural invasion by regulation of Axon guidance molecule

研究代表者

藤原 謙次（FUJIWARA, Kenji）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10727184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：樹立できたヒト膵癌オルガノイドと癌関連線維芽細胞を用いた3次元共培養モデルの作製手技を確立したが、ヒト神経細胞の樹立および分離・培養に難渋したため、癌関連線維芽細胞が膵癌オルガノイドへ与える影響を評価する方針とした。癌関連線維芽細胞との共培養下でのみ増殖する癌関連線維芽細胞依存性膵癌オルガノイドを同定した。癌関連線維芽細胞への依存性が高いオルガノイドにおいて、活性化した癌関連線維芽細胞が分泌するタンパクを選出した。高分化膵癌は微小環境因子へ強く依存していることを見出した。さらに微小環境因子への依存性が低いほどGemcitabineへの感受性が高くなることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性化した癌関連線維芽細胞が癌間質相互作用として腫瘍増殖・進展に寄与する重要な微小環境因子を産生しているとされる2次元培養モデルの報告は多いが、組織内での癌関連線維芽細胞の役割に関しては未だ不明な点が多い。3次元培養モデルとして膵癌組織より膵癌オルガノイドを樹立することで、subtype分類といった個別化治療への応用が期待される。本研究で、膵癌の分化度や薬剤の反応性に関して、癌関連線維芽細胞が重要な役割を担うことを示しており、膵癌オルガノイドと癌関連線維芽細胞を用いた3次元共培養モデルを用いることで、膵癌におけるsubtype分類に基づいた新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We established a technique to create a 3D co-culture model using human pancreatic cancer organoids and cancer-associated fibroblasts(CAFs). However, it was difficult to establish human neuronal cells in organoids. Therefore, we decided to evaluate the effect of CAFs on pancreatic cancer organoids. We identified CAF-dependent pancreatic cancer organoids that proliferate only under co-culture with CAFs. In organoids that are highly dependent on CAFs, we selected proteins secreted by activated CAFs. We found that differentiated Pancreatic ductal adenocarcinomas are strongly dependent on microenvironmental factors. Furthermore, we found that the lower the dependence on microenvironmental factors, the higher the sensitivity to gemcitabine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 神経浸潤 Axon guidance molecules 線維芽細胞 細胞間相互作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌の転移経路として、神経浸潤、リンパ管浸潤、静脈浸潤が代表的な三つの経路とされる。膵癌は神経浸潤を高率に有し、神経浸潤の有無が予後と密接に相関することが判明している。膵臓癌の神経浸潤はリンパ管浸潤、静脈浸潤が無い患者においても認められており、初期の転移経路の一つであると考えられる。その制御によって膵臓癌患者において転移再発を抑制することが期待される。膵癌微小環境において、線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞、神経細胞、そして細胞外基質らが代表的な構成要素であるが、その中で腫瘍細胞と神経細胞の傍分泌伝達経路は研究が進んでおらず不明な点が多い。申請者は、Axon guidance molecules の一員である SEMA3D の関与を報告した。そして、同時に他の axon guidance interaction の関与が考えられた。膵癌細胞と神経細胞間の相互作用や、どのような経路で膵癌細胞が神経鞘内へ侵入していくかは明らかにできなかった。神経軸索は髄鞘で覆われており、実際に癌細胞が髄鞘内に侵入する際には髄鞘の主たる成分のシュワン細胞の存在が重要になると思われる。さらに膵癌組織は線維芽細胞が豊富に存在する Desmoplasia を特徴としている。膵癌細胞は浸潤過程において常に線維芽細胞を携えていると考えられ、髄鞘内への侵入に際しては線維芽細胞とシュワン細胞の接触を抜きにして成立するとは考えにくい。膵癌の治療成績改善のために、膵癌細胞、神経細胞間の相互作用におけるさらなる関与因子の解明、さらには両者の間に存在するシュワン細胞、線維芽細胞の関与を明らかにすることが膵癌の治療成績改善に繋がると考え、本研究の構想に至った。

### 2. 研究の目的

これまで膵癌神経浸潤に関する研究は2種類の細胞間の相互作用に関連する研究が多く報告されているが、本研究では、膵癌細胞、神経細胞のみならず、線維芽細胞、シュワン細胞の4種類の細胞間の相互作用を総括的に解析するという独創的な研究である。また、それぞれの相互作用経路において鍵となる伝達分子及び機構を詳細に検討し、3D migration assay システムを使用した In vitro モデル、膵癌移植/自然発生マウスモデルを使用し、最終的に伝達経路を標的とした治療の研究を目標としている。これによって新たに確立された神経浸潤抑制の治療法が膵癌治療へ及ぼす波及効果は計り知れない。またアレイ、次世代シーケンズなどの大量データを読むことで、高いインパクトと広範な学術的波及効果が期待される。

### 3. 研究の方法

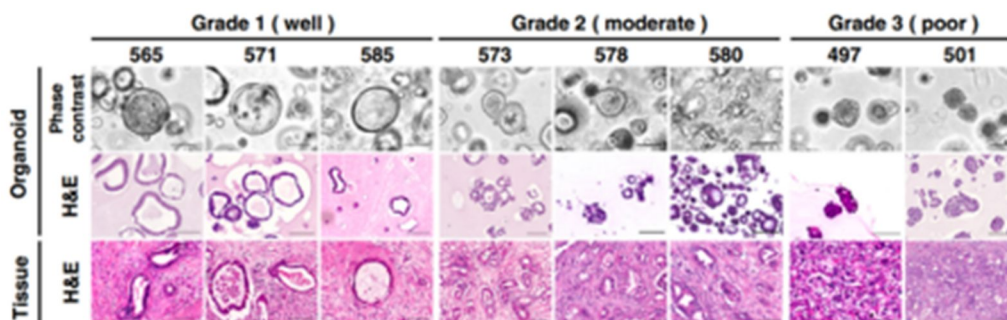
まず、膵癌細胞、神経細胞、線維芽細胞の3種の細胞を組み合わせ、癌細胞および線維芽細胞の浸潤能増強効果に変化が見られるかを検証する。3D migration assay として、神経細胞を用いた神経浸潤検証モデルを確立する。樹立できたヒト膵癌オルガノイドと癌関連線維芽細胞を用いた3次元共培養モデルの作製手技を確立したが、ヒト神経細胞の樹立および分離・培養に難渋したため、癌関連線維芽細胞が膵癌オルガノイドへ与える影響を評価した。

膵癌オルガノイドを用いたゲノムおよびトランスクリプトーム解析により膵癌 subtype 分類に基づく膵癌の分子学的特徴を青木らに示す。分化度を制御する微小環境因子への依存性を明らかにし、癌関連線維芽細胞(CAFs)が微小環境因子を提供するか、CAFと膵癌細胞の3次元共培養モデルを作成し評価する。膵癌オルガノイドを微小環境因子依存性に subtype 分類し、各 subtype の治療効果を比較検討する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト膵癌オルガノイドを樹立し、分化度の違いによって分類した。

ヒト膵癌組織検体から人為的に創出した実際の器官に類似した組織体であるヒト膵癌オルガノイドを樹立した。樹立したオルガノイドは管状構造・基底膜構造を持つことを確認しており、分化度によって膵癌オルガノイドを分類し、primary tumor の分子学的特徴を反映していることを確認した。



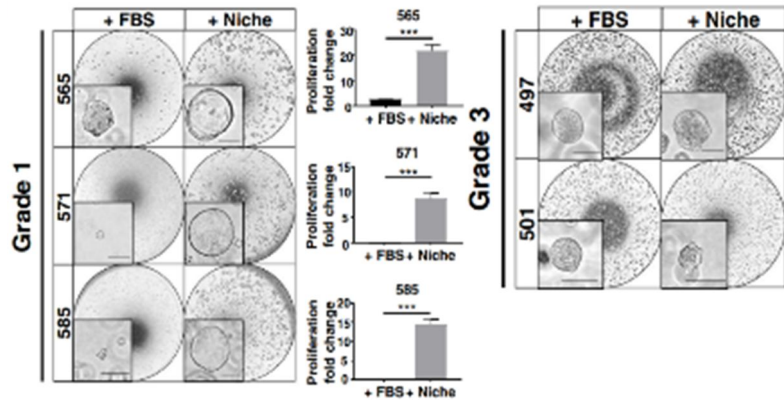
【上図】分化度(Grade1-3)によって異なる膵癌オルガノイドと primary tumor の HE 染色画像

(2) 分化度の高い膵癌オルガノイドの増殖と管腔形成は微小環境因子に依存する。

分化度の低い膵癌オルガノイドは固形構造を形成し、増殖に微小環境因子の影響を受けてないが、分化度の高い膵癌オルガノイドは管腔構造を形成し、微小環境因子に依存して増殖していることを示した。

【右図】

(左) 微小環境因子により増殖した分化度の低い(Grade1)膵癌オルガノイド  
(右) 微小環境因子の影響を受けていない分化度の高い(Grade3)膵癌オルガノイド

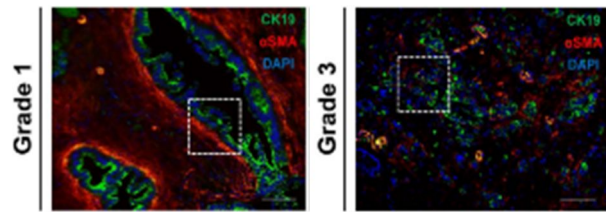


(3) 高分化型膵癌は癌関連線維芽細胞に囲まれている。

分化度の高い膵癌(Grade1)は豊富な癌関連線維芽細胞に囲まれており、分化度が高い膵癌が強く癌関連線維芽細胞の影響を受けていることを示した。

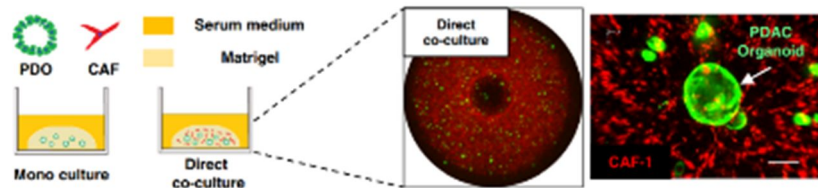
【右図】 ヒト膵癌の癌細胞(CK19; 緑)、癌関連線維芽細胞(αSMA; 赤)、核(DAPI; 青)の代表的な蛍光免疫染色画像。

(左) 高分化型膵癌(Grade1)、  
(右) 低分化型膵癌(Grade3)。



(4) 癌関連線維芽細胞は高分化膵癌オルガノイドの増殖に影響を与える。

膵癌オルガノイドと癌関連線維芽細胞を 3D 共培養モデルで直接共培養すると、中～高分化膵癌オルガノイドにおいて、有意にオルガノイドが増殖していることを示した。

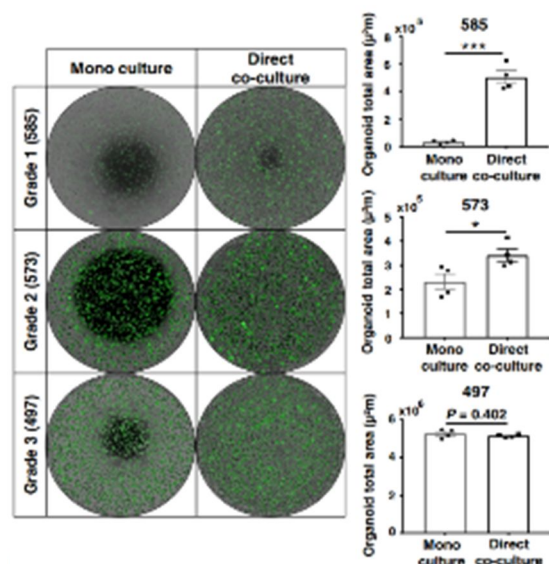


【上図】 膵癌オルガノイドと癌関連線維芽細胞の 3D 直接共培養モデル。

【右図】

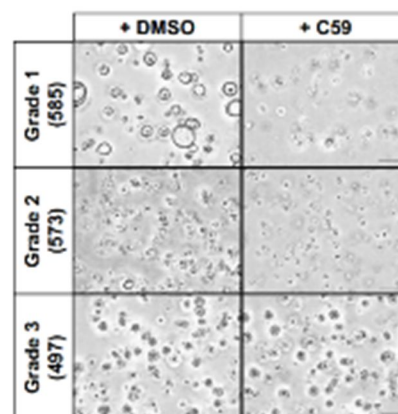
分化度別膵癌オルガノイドと癌関連線維芽細胞の 3D 直接共培養による増殖の比較。

右上段：高分化型膵癌オルガノイド  
右中段：中分化型膵癌オルガノイド  
右下段：低分化型膵癌オルガノイド



( 5 ) 分化度の高い膵癌オルガノイドは外因性 Wnt に依存している。

膵癌オルガノイドがどの微小環境因子に依存しているかを評価するために、7 種類の微小環境因子から 1 つずつ因子を除いたものでオルガノイドの増殖を評価したところ、活性化 Wnt 産生因子に依存していることが判明した。膵癌オルガノイドを用いて活性型 Wnt の産生を阻害する Porcn-i(C59)の効果を検討したところ、分化度の高い膵癌オルガノイドにおいて C59 を用いると膵癌オルガノイドの有意な増殖抑制効果が得られた。

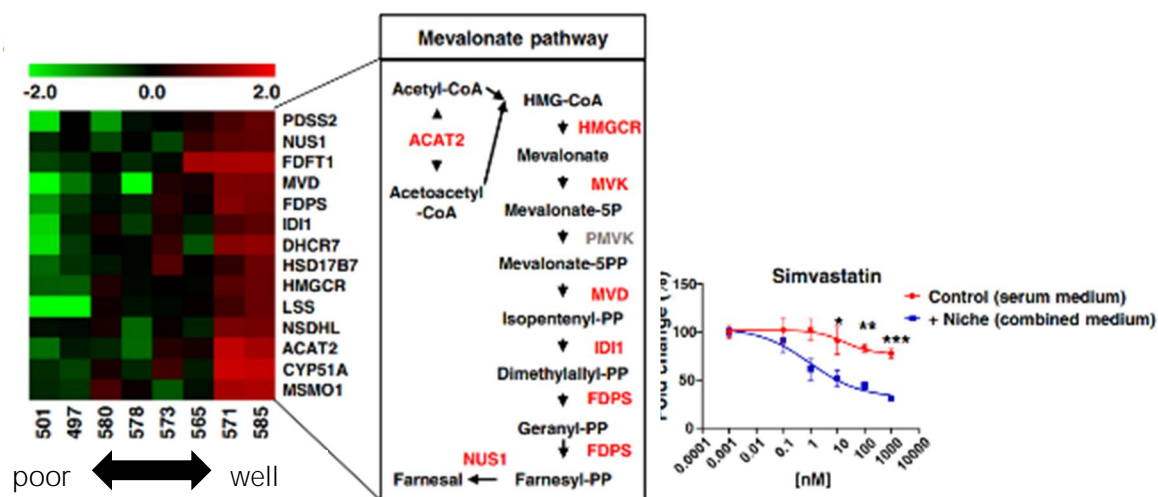


【右図】

分化度(Grade1-3)別に DMSO もしくは活性化 Wnt 産生阻害剤(C59)で処理した位相差画像。

( 6 ) 分化度の高い膵癌オルガノイドは微小環境因子依存性と相関するメバロン酸経路関連遺伝子の発現が上昇し、メバロン酸経路阻害剤の感受性を高める。

膵癌オルガノイドのゲノムおよびトランスクリプトーム解析を行ったところ、分化度の高い膵癌オルガノイドはメバロン酸経路関連遺伝子の発現が上昇していた。メバロン酸経路阻害剤である Simvastatin を投与すると微小因子依存的に感受性が亢進されていることを示した。



【左上図】膵癌オルガノイドにおけるメバロン酸代謝関連遺伝子発現の Heat map。

【右上図】メバロン酸経路阻害剤を添加した膵癌オルガノイドの容量反応曲線。

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 1件）

1. 著者名 Shinkawa Tomohiko, Ohuchida Kenoki, Mochida Yuki, Sakihama Kukiko, Iwamoto Chika, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Mizuuchi Yusuke, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Subtypes in pancreatic ductal adenocarcinoma based on niche factor dependency show distinct drug treatment responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-022-02301-9	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 -

〔学会発表〕 計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
研究協力者	新川 智彦  (SHINKAWA Tomohiko)		

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