

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16458

研究課題名(和文) 膵癌治療抵抗性をもたらず腫瘍微小環境の役割とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism of the tumor microenvironment related to treatment resistance to pancreatic cancer

研究代表者

行田 悠(yu, gyoda)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90838236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：術前化学療法後に手術により摘出された膵癌組24例中15例において、癌部よりCAFsおよび非癌部より対照線維芽細胞の樹立に成功した。上皮細胞、間葉系細胞や血球系細胞に特異的な抗体を使用した免疫組織染色を施行し純度の高い線維芽細胞が樹立されていることが確認された。また、RNA-sequencingにより非癌部由来の対照線維芽細胞と比較して、CAFsにおいて有意に発現が亢進している遺伝子が多数同定された。今後は、CAFsが抗癌剤抵抗性に寄与しているか否か、同定された遺伝子の治療抵抗性への関与を明らかにする予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は、抗癌剤治療中に高頻度に治療抵抗性を示す予後不良な癌である。この治療抵抗性に関して、癌間質に多く存在する癌内線維芽細胞(Carcinoma-associated fibroblasts: CAFs)の関与が示唆されているが、その分子機構については不明な点が多い。

CAFsと膵癌治療抵抗性の関係に関して、分子レベルで明らかにし治療に役立てられれば社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In 15 of 24 cases of pancreatic cancer that had been surgically removed after preoperative chemotherapy, we successfully established CAFs from the cancerous area and control fibroblasts from the non-cancerous area. Immunohistochemical staining using antibodies specific to epithelial cells, mesenchymal cells, and blood cells confirmed that highly pure fibroblasts had been established. In addition, RNA-sequencing identified many genes whose expression was significantly increased in CAFs compared to control fibroblasts derived from non-cancerous areas. In the future, we plan to clarify whether CAFs contribute to anticancer drug resistance and the involvement of the identified genes in treatment resistance.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：膵癌 癌内線維芽細胞 治療抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は治療抵抗性の予後不良な腫瘍として知られている。手術的治療や化学療法が主に導入されているが、未だに他の消化器悪性腫瘍に比べて治療成績は劣っているのが現状である。

従来では抗癌剤治療前後に生じる遺伝子変異が癌細胞の抗癌剤耐性能を媒介する中心的な因子であることが概念的に信じられてきた。しかし、ドライバー遺伝子変異が抗癌剤耐性能を呈した癌細胞で検出されることは稀で、むしろエピゲノム修飾による特定な遺伝子発現の変動によるシグナル伝達系の活性化が重要である。また、膵癌における化学療法感受性、治療抵抗性獲得に係る遺伝子変異ですら未だ明確な研究成果はなく、腫瘍細胞単独ではなく周囲環境も含めた解析が必要である。

その背景の中で申請者は、ヒト膵癌の間質に多数存在する CAFs に着目した。近年、CAFs が癌浸潤・転移や治療抵抗性に寄与し (Yoshida G., et al., *Int J Mol Sci.*, 2019)、複数の報告では培養した線維芽細胞が薬剤処理後に特定なサイトカインの産生を亢進することで、CAFs が治療抵抗性に寄与することを示唆した。しかし、癌患者にて抗癌剤の投与が生体内で癌塊中の CAFs に作用し、癌細胞の抗癌剤耐性能に寄与していることを示した報告はなく、また、CAFs がどのように癌細胞にエピゲノム修飾を介して治療抵抗性を促進するのか、その分子機構を含めてまだ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

膵癌は、抗癌剤治療中に高頻度に治療抵抗性を示す予後不良な癌である。この治療抵抗性に関して、癌間質に多く存在する癌内線維芽細胞(Carcinoma-associated fibroblasts : CAFs)の関与が判明しつつあるが、その分子機構については不明な点が多い。

そこで本研究は、抗癌剤治療後に外科的に切除された臨床検体から膵癌細胞と CAFs を抽出し、これらの共培養系や共移植 patient-derived tumor xenograft (PDX)モデルを駆使して、CAFs がどのように膵癌の治療抵抗性の獲得に寄与しているか、分子レベルで解明する。CAFs と膵癌細胞の相互作用を媒介する遺伝子やシグナルを同定し、膵癌の薬剤抵抗性における CAFs の役割を明らかにする。そして治療効果予測に有用なバイオマーカーの同定や新規個別化治療法開発に役立てることを目的としている。

## 3. 研究の方法

抗癌剤治療抵抗性の膵癌では、抗癌剤投与により CAFs で活性化した特定のシグナルがサイトカインや増殖因子の産生を促進し、近傍の癌細胞にエピゲノム制御を介して、治療抵抗性を促進させていると申請者は推測している。本研究計画では、以下 1 - 3 ) の研究目的を設定し、CAFs が膵癌に抗癌剤抵抗性を教授するメカニズムを解明する。

課題(1) 抗癌剤治療抵抗性あるいは感受性の患者膵癌よりの PDX モデル作製およびオルガノイド培養の樹立

我々は 40 例の患者大腸癌組織を高度免疫不全マウスに皮下・同所移植し、13 症例の継代可能な大腸癌 PDX モデルマウスの樹立に成功した(特許出願: 患者原発性大腸癌の個別化転移モデルマウスの作製方法、発明者:小島他 6 名、出願番号: 2013-193525, 出願日: 平成 25 年 9 月 18 日; Mizukoshi K., et al., *Int J Cancer*, 2020)。

今回、膵癌でも同様に継代可能な膵癌 PDX モデルマウスの樹立を目標とする。すでに先行研究において申請者らは 1 例の cisplatin 抵抗性膵癌の小切片(直径 7 mm 程度)を採取し、マトリゲルとともに高度免疫不全 NOD/Shi-scid,IL-2R KO マウス(以下 NOG マウス)の皮下組織に移植し PDX モデルを作製した。移植 1 か月後に直径 1 cm の腫瘍の増大を認めた。PDX の HE 染色組織標本において患者膵癌と類似した癌組織の形態が観察された。

以上、本研究で用いる PDX モデルは患者癌の性質を形態的に維持しており、問題はなく遂行できる状況にある。

本計画では、抗癌剤治療後に治療抵抗性または感受性を示したそれぞれ 3 例の膵癌手術症例

の切除検体からの腫瘍組織を NOG マウスに移植して PDX モデルを作製する。その後、PDX の癌塊を採取、collagenase で消化、最終的に single cell suspension を作製し、膀胱癌細胞オルガノイド培養を樹立する予定である。

#### 課題（2）抗癌剤治療抵抗性あるいは感受性膀胱癌からの CAFs の単離

抗癌剤抵抗性あるいは感受性のそれぞれ 6 例の患者膀胱癌より CAFs を初代培養する。以前、申請者らは患者乳癌より CAFs の初代培養に成功している。膀胱由来の CAFs の樹立も同様のプロトコルを用いて施行する。

なお、進行膀胱癌に対しては術前化学療法を標準治療として行う傾向にあり、治療前後で胸腹部 CT 検査および切除検体の病理組織学検査において、Grade 分類により腫瘍の組織学的残存状況を確認している。これらの所見を用いて臨床的に術前化学療法がより奏効した症例と、治療効果に乏しかった群をグループ分けする予定である。

#### 課題（3）抗癌剤治療抵抗性を促進する CAFs 由来因子の同定および機能解析

申請者らは、上記の膀胱癌 PDX より癌オルガノイド培養の系を樹立している。CAFs が膀胱癌の抗癌剤抵抗性に寄与しているか確認するため、抗癌剤感受性膀胱癌由来のオルガノイドに抗癌剤耐性または感受性膀胱癌由来 CAFs より採取した培養上清を添加し、5-FU や cisplatin で処理後に癌細胞増殖や癌細胞死を評価する。

具体的には、抗癌剤感受性膀胱癌オルガノイドが、抗癌剤耐性膀胱癌由来 CAFs の培養上清の添加で有意に抗癌剤耐性を亢進するか否か確認する。対照的に抗癌剤感受性膀胱癌由来 CAFs の培養上清の添加で、抗癌剤耐性が抑制されるのかも確認する。さらに、マトリゲル上におけるこれらの CAFs と膀胱癌オルガノイドの共培養の系を用いて、上記と同様の実験を施行する。

もし、抗癌剤感受性膀胱癌由来 CAFs と比較して、抗癌剤耐性膀胱癌由来 CAFs が膀胱癌の抗癌剤耐性を促進する場合、DNA マイクロアレイ解析により、抗癌剤抵抗性あるいは感受性膀胱癌由来 CAFs のオミックスデータを比較し、抗癌剤抵抗性膀胱癌由来の CAFs で高発現している増殖因子やサイトカインを同定する。さらに、CAF s で誘導された抗癌剤耐性膀胱癌オルガノイドより RNA を抽出して、DNA マイクロアレイ解析や網羅的オープンクロマチン領域解析（ATAC-Seq）を施行し、抗癌剤感受性膀胱癌と比較して抗癌剤耐性膀胱癌で起こっているエピゲノム異常を明らかにする。

また、抗癌剤抵抗性 CAFs で発現が亢進している増殖因子やサイトカインの上位 3 候補の遺伝子に対して、その発現を shRNA により抑制する実験を行う。これにより、コントロール shRNA を発現した CAFs と比較して、候補遺伝子発現が抑制された CAFs の培養上清の添加が、5-FU や cisplatin 処理後の癌細胞における抗癌剤耐性を抑制するか否か明確にする。さらに抗癌剤耐性の膀胱癌細胞に起こっているエピゲノム異常が CAFs における候補遺伝子の発現抑制により回復しているか否かも検証する。

最終的に、同定された候補遺伝子の CAFs における発現の意義、また、治療抵抗性を予期するバイオマーカーとしての有用性検証のため、患者膀胱癌のコホートを用いた免疫組織染色法にて同定された候補遺伝子を検証する。

## 4. 研究成果

術前化学療法後に手術により摘出された膀胱癌組織より線維芽細胞の樹立を試みた。現在まで 24 例中 15 例において、癌部より CAFs および非癌部より対照線維芽細胞の樹立に成功した。上皮細胞、間葉系細胞や血球系細胞に特異的な抗体を使用した免疫組織染色を施行し純度の高い線維芽細胞が樹立されていることが確認された。

また、RNA-sequencing により非癌部由来の対照線維芽細胞と比較して、CAFs において有意に発現が亢進している遺伝子が多数同定された。これらの遺伝子が治療前より CAFs で高発現していたのかあるいは術前化学療法により CAFs で誘導されたのかは不明である。今後は、CAFs が抗癌剤抵抗性に寄与しているか否か、同定された遺伝子の治療抵抗性への関与を明らかにする予定である。現在まで細胞基質に関する分子の関与がわかりつつある。

膵癌のオルガノイドも 3 例より樹立された。CAFs の培養上清下で膵癌オルガノイドの増殖が可能な 3 D 培養至適条件を現在検討中である。

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 0件）

1. 著者名 Takahashi A, Imamura H, Ito R, Kawano F, Gyoda Y, Ichida H, Yoshioka R, Mise Y, Fukumura Y, Sano K, Saiura A.	4. 巻 16
2. 論文標題 Simulation training in pancreatico-jejunostomy using an inanimate biotissue model improves the technical skills of hepatobiliary-pancreatic surgical fellows	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One .	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0244915.	査読の有無 有
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
---------	---------