

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20824

研究課題名(和文) 膵癌の癌関連線維芽細胞(CAF)表面の糖鎖構造解析による新たなCAF機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of novel CAF functions by analysis of Glycan structures on the surface of cancer-associated fibroblasts (CAFs) of pancreatic cancer.

研究代表者

宮崎 貴寛 (Miyazaki, Yoshihiro)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：90909433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：臨床検体由来の癌関連線維芽細胞(CAF)、脂肪由来間葉系幹細胞(AD-MSC)をin vitroで膵癌細胞株と共培養して得たCAF(DR-CAF, TW-CAF)について、CAF特異的な糖鎖を同定すべくレクチンマイクロアレイを用いて探索した。また、臨床膵癌の組織アレイでレクチン染色を行い、染色強度の違いからCAF特異的な糖鎖の候補の抽出を行った。それらより抽出した候補について、先行研究で得られたRNA-seqのデータと比較したが、膵癌細胞、正常線維芽細胞、CAFの3群で発現量に違いはなかった。CAF heterogeneityの影響が大きいと考えられ、今後は単細胞解析を用いての解析を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回用いたレクチンマイクロアレイで抽出した候補の糖鎖構造については、RNA-seqで特異性の裏付けはとれなかった。昨今注目されているCAF heterogeneityがこの結果に影響している可能性が高い。単細胞解析技術が発展しているため、この技術を用いてCAF heterogeneityの詳細を調べることができれば、CAF特異的なタンパク質や糖鎖を同定することが可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cancer-associated fibroblasts (CAFs) obtained by primary culture of clinical specimens (CAFs derived from clinical specimens), CAFs obtained by direct co-culture of adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) with pancreatic cancer cell lines (DR-CAFs), and CAFs obtained by indirect co-culture (TW-CAFs) were comprehensively searched for CAF-specific sugar chains by We also comprehensively searched for CAF-specific glycans using lectin microarrays to identify CAF-specific glycans in clinical pancreatic cancer tissues. In addition, lectin staining was performed on clinical pancreatic cancer tissues, and candidate CAF-specific glycans were extracted based on differences in staining intensity. The extracted lectin candidates were compared with RNA-seq data obtained in previous studies, and no candidate lectins were found to be differentially expressed in pancreatic cancer cells, normal fibroblasts, and CAFs.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 癌関連線維芽細胞 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

難治性固形癌である膵癌(5年生存率 7-8%)は間質組織を誘導して増殖させ、間質の主要構成細胞である癌関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblast: CAF)と癌細胞がダイナミックに cross talk して癌の発生・増殖が進む。特に膵癌の病理組織像においては増殖した間質が非常に多くを占め、癌の腺管をはるかに凌駕しており、間質が物理的なバリアとなり抗癌剤抵抗性の一因となることは明らかである。加えて、CAF はサイトカインやケモカインなどの分泌によって、癌に直接的に、あるいは免疫細胞などを介して間接的に作用する。癌増殖促進的にも抑制的にも作用する。既存の研究では癌細胞のみが注目され、癌-間質(CAF)相互作用に注目した研究は少ない。よって、膵癌の間質(CAF)に着目した研究が不可欠であった。また、CAF の糖鎖・レクチンに関する研究はこれまであまり行われておらず、癌の間質の機能解明のブレイクスルーになる可能性があった。

2. 研究の目的

CAF の細胞の最外層にある糖鎖構造に着目し、CAF 特異的な糖鎖構造とそれに結合するレクチン明らかにする。それにより癌-間質(CAF)相互作用の解明に迫る。

3. 研究の方法

膵癌 CAF 特異的な糖鎖構造とそれに結合するレクチンの同定

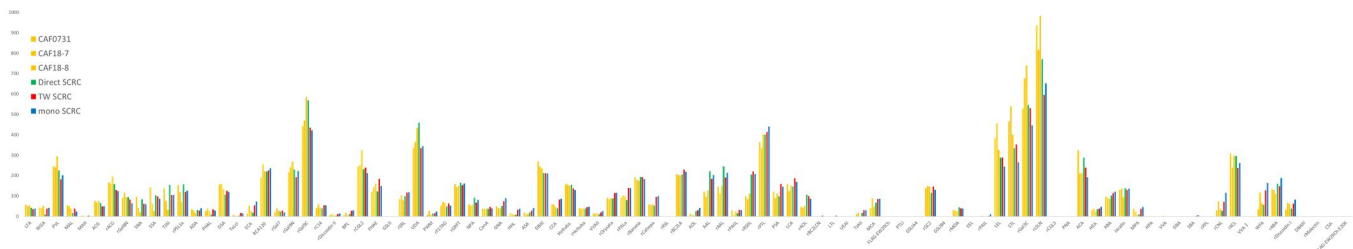
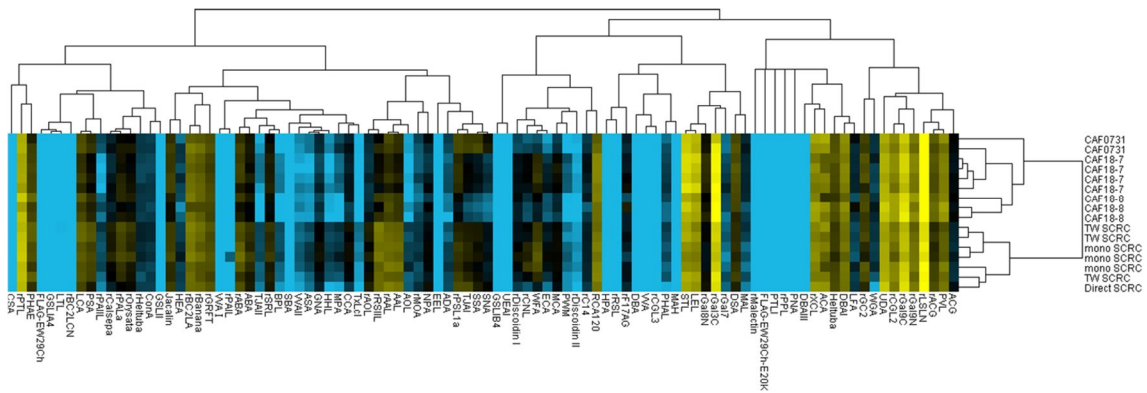
確立した臨床膵癌 CAF とレクチンマイクロアレイ(96種類のレクチンが搭載されている)を用いて CAF 表面の糖鎖構造を網羅的に解析し、糖鎖・レクチン候補の抽出を行った。

臨床膵癌の組織アレイでレクチン組織染色を行い、染色強度の違いから CAF 特異的な糖鎖の候補を抽出を試みた。O型糖鎖の短縮認識レクチン(WFA、CNL、BPL、SSA、PNA)、シアル酸修飾認識レクチン(ACG、SNA、ADA、PSL1a)、フコース修飾認識レクチン(BC2LCN、TJAI、UEAI、AAL)、N型糖鎖の分岐異常認識レクチン(PHA-L)を用いた。SSA、PNA、ACG、SNA、ACG が、候補(*)として抽出された。

抽出した候補(*)について、RNA-seq のデータと比較し、特異性の検証を行った。

4. 研究の成果

確立した臨床膵癌 CAF とレクチンマイクロアレイ(96種類のレクチンが搭載されている)を用いて CAF 表面の糖鎖構造を網羅的に解析し、糖鎖・レクチン候補の抽出を行った。

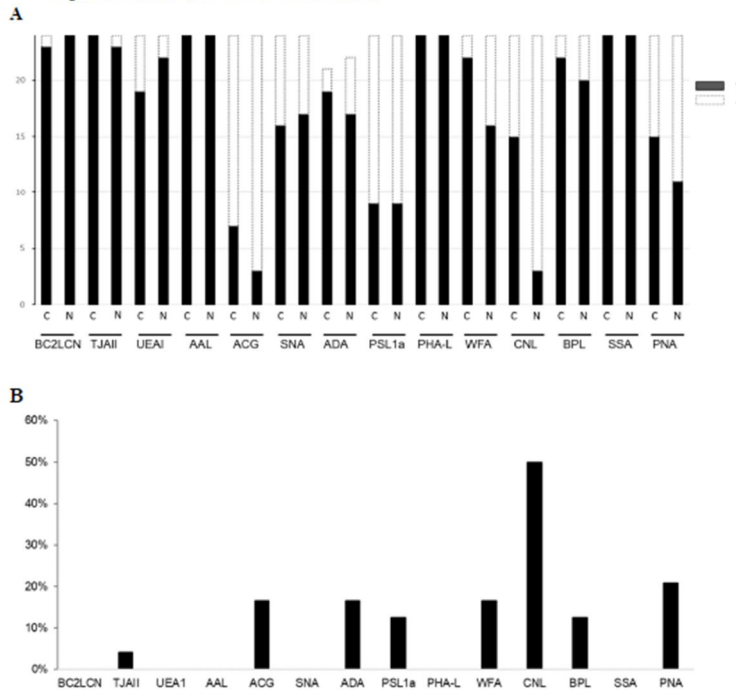


上にレクチンマイクロアレイの結果を示す。

CAF、正常線維芽細胞の代替としてAD-MSC、膵癌細胞の3群で発現量を比較し、CAF特異的レクチン PDAC 特異的レクチン、線維芽細胞特異的レクチンに分類した。の候補なし、の候補は rBC2LCN, TJA II, rGC2, HPA の候補は MAL という結果であった。以上の結果より、レクチンマイクロアレイではCAF特異的なレクチンの抽出は困難だった。

臨床膵癌の組織アレイでレクチン組織染色を行い、染色強度の違いによるCAF特異的糖鎖の候補の抽出

Figure 6. 膵癌におけるレクチン染色結果



膵癌24例に対するレクチン染色結果の(A)陽性率及び(B)正常膵管と比較した変化率を比較した。14種類のレクチン染色で、癌部に組織結合性の高いレクチンは多数認められたが、変化率を考慮すると、CNLが50%と他のレクチンと比較し高い変化率を示した。

臨床膵癌の組織アレイでレクチン組織染色を行い、染色強度の違いから CAF 特異的糖鎖の候補を抽出を試みた。O 型糖鎖の短縮認識レクチン (WFA、CNL、BPL、SSA、PNA)、シアル酸修飾認識レクチン (ACG、SNA、ADA、PSL1a)、フコース修飾認識レクチン (BC2LCN、TJAI、UEAI、AAL)、N 型糖鎖の分岐異常認識レクチン (PHA-L)を用いた。SSA、PNA、ACG、SNA、ACG が、候補 (*) として抽出された。

組織マイクロアレイで抽出した候補の RNA-seq のデータ比較による特異性の検証

CAF 認識レクチンの候補 (*) について、先行研究で得られた RNA シークエンスのデータと比較参照したが、膵癌細胞、正常線維芽細胞、CAF の 3 群で発現量が異なるものは見られなかった。

5 . 今後の展望

今回用いたレクチンマイクロアレイ、組織アレイで抽出した候補の糖鎖構造については、RNA-seq で特異性の裏付けはとれなかった。昨今注目されている CAF heterogeneity がこの結果に影響している可能性が高い。一細胞解析技術が発展しているので、この技術を用いて CAF heterogeneity の詳細を調べることができれば、CAF 特異的なタンパクや糖鎖を同定することが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------