

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659615

研究課題名(和文) 膵臓癌間質相互作用におけるオートファジーの役割

研究課題名(英文) The role of autophagy in tumor-stromal cell interaction

研究代表者

仲田 興平 (NAKATA, Kohei)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30419569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌が極めて予後不良な癌腫である理由には、早期から浸潤、転移を生じる生物学的悪性度の高さが治癒切除を困難にしている点や、豊富な細胞外基質を伴う過剰な間質増生(desmoplasia)のもたらし不足血性環境を原因とする化学療法抵抗性が挙げられる。本研究において我々は膵星細胞の樹立を行い、樹立した膵星細胞におけるオートファジー活性化の測定を行った。また、星細胞と膵癌細胞の共培養で膵癌細胞の浸潤が促進し、更にオートファジー抑制剤3MAの添加で膵癌細胞の浸潤が抑制されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We established pancreatic stellate cells from pancreatic cancer tissue obtained during surgery. We identified the autophagy levels in each pancreatic stellate cells and found the levels were different in each cells. We also found the invasiveness of pancreatic cancer cell lines were increased with co-culture with pancreatic stellate cells and identified that its invasiveness was decreased with 3MA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓癌 オートファジー 癌間質相互作用

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌が極めて予後不良な癌腫である理由には、早期から浸潤、転移を生じる生物学的悪性度の高さが治癒切除を困難にしている点や (Bhowmick, Nature, 2004)、豊富な細胞外基質を伴う過剰な間質増生 (desmoplasia) のもたらす乏血性環境を原因とする化学療法抵抗性が挙げられる (Olive, Science, 2011)。膵間質に存在する膵星細胞 (Pancreatic Stellate Cells; PSCs) が同定され、種々の液性因子の分泌を介し膵癌細胞の浸潤、転移を促進し (Vonlaufen, Cancer Res, 2008)、さらには Desmoplasia を形成 (Omary, J Clin Invest, 2007) することが報告され、膵星細胞が膵癌の悪性形質を誘導する責任細胞として注目されている。膵星細胞の活性化には膵臓癌細胞からの TGF- β や酸化ストレスが関与する事は分かっているがその詳細なメカニズムは不明である。

オートファジーは新たな癌制御メカニズムとして注目されている。オートファジーは膵星細胞同様、様々な液性因子により惹起される。最近、オートファジーが肝炎における肝星細胞の活性化に関与している事が初めて報告された (Thoen, J Hepatol, 2011)。膵星細胞活性化にオートファジーが関与している事は十分に考えられるが、これまでにそのような報告は無かった

2. 研究の目的

本研究では、膵癌間質細胞とオートファジーの関係を明らかにするため以下の3点を明らかにする。

- 膵癌切除標本を用いた膵星細胞の作成およびオートファジー活性の評価、
- 分離膵星細胞を用いた液性因子およびストレス刺激によるオートファジー活性化の評価
- オートファジー抑制による desmoplasia 形成、膵癌細胞悪性度の変化

3. 研究の方法

1 ヒト膵星細胞株の樹立

現在すでに、膵癌患者より得られる手術切除標本を用いて、BachemやApteらにより報告された方法によりヒト膵星細胞株を20株以上作成する (Bachem, Gastroenterology, 1998、Apte, Gut, 1998)。作成された細胞株は、膵星細胞の特徴とされる Myofibroblast 様の形態を呈し、

α -SMA が陽性であることを確認する。星細胞活性化の指標として Oil-Red-O による脂肪滴、Vimentin、Desmin の免疫染色で行った。

2 活性化膵星細胞におけるオートファジー誘導の確認

活性化膵星細胞でのオートファジー活性を共焦点顕微鏡による GFP-LC3 発現、ウエスタンブロットにて確認した。

実験1において分離した星細胞におけるオートファジー活性化の違いを確認した。我々は既に TGF- β 、低酸素によるオートファジー誘導実験系は既に確立しており (Kayashima, Cancer Sci, 2011)、また TGF- β によるオートファジー誘導実験も確立した。

オートファジーの誘導は低酸素ストレス、TGF- β のみならず、他の酸化ストレスや因子で誘導されることが報告され、膵星細胞の活性化にも様々な因子が関与している。これら他のストレスや因子で Quiescent 星細胞にオートファジーが誘導されるかの確認を行った。

3 膵癌細胞との共培養によるオートファジーを介した膵星細胞活性化の確認

本研究を遂行する為の具体的な工夫

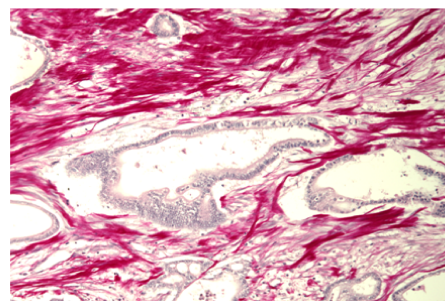
我々はすでに膵星細胞と膵癌細胞との共培養モデルは確立済みである。始めに Quiescent 星細胞が膵癌細胞との共培養により活性化が促進されるかを確認、その際オートファジーが誘導されているかを実験1と同様の方法で観察した。さらにオートファジー抑制剤である 3MA を用いて膵癌細胞との共培養を行い星細胞活性化が抑制されるかを観察した。

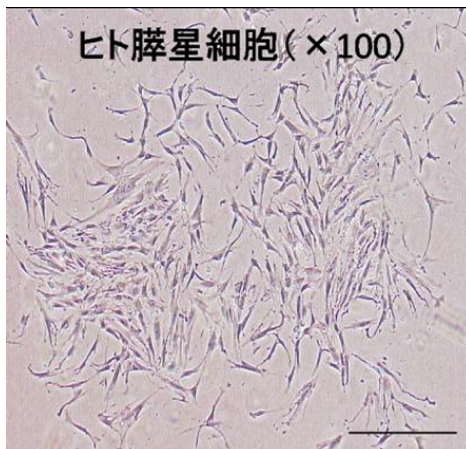
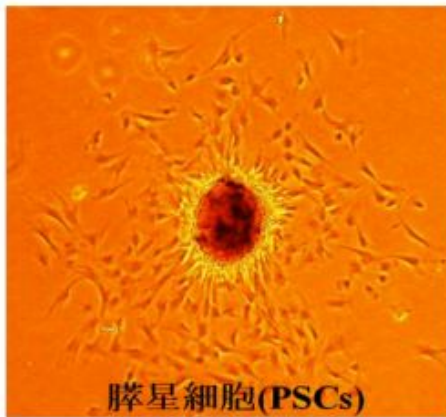
4. 研究成果

1 ヒト膵星細胞株の樹立

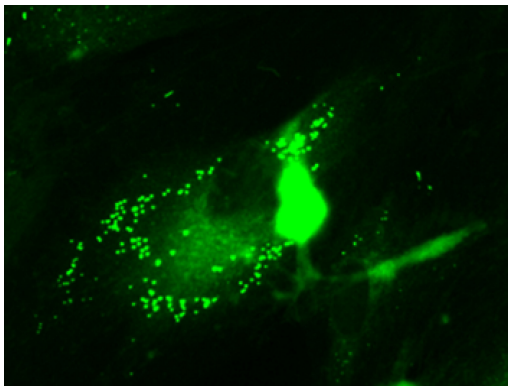
現在すでに、膵癌患者より得られる手術切除標本を用いて、BachemやApteらにより報告された方法によりヒト膵星細胞株を20株以上作成した。作成された細胞株は、膵星細胞の特徴とされる Myofibroblast 様の形態を呈し、免疫染色において α -SMA が陽性であることを確認した。

膵癌 desmoplasia (Sirius red 染色)





2 活性化膵星細胞におけるオートファジー誘導の確認
膵星細胞でのオートファジー活性を免疫染色およびウエスタンブロットにて確認した。結果、星細胞によってオートファジー活性レベルが異なる事を確認した。これまでの報告から各種癌細胞、線維芽細胞で TGF- β 、酸化ストレスによりオートファジーを誘導される事が報告されていた。われわれは飢餓状態、低酸素状態で星細胞のオートファジーが誘導される事を確認した。



3 膵星細胞との共培養による癌細胞浸潤への影響

膵星細胞、癌細胞に 3MA を投与したところ星細胞、癌細胞でオートファジーの誘導が抑制される細胞を認める事を確認した。さらに、膵星細胞と膵癌細胞との共培養モデルを確立、星細胞との共培養において膵臓癌浸潤が促進される事を確認した。癌細胞、膵星細胞共培養下にオートファジー抑制剤 3MA の投与で膵癌細胞の浸潤が抑制される事を確認した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)
全て査読有

1. Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Aishima S, Nagai E, Oda Y and Tanaka M. MicroRNA-373 is down regulated in pancreatic cancer and inhibits cancer cell incasion. *Annals of Surgical Oncology*. 2014;*in press*
2. Kasetsermwiriyi W, Nagai E, Nakata K, et al. laparoscopic surgery for gastric intestinal stromal tumor is feasible irrespective of tumor size. *J laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2014;Mar;24(3):123-9
3. Nagai E, Ohuchida K, Nakata K, Toma H, Tanaka M. Feasibility and safety of intracorporeal esophagojejunostomy after laparoscopic total gastrectomy: Inverted T-shaped anastomosis using linear staplers. *Surgery*. 2013;153(5):732-8
4. Morimatsu K, Aishima S, Yamamoto H, Hayashi A, Nakata K, Oda Y, Shindo K, Fujino M, Tanaka M, Oda Y. Insulin-like growth factor II messenger RNA-binding protein-3 is a valuable diagnostic and prognostic marker of intraductal papillary mucinous neoplasm. *Hum Pathol*. 44(9):1714-21, 2013

〔学会発表〕(計 1 件)

1 K Nakata et al, Salinomycin induced Autophagy and is Related with its Killing Effect for Pancreatic Cells. American Pancreatic Association, 44th Annual Meeting, 2013/10/31,Miami

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
該当なし

取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

仲田 興平 (NAKATA Kohei)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：30419569

(2)研究分担者

白羽根 健吾 (SHIRAHANA Kengo)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10529803