

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462117

研究課題名(和文) 膵星細胞を介したマトリックス・リモデリングによる膵癌治療の新展開

研究課題名(英文) The development of pancreatic cancer therapy based on regulating extracellular matrix remodeling by pancreatic stellate cells

研究代表者

宮坂 義浩 (MIYASAKA, Yoshihiro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40507795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膵癌切除組織より樹立した膵星細胞から三次元細胞外マトリックスを作成した。低酸素下ではマトリックス線維の平行性は増加し、マトリックス上で癌細胞を培養すると、平行な線維の割合が多いほど、癌細胞の運動の直線性は増加した。低酸素下で増大するマトリックスリモデリング因子のひとつとしてPLOD2を見出した。PLOD2抑制膵星細胞より作成したマトリックスは、線維の平行性は減弱した。膵癌浸潤能増強の機序の一つとして、癌間質リモデリングによる易浸潤性の微小環境形成がある。低酸素下による癌間質リモデリング遺伝子として膵星細胞のPLOD2が同定でき、PLOD2を標的とすることで膵癌の浸潤抑制が期待される。

研究成果の概要(英文)：We generate cell-free 3D matrices from PSCs. The cell-free 3D matrices containing abundant fibronectin and collagen fibers closely resembled in vivo stromal matrices. To assess the impact of hypoxia on ECM organization, we measured fibronectin fiber orientation in 3D matrices derived from PSCs. We found that 3D matrices from PSCs under hypoxia displayed an organized parallel fibronectin orientation compared with random fiber arrangement in the 3D matrices derived from PSCs under normoxia. Cancer cells movement within 3D matrices derived from PSCs under hypoxia was directionally persistent. PLOD2 in PSCs was the gene that potentially regulates ECM fiber architecture under hypoxia. Knockdown of PLOD2 in PSCs blocked parallel fiber architecture of 3D matrices, leading to decreased directional migration of cancer cells within the matrices.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 膵星細胞 細胞外マトリックス 低酸素 PLOD2

1. 研究開始当初の背景

膵癌は過剰な間質増生 (desmoplasia) を病理学的特徴としてもつ。Desmoplasia の主体である膵星細胞は、癌細胞の悪性度を増し、増殖、浸潤、転移を促進する。また、過剰に増生された間質は癌細胞への薬剤到達高率を低下させるなど、膵癌治療抵抗性の一因でもある。よって、間質を制御する治療戦略は膵癌治療に革新をもたらす可能性があり、Oliveら(1)は間質のhedghog経路を阻害することで、間質圧を減少させ、治療抵抗性を改善することや、Provenzaonoら(2)はヒアルロン酸阻害剤を用いて細胞外マトリックスを減少させて、薬剤到達効率を改善することなど報告しており、間質の量的特性を制御するアプローチが試みられてきた。

一方、間質の質的特徴が細胞機能に影響を与えることが知られており、Leventalら(3)は、コラーゲンを架橋させて硬化した間質を有する組織では、integrinシグナル系を介して浸潤能が増すことや、Goetzら(4)は線維芽細胞の形質を制御することで、細胞外マトリックスの配列や硬度に違いが生まれ、癌の転移能に差が出ることを報告しており、細胞外マトリックスの硬度が細胞の分化、増殖、運動性に重要な役割を果たしている。

このことから我々は、膵癌において細胞外マトリックスのダイナミクスを司る膵星細胞に注目し、膵星細胞を介した間質の質的特性の制御、“マトリックス・リモデリング”による膵癌治療戦略を着想するに至った。

2. 研究の目的

我々はかねてから、膵癌浸潤における膵星細胞の役割について研究しており、放射線照射された線維芽細胞がHGF分泌を介して膵癌の浸潤を促進すること(5)、CD10陽性膵星細胞集団が膵癌の浸潤を促進すること(6)、CD133を発現する膵癌細胞集団が、膵星細胞影響を強く受け、浸潤能を亢進させること(7)のなど、膵癌細胞、膵星細胞のheterogenityに注目した詳細な細胞間ネットワークについて解明を進めてきた。また膵間質の特徴による癌浸潤のメカニズムにも注目し、具体的な間質制御の研究も進め、肺線維症の治療薬であるPirfenidoneが、膵癌間質を減少させてジェムザールの効果を増すこと(8)などを報告してきた。

これら膵星細胞・間質に関する多様な基礎的研究や膵癌浸潤メカニズムの研究の蓄積を生かし、間質の細胞外マトリックスの量的特性を制御するだけでなく、多様なphenotypeを有する膵星細胞を介して細胞外マトリックスの質的特性を制御することができれば、癌の浸潤・転移を制御することができると考え、細胞外マトリックスの質的特性を制御する“マトリックス・リモデリング”による新規膵癌治療の開発を目的とした。

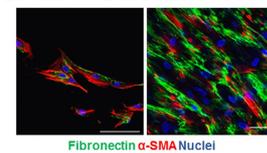
3. 研究の方法

当研究室で樹立した膵星細胞から三次元細胞外マトリックスを作成する。膵星細胞のphenotypeと細胞外マトリックスの硬度や配列変化といった質的特性を評価する。また、膵星細胞が細胞外マトリックスの質的特性に与える影響とそのメカニズムの解明を進める。次に、膵星細胞由来の三次元細胞外マトリックス上で膵癌細胞を培養し、その形態変化や機能変化を調べる。以上の結果をもとに、機能制御を試みた膵星細胞が作り出す細胞外マトリックス上において、膵癌細胞の悪性度を評価する。最後に、膵癌自然発生モデルマウスを用いて、膵星細胞を介した細胞外マトリックスの質的特性の制御を標的とした新規膵癌治療法の開発を目指す。

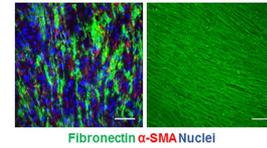
4. 研究成果

我々は、ヒト膵癌切除組織より樹立した膵星細胞(図1A)から三次元細胞外マトリックスを作成することに成功した。膵星細胞から作成した三次元細胞外マトリックスは、フィブロネクチンや型コラーゲンを豊富に有し(図1B)、生体内の間質に類似した特徴を示していた。作成した三次元マトリックス上で膵癌細胞を培養すると、通常ディッシュ上で培養と比較して、癌細胞の上皮間葉転換を促進することが判明した。

図1 A. ヒト切除組織から樹立した膵星細胞

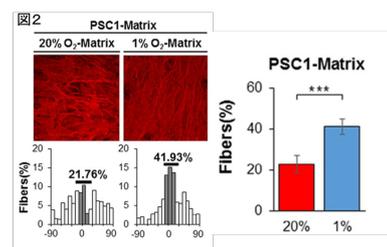


B. 膵星細胞から作成した3次元マトリックス



我々が作成した、コラーゲンゲルを用いた膵癌細胞と膵星細胞の三次元培養モデルでは膵星細胞が浸潤する際に、コラーゲン線維を浸潤方向に変化させ、癌細胞の浸潤を促進していることが判明しており、膵星細胞が形成した三次元細胞外マトリックスの質的特性を調べるために、その線維配列を観察したところ、細胞外マトリックス線維はランダムに配列されていたが、作成する際の細胞数が多いほど平行な線維の割合が増加した。平行な線維の割合が多いほど、三次元細胞外マトリックス上での癌細胞の運動は線維方向に沿って直線的に増加することが判明した。

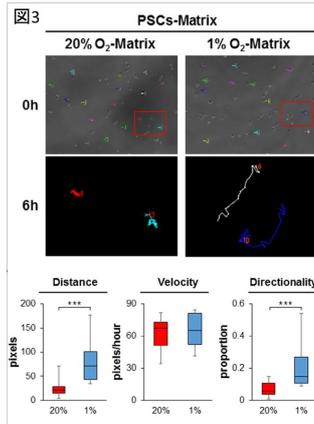
膵星細胞が低酸素下で液性因子を介して腫瘍進展促進性の挙動を示すことから、膵星細胞が作成する細胞外マトリックスの質的特性に影響と与える因子として低酸素に注目した。低酸素下(02 1%)



で膵星細胞から三次元細胞外マトリックスを作成したところ、通常酸素時(02 20%)と比較して、有意に平行な線維の割合は増加した(図2)。

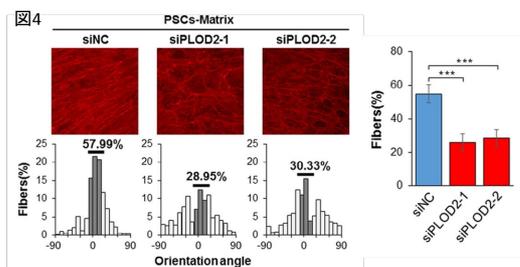
また、低酸素下で膵星細胞より作成された三次元細胞外マトリックスが癌細胞に与える影響について検討するため、低酸素により平行な線維の割合が増加した三次元細胞外マトリックス上で癌細胞株 Panc1 の浸潤速度と運動軌跡をタイムラプスを用いて観察したところ、癌細胞の運動軌跡は、線維方向に沿って直線的に増加した(図3)。

これらから低酸素により平行な線維の割合が増加した三次元細胞外マトリックスでは癌細胞の運動の方向性が示唆された。

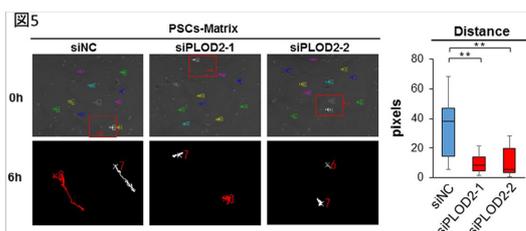


低酸素下および通常酸素下で培養星細胞のマイクロアレイ解析を行い、低酸素下で発現が増大するマトリックスリモデリング遺伝子として PLOD2(procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5 dioxygenase 2)を同定した。免疫化学染色ではPLOD2は膵間質においては正常膵組織より膵癌切除組織で発現が強く、膵星細胞の PLOD2mRNA の発現は、正常線維芽細胞や、膵癌細胞株より高く、低酸素下で増加した。

RNA 干渉により PLOD2 を抑制した膵星細胞により作成した三次元細胞外マトリックスの線維の平衡性は低酸素下で減弱した(図4)。



PLOD2 を抑制した膵星細胞により作成したマトリックス上で膵癌細胞を培養したところ、癌細胞の運動距離はコントロール群と比較して有意に減弱した(図5)。



膵癌浸潤能増強の機序の一つとして、癌間質リモデリングによる易浸潤性の微小環境形成がある。膵星細胞が作成する細胞外マトリックスの質的特徴に影響と与える因子として低酸素があり、低酸素下では細胞外マトリックスの平行な線維の割合が増加し、同マトリックス上では線維方向に沿って、癌細胞の運動軌跡の直線性と直線距離が増強し、細胞外マトリックスの線維配列の変化が癌浸潤を促進している可能性が示唆された。

また、低酸素下による癌間質リモデリング遺伝子として膵星細胞の PLOD2 が同定でき、PLOD2 を治療標的とすることで膵癌の浸潤抑制が期待される。今後はさらに膵癌マウスモデルで膵星細胞の PLOD2 とした間質標的治療を検討し、その有効性を評価していく予定である。

<引用文献>

1. Olive et al., Science 2009.
2. Provenzaono et al., cell 2012.
3. Levental et al., Cell 2009.
4. Goetz et al., 2011.
5. Ohuchida et al., Cancer Res 2004.
6. Ikenaga et al., Gastroenteology 2010.
7. Moriyama et al., Cancer 2010.
8. Kozono et al., Cancer Res 2012.

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4件)

1. Sada M, Ohuchida K, Horioka K, Okumura T, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility Cancer Lett. 372:210-218, 2016. 査読有
doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.016.
2. Zheng B, Ohuchida K, Cui L, Zhao M, Shindo K, Fujiwara K, Manabe T, Torata N, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M. TM4SF1 as a prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma is involved in migration and invasion of cancer cells. Int J Oncol, 47(2):490-498, 2015, 査読有
doi: 10.3892/ijo.2015.3022.
3. Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, Ikenaga N, Fujiwara K, Cui L, Mizumoto K, Tanaka M. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells. Cancer Res, 73(7):2345-2356, 2013, 査読有
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3180

4. Fujiwara K, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Shindo K, Ikenaga N, Cui L, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. Migratory Activity of CD105+ Pancreatic Cancer Cells Is Strongly Enhanced by Pancreatic Stellate Cells. Pancreas, 42(8):1283-1290,2013, 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 肥川和寛、大内田研宙、佐田政史、武居晋、中山宏道、阿部俊也、遠藤翔、奥村隆志、吉田真樹、千々岩芳朗、堀岡宏平、森山大樹、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、大内田理一、植木 隆、永井英司、水元一博、中村雅史 第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016.04.14 大阪
2. Koikawa K, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Horioka K, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Ohuchida R, Ueki T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M. Pancreatic Stellate Cells Lead and Promote the Local Invasion of Cancer Cells, by Physically Remodeling the Extracellular Matrix with Collagen Fiber Alignment in Pancreatic Cancer. American Pancreatic Association 46th Annual Meeting. 2015.11.04 San Diego.
3. 佐田政史、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、堀岡宏平、水内祐介、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、高畑俊一、植木隆、永井英司、水元一博、小田義直、中村雅史、田中雅夫 低酸素誘導性 LOX による癌間質リモデリングが膵癌膵癌浸潤能に与える影響の検討 JDDW2015 第 23 回消化器関連学会週間 2015.10.08 東京
4. 佐田政史、大内田研宙、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、田中友晴、堀岡宏平、鄭彪、水内祐介、藤原謙次、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、高畑俊一、小田義直、水元一博、田中雅夫 低酸素環境下膵星細胞は PLOD2 誘導性間質リモデリングによって膵癌の浸潤を促進する 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015.04.16 名古屋
5. Sada M, Ohuchida K, Fujiwara K, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Tanaka M. Stromal Fiber Orientation Regulate Invasive Directionality of Pancreatic Cancer Cells. DDW 2014.05.03 Chicago.
6. 佐田政史、大内田研宙、堀岡宏平、田中友晴、鄭彪、Cases AI、赤川進、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、大塚隆生、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 膵癌間質の線維配列が癌細胞の形態と浸潤方向に与える影響 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014.04.03 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮坂 義浩 (MIYASAKA, Yoshihiro)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：40507795

(2) 研究分担者

田中 雅夫 (TANAKA, Masao)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：30163570
(2013~2014 年度)

仲田 興平 (NAKATA, Kohei)
九州大学・大学病院・特別教員
研究者番号：30419569

(3) 連携研究者

なし