

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293305

研究課題名(和文) 膵癌微小環境normalizationと浸潤を導くleading cellの解明

研究課題名(英文) Elucidation of leading cell and cancer microenvironment normalization of pancreatic cancer

研究代表者

大内田 研宙 (OHUCHIDA, Kenoki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20452708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン・ゲル三次元培養モデルを作成し、膵癌細胞と膵星細胞を共培養したところ、膵星細胞が膵癌浸潤を先導する形で浸潤しており、さらに基質リモデリングによりコラーゲン配列を浸潤方向に変化させていた。膵星細胞の基質リモデリング因子のひとつとしてEndo180を同定した。Endo180をノックダウンした膵星細胞は浸潤能が抑制され、それに伴い膵癌細胞の浸潤も抑制された。またEndo180を抑制した膵星細胞では、ミオシン軽鎖のリン酸化が減少しており、ミオシン軽鎖を介した細胞骨格のリモデリング能の低下が膵星細胞の運動能力を低下させ、基質リモデリング能が低下すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established 3D in vitro collagen invasion assay to investigate leading cell. We found that Pancreatic stellate cells (PSCs) frequently invaded a collagen matrix with cancer cells, which invaded behind the invading PSCs, and an increase in the number of invading cancer cells in co-cultures with PSCs. Invading PSCs changed the alignment of collagen fibers, resulting in ECM remodeling and an increase in the parallel fibers along the direction of invading PSCs. We elucidate that one of the ECM remodeling factor of PSCs is Endo180. Endo180 knockdown in PSCs attenuated the invasive abilities of PSCs and co-cultured cancer cells, and decreased the expression level of phosphorylated myosin light chain 2 (MLC2). Our findings suggest that PSCs lead the local invasion of pancreatic cancer cells by physically remodeling the ECM, possibly via the function of Endo180, which reconstructs the actin cell skeleton by phosphorylation of MLC2.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Pancreatic cancer PSCs Leading cell ECM remodeling Cancer micro environment Normalization

1. 研究開始当初の背景

膵癌には desmoplasia と呼ばれる過剰な癌間質増生がある。この癌間質は癌細胞の刺激により活性化した線維芽細胞様の膵星細胞 (activated PSCs) により形成すると報告されている (Gastroenterology, 2005, Bachem)。また、腫瘍栄養血管と膵癌細胞の間隙を増大させ膵癌細胞への薬剤到達効率を低下させ、膵癌の治療抵抗性を高めている (Science, 2009, K Olive)。この様に膵癌における癌間質形成機序が明らかとなり、新たな膵癌治療標的としての可能性が探られている。

扁平上皮がんにおいては、間質線維芽細胞が高い ECM 分解能により癌細胞に先んじて間質内を浸潤し、癌細胞が通る道筋を形成していることが観察されており (Gaggioli et al., Nature Cell Biol, 2007)、浸潤を先導する leading cells の同定は、癌の進展を制御する上で大きな意義を持つ。従来の癌細胞の浸潤メカニズムに関する研究は、ECM の分解と形成されたスペースへの細胞の遊走に焦点があてられてきたが、最近の報告や当研究室での成果を考えると、分解した ECM の取り込みが浸潤経路の形成、並びに癌の浸潤過程に重要な役割を果たしていると思われる。EMT cells が浸潤するプロセスとして、ECM の分解、遊走、の他に分解した基質を取り込み遊走するスペースを形成するという“第3の浸潤メカニズム”があり、それを解明することで leading cells の進展を制御できるのではないかと考えられる。膵癌細胞の浸潤は PSC により誘導された一部の“leading EMT cells”や“leading PSC”が担っており、これら leading cells の進展をブロックすることで大多数の non-EMT cells を含め膵癌の浸潤を抑制できるのではないかと着想するに至った。今回、これらの知見をもとに膵星細胞により形成される癌間質を標的としその remodeling などによる制御つまり癌間質の正常間質への転換いわゆる normalization によって癌浸潤を先導する leading cell を制御しようと考え、本研究構想に至った。

2. 研究の目的

本研究では癌微小環境の正常化いわゆる normalization により癌浸潤を先導する leading cell を制御する新たな膵癌治療戦略を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

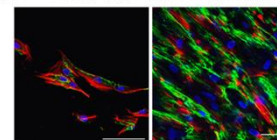
本研究では、膵癌微小環境の normalization により癌浸潤を先導する leading cell の制御を目指した新規膵癌治療システムの開発にとりくむ。まず、膵星細胞の phenotype と細胞外マトリックスの硬度や配列といった質的特性を評価する。膵星細胞の phenotype 別解析により癌の EMT 誘導を主導/先導する leading PSC を同定、その誘導機序を明らかにする。続いて leading cancer cell と leading PSC の生物学的特徴を第3の浸潤

機序“基質クリアランス”に注目して同定する。さらに化合物ライブラリーを用いた癌間質の質的变化をもたらす化合物の探索をすすめ、ヒット化合物が leading cell に与える影響、さらにその機序を解明する。またマウス膵発癌モデルやヒト膵癌切除組織を対象にこれらの機序の関与を明らかにする。最後に、癌微小環境の normalization により癌浸潤を先導する leading cell を制御する新規の膵癌治療法の開発を目指す。

4. 研究成果

①我々は、膵星細胞が細胞外マトリックスに与える影響を検討するため、膵星細胞が作成する細胞外マトリックスを作り出す技術を用いて、ヒト膵癌切除組織から樹立した膵星細胞から細胞外マトリックスを作成した(図1)。三次元細胞外マトリックスは、フィブロネクチンやI型コラーゲンを豊富に有し、通常ディッシュ上での培養と比較して、癌細胞の上皮間葉転換を促進することが判明した。また、その線維配列を解析すると、低酸素下においては通常酸素下と比較して誘因にマトリックスの線維の平行性が増加した(図2)。

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

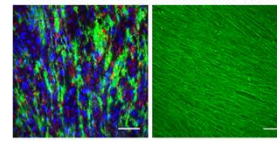
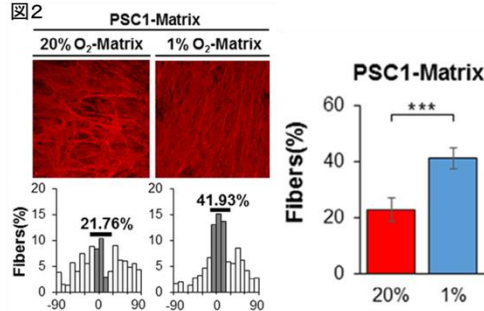
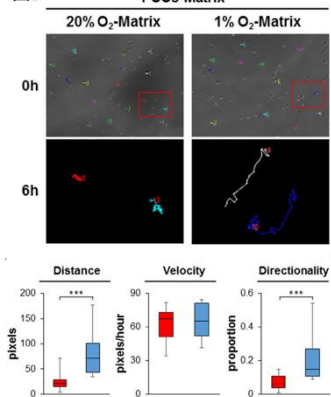


図2



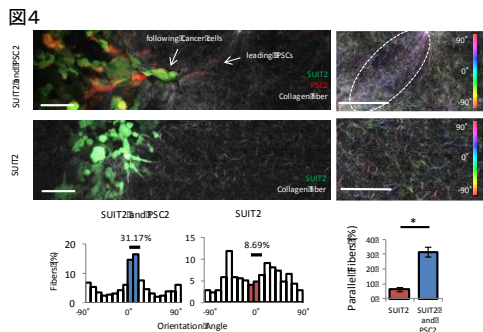
②また、膵星細胞より作成された三次元細胞外マトリックスが癌細胞に与える影響について検討するため、膵星細胞が作り出した細胞外マトリックス上で膵癌細胞を培養して観察したところ、マトリックスの平行な線維の割合が多いほど、膵癌細胞の運動軌跡が増

図3

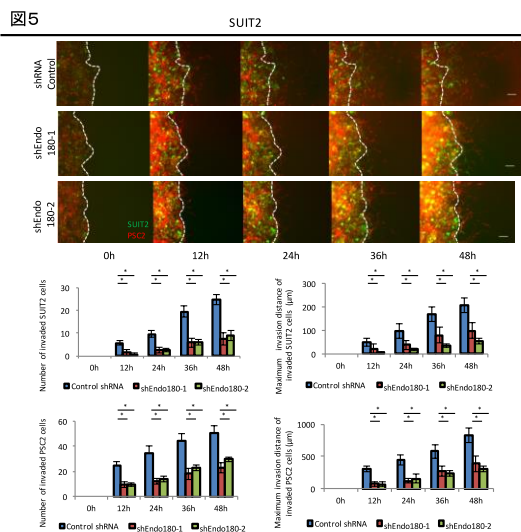


加した(図3)。これらから低酸素により平行な線維の割合が増加した三次元細胞外マトリックスでは癌細胞の運動の方向性が示唆された。

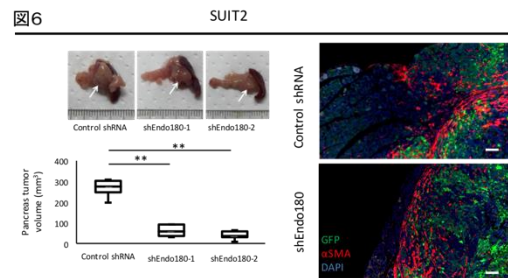
③次に、膵癌浸潤を先導するleading cellの検討を行うため、コラーゲン・ゲルを用いた三次元培養モデルを作成し、膵癌細胞と膵星細胞の培養を行った。ゲル内に膵癌細胞と膵星細胞の共培養群では、膵癌細胞または膵星細胞単独群と比較して、有意に膵癌細胞の浸潤・増殖能が増加した(図4)。また膵癌細胞の浸潤に先立って膵星細胞の浸潤がみられ、leading cellの役割を担う膵星細胞が存在することが判明した。さらに膵星細胞が浸潤したコラーゲン・ゲルは浸潤がないものと比較したところ、有意にコラーゲン線維が浸潤方向に変化がみられ、浸潤した膵星細胞が基質リモデリングを行っていることが示唆された。



④膵星細胞の基質リモデリング因子のひとつとして、コラーゲン取り込みレセプターであるEndo180に注目した。Endo180は膵星細胞に高発現であり、Endo180を抑制した膵星細胞と、膵癌との共培養において、膵癌の浸潤が低下した(図5)

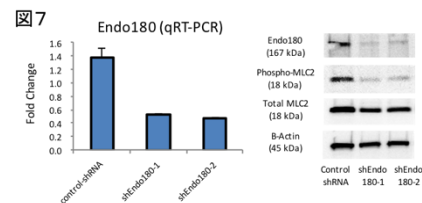


⑤Endo180の膵星細胞のEndo180の発現が生体内で膵癌浸潤能にあたる影響について検



討するため、マウス膵同所移植モデルでの実験を行ったところ、shRNAを用いてEndo180をノックダウンした膵星細胞と膵癌細胞を共移植した群では、コントロール群と比較して有意に膵星細胞の腺房や間質への浸潤能が抑制され、それに伴い腫瘍ボリュームも有意に減少した(図6)。

⑤また Endo180を抑制した膵星細胞では、ミオシン軽鎖II(MLC2)のリン酸化が減少していた。Endo180はRho-ROCKシグナルを介して細胞の運動能を制御することが知られており、膵星細胞においてもミオシン軽鎖IIを介した細胞骨格のリモデリング能の低下が膵星細胞の運動能力を低下させ、基質リモデリング能が低下すると考えられた。



⑥膵癌においてはleading cellの役割を担うPSCが存在し、基質リモデリングを行ってコラーゲン線維の配列を変化させることで、癌の浸潤を促進している可能性が示唆された。また、PSCの基質リモデリング因子のひとつとしてEndo180を同定した。Endo180はMLC2のリン酸化を介して細胞骨格のリモデリングに関与しており、Endo180を抑制するとPSCの運動能を低下させ、基質リモデリング能が低下すると考えられる。膵星細胞のEndo180を抑制することで基質リモデリングが低下し、癌浸潤が抑制されたことから、膵星細胞のEndo180は治療標的となる可能性がある。

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5件)

1. Okumura T, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo T, Koikawa K, Iwamoto C, Miura D, Mizuuchi Y, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M. Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose

- microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, 8(11)18280-18295, 2017. 査読有
doi:10.18632/oncotarget.15430.
- Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Mizuuchi Y, Iwamoto C, Murata M, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M. Autophagy is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice. *Gastroenterology*, 152(6)1492-1506, 2017, 査読有
doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.010
 - Yoshida M, Miyasaka Y, Ohuchida K, Okumura T, Zheng B, Torata N, Fujita H, Nabae T, Manabe T, Shimamoto M, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M. Calpain inhibitor calpeptin suppresses pancreatic cancer by disrupting cancer-stromal interactions in a mouse xenograft model. *Cancer Sci*, 107(10)1443-1452, 2016, 査読有
doi: 10.1111/cas.13024
 - 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 Letters*, 372(2)210-218, 2016, 査読有
doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.016.
 - Horioka K, Ohuchida K, Sada M, Zheng B, Moriyama T, Fujita H, Manabe T, Ohtsuka T, Shimamoto M, Miyazaki T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Suppression of CD51 in pancreatic stellate cells inhibits tumor growth by reducing stroma and altering tumor-stromal interaction in pancreatic cancer. *Int J Oncol*, 48(4)1499-1508, 2016, 査読有
doi: 10.3892/ijo.2016.3374.

[学会発表] (計 6 件)

- 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. Endo180 regulate phosphorylation of myosin light chain 2 activity and increase the ability of extracellular matrix remodeling in leading pancreatic stellate

cells. American Pancreatic Association 47th Annual Meeting, 2016.10.27, Boston(USA)

- 肥川和寛、大内田研宙、佐田政史、阿部俊也、遠藤翔、奥村隆志、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. 膵星細胞は基質リモデリングにより、leading cell として膵癌浸潤を先導する. 第116回日本外科学会, 2016.04.14, 大阪国際会議場(大阪市)
- 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、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、小田義直、中村雅史. 低酸素下膵星細胞による癌間質マトリックス・リモデリングは膵癌浸潤能を増強する. 第116回日本外科学会, 2016.04.16, 大阪国際会議場(大阪市)
- 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, 2015.11.04~11.07, San Diego(USA)
- 肥川和寛、佐田政史、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、真鍋達也、大塚隆生、高畑俊一、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、田中雅夫. 膵癌細胞の浸潤機序-浸潤を先導する leading cells の同定・解析-JDDW2015 第23回消化器関連学会週間, 2015.10.08~10.11, グランドプリンスホテル新高輪(東京都)
- 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, 2015.10.08~10.11, グランドプリンスホテル新高輪(東京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

大内田 研宙 (OHUCHIDA, Kenoki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20452708

(2) 研究分担者

前山 良 (MAEYAMA, Ryo)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10611668
(2014 年度)

大塚 隆生 (OHTSUKA, Takao)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：20372766
(2014～2015 年度)

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

村田 正治 (MURATA, Masaharu)
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授
研究者番号：30304744

江上 拓哉 (EGAMI, Takuya)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：40507787
(2014 年度)

宮坂 義浩 (MIYASAKA, Yoshihiro)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：40507795
(2014 年度)

坂井 寛 (SAKAI, Hiroshi)
九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80611281
(2014 年度)

真鍋 達也 (MANABE, Tatsuya)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：60546464
(2014 年度)

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()