

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462062

研究課題名(和文) 膵星細胞のマトリックス・リモデリングにおける免疫細胞の役割とその制御

研究課題名(英文) Regulation of extracellular matrix remodeling induced by stellate cells and immune cells in the pancreatic tumor microenvironment

研究代表者

難波江 俊永 (NABAE, Toshinaga)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10467889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は癌細胞の悪性度や治療抵抗性と深く関わっている細胞外マトリックスのリモデリングの機序や膵星細胞、炎症細胞の担う役割を明らかとし、新たな治療戦略を開発することである。初代培養した活性化型膵星細胞が作成するコラーゲンマトリックスは低酸素培養条件下ではより平行化し、癌細胞の浸潤を促進した。また、低酸素下で発現が誘導されるコラーゲン修飾因子としてPLOD2を同定した。活性化膵星細胞が作成するコラーゲンマトリックスは、正常脂肪組織由来の間質細胞が作るコラーゲンマトリックスと比較して、密で硬い構造であることを同定し、間質細胞の多様性がマトリックスの構造に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the mechanism and contribution of stellate cells and immune cells in of remodeling extracellular matrix of pancreatic cancer. We isolated activated stellate cells (PSCs) from human pancreatic cancer and analyzed the structure of collagen matrix produced by PSCs. Under hypoxic condition, the alignment of collagen fiber became parallel and enhanced motility of pancreatic cancer. We identified PLOD2 as a major collagen modifying enzyme under hypoxia. We also identified collagen matrix produced by PSCs was denser and stiffer than that of adipose tissue derived stromal cells, which means heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer influences mechanical structure of extracellular matrix in pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞外マトリックス リモデリング 膵星細胞 免疫細胞 低酸素環境 PLOD2 脂肪由来幹細胞

1. 研究開始当初の背景

膵癌は癌死の5位を占める予後不良の疾患で、ここ20年で十分な治療成績の改善が得られていない。膵癌は豊富な細胞外基質を伴う過剰な間質増生(desmoplasia)を病理学的な特徴とする。細胞外基質の成分はコラーゲンやプロテオグリカンであり、これらの産生は活性化膵星細胞が中心的な役割を担っていることが報告されてきている。この細胞外基質は、癌細胞増殖の足場となって悪性度に関与することや、薬剤送達率を低下させることで治療抵抗性の原因となっていることが報告されており、細胞外基質の量的・質的な制御は膵癌治療の新たな治療標的となることが期待されている。

MMP(マトリックスメタロプロテアーゼ)は、細胞外基質の分解に関与し、マトリックスリモデリングの中心となる液性因子の1つである。MMPの産生は癌細胞だけでなく膵星細胞、炎症細胞等の種々の細胞が行っている。つまり、マトリックスリモデリングを理解するためには、単に癌細胞を対象とした研究では不十分であり、これらの細胞間の複雑な相互作用を理解する必要がある。

その中でも免疫細胞は腫瘍微小環境内で抗腫瘍効果を発揮するものと、免疫寛容に関与し腫瘍促進性に働くものが存在することが近年明らかとなり、注目されている。しかし、免疫細胞が膵癌微小環境内でマトリックスリモデリングにどのような影響をおよぼしているのかについては不明である。免疫細胞のマトリックスリモデリングに及ぼす役割が明らかとなることで、細胞外基質の制御による新たな治療戦略の確立が期待される。

2. 研究の目的

膵癌のマトリックスリモデリングにおける免疫細胞が担う役割を明らかとし、新たな治療標的を同定することを目的とする。特に、膵星細胞が産生するコラーゲンマトリックスの物理的な構築に対して、どのような因子が影響するのかを解明し、新たな治療戦略の確率を目指す。

3. 研究の方法

膵星細胞および炎症細胞がコラーゲンリモデリングに及ぼす機序を解明するため、研究期間内に以下の実験を行った。

活性化型膵星細胞を初代培養・樹立し、*in vitro*でコラーゲンマトリックスを作成した。

低酸素培養下で作成されるコラーゲンマトリックスの線維配向の変化を解析した。更に、マトリックス上での膵癌細胞の運動軌跡を解析した。

低酸素培養下で発現が亢進するコラーゲン修飾因子としてPL0D2を同定し、その発現抑制実験を行った。

脂肪組織由来幹細胞を初代培養・樹立し、コラーゲンマトリックスの構造を解析した。

マウスの末梢血からセルソーターを用いて好中球を単離した。

4. 研究成果

ヒト膵癌切除標本からoutgrowth法を用いて、活性化型膵星細胞を初代培養し、樹立を行った。活性化型膵星細胞ではSMAが高発現しており、細胞外基質の主要な構成因子であるフィブロネクチンとその発現パターンが一致していた(図1)。この、活性化型膵星細胞をディッシュ上で1週間培養したのちに脱細胞化し、3次元のコラーゲンマトリックスを作成した(図1)。作成されたマトリックスは、膵癌の病理組織像と類似しており、生体を反映した実験モデルであると考えられた。

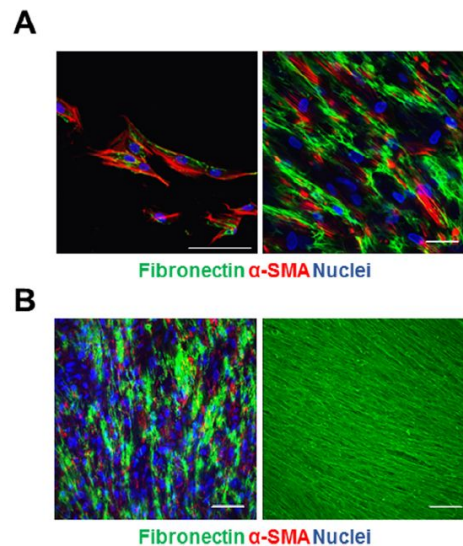


図1. 活性化型膵星細胞によって作成された3次元コラーゲンマトリックス

次に、膵癌組織の特徴である低酸素環境に着目し、低酸素培養下でのコラーゲンマトリックスの構造の変化を解析した。通常の培養条件である酸素濃度20%と比較して、酸素濃度1%下で1週間培養して作成されたコラーゲンマトリックスは、その配向がより平行になっていることが判明した(図2)。

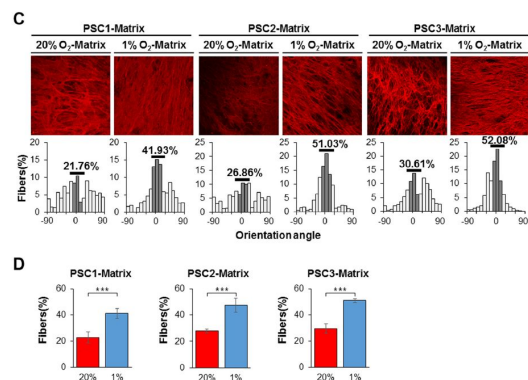


図2. 低酸素培養条件下で作成されるコラーゲンマトリックスの線維配向の変化

このコラーゲンマトリックス上に膵癌細胞株である PANC1 細胞を撒いて、タイムラプス撮影でその運動軌跡を解析した。低酸素培養下で作成されたコラーゲンマトリックス上では PANC1 細胞の運動の方向性が規定され、より遠くへ癌細胞が移動することが観察された(図 3)。

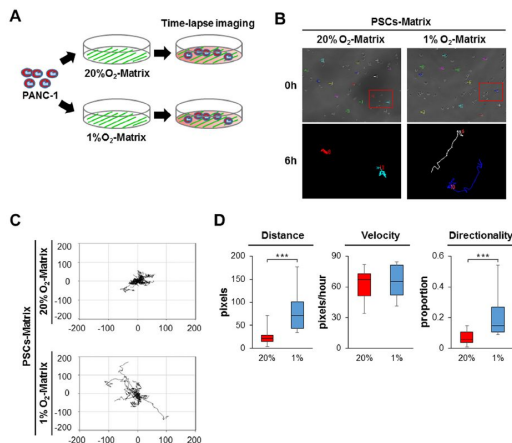


図 3. コラーゲンマトリックス上での PANC1 細胞の運動軌跡

マイクロアレイによる網羅的な解析によって低酸素培養条件下で発現が亢進するコラーゲン修飾因子として、PLOD2 を同定した(図 4)。実際に、低酸素培養下では活性化膵星細胞内では mRNA およびタンパクの発現が亢進することを確認した(図 4)。

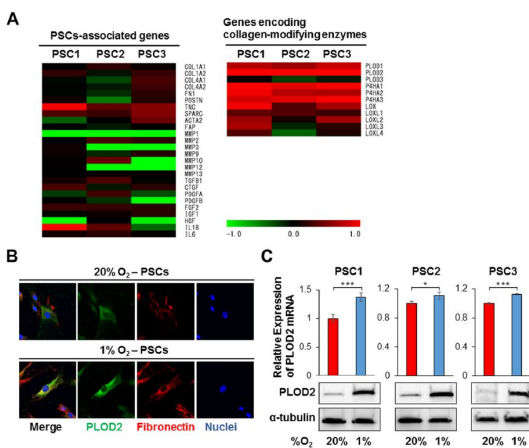


図 4. 網羅的遺伝子解析による低酸素条件下で発現変動がみられるコラーゲン修飾因子の同定

RNA 干渉によって活性化型膵星細胞における PLOD2 の発現抑制を行った。PLOD2 ノックダウンによって、SMA やコラーゲン 1、フィブネクチンのタンパクレベルでの発現変動はみられなかった。しかし、PLOD2 ノックダウンによって低酸素条件下でコラーゲン線維の平行化が抑制された(図 5)。

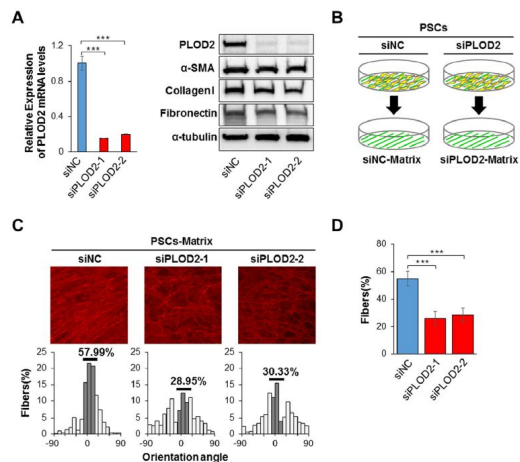
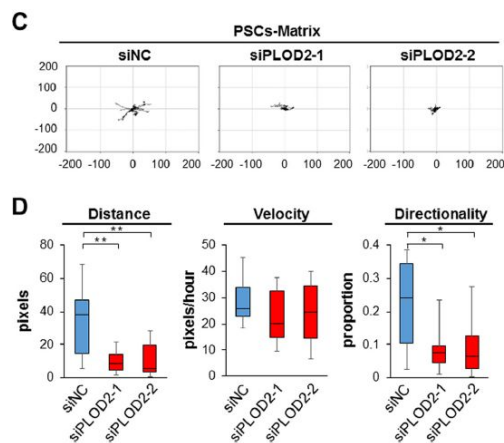


図 5. PLOD2 発現抑制による低酸素条件下でのコラーゲンマトリックスの線維配向の変化

この PLOD2 ノックダウンによって作成されたコラーゲンマトリックス上に PANC1 細胞を撒いてその運動軌跡を解析した。PLOD2 ノックダウンによって作成されたマトリックス上では、膵癌細胞の移動距離が低下することが示され、膵星細胞における PLOD2 はマトリックスリモデリングおよび膵癌細胞の浸潤を制御する新たな治療標的としての可能性が示された(図 6)。

図 6. PLOD2 発現抑制膵星細胞が作成したコラーゲンマトリックス上での PANC1 細胞の運動軌跡



次に、コラーゲンマトリックスの形成に及ぼす他の細胞の影響に着目し、脂肪組織由来幹細胞を初代培養・樹立し、コラーゲンマトリックスの作成・解析を行った。脂肪由来幹細胞がつくるコラーゲンマトリックスは、粗で、軟らかい構造であることが判明した(図 7)。このことから、コラーゲンマトリックスも産生される細胞によって、その立体構造が変化することが示され、腫瘍内間質細胞の多様性

について新たな知見が得られた。

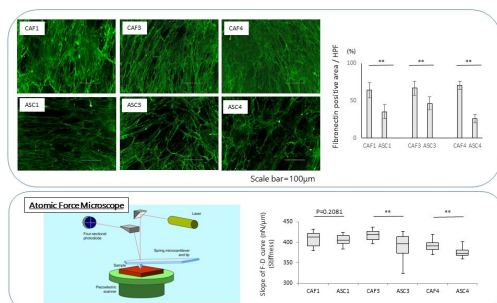


図 7. 脂肪組織由来幹細胞と活性化型膵星細胞が作成するコラーゲンマトリックスの構造の比較

免疫細胞の関与を解析するため、マウスの末梢血中からセルソーターを用いて、CD45、CD11b、Ly-6G の表面抗原によって好中球を単離を行った。好中球の単離、培養に関しては研究期間内で概ね、安定して行えるようになったが、これを用いたマトリックスリモデリングに関する実験には至らなかった。

以上、本研究では膵星細胞が作成するコラーゲンマトリックスのリモデリングに関する因子として低酸素環境や責任遺伝子としての PLOD2 を同定した。また、活性化膵星細胞と脂肪由来幹細胞が作るマトリックスの構築の違いについても新たな知見を見出した。免疫細胞がマトリックスリモデリングに及ぼす影響については、今後引き続き解析を進めていく予定としている。

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 3 件)

1. 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
2. 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*, 272(2)210-218, 2016, 査読有 doi:10.1016/j.canlet.2016.01.016.

3. Chijiwa Y, Moriyama T, Ohuchida K, Nabae T, Ohtsuka T, Miyasaka Y, Fujita H, Maeyama R, Manabe T, Abe A, Mizuuchi Y, Oda Y, Mizumoto K, Nakamura M. Overexpression of microRNA-5100 decreases the aggressive phenotype of pancreatic cancer cells by targeting PODXL. *Int J Oncol*,48(4)1688-1700, 2016, 査読有 doi: 10.3892/ijo.2016.3389.

[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、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 回日本外科学会定期学術集会、2016.4.14,大阪国際会議場(大阪市)
2. 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 回日本外科学会定期学術集会、2016.4.16,大阪国際会議場(大阪市)
3. 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, 2015.11.4 ~ 11.7, San Diego(USA)
4. 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、2015.10.8 ~ 10.11、グランドプリンスホテル新高輪(東京都)
5. 奥村隆志、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、千々岩芳朗、吉田真樹、佐田政史、堀岡宏平、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、脂肪組織由

- 来幹細胞は膵癌細胞の遊走・浸潤を促進し悪性度に関与する。JDDW2015 第 23 回 消化器関連学会週間 2015.10.8～10.11、グランドプリンスホテル新高輪(東京都)
6. 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 2015.4.16～4.18、名古屋国際会議場(名古屋市)

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
()

〔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：
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

難波江 俊永 (NABAE Toshinaga)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10467889

(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

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)

真鍋 達也 (MANABE, Tatsuya)
九州大学・大学病院・講師