

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861084

研究課題名(和文)-癌間質変化による人工ウイルス標的細胞個別化治療戦略の新展開-

研究課題名(英文) Novel development of individualized treatment strategy in artificial viral therapy targeting modification cancer stroma

研究代表者

安井 隆晴 (YASUI, Takaharu)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：60611283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌において、線維芽細胞や細胞外マトリックスから構成される癌微小環境は癌の浸潤、転移、薬剤治療抵抗性に重要な役割を果たしている。量的特徴に注目されている膵癌間質の質的特徴の解明、質的变化が膵癌に及ぼす影響を検討した。

膵星細胞によって形成される細胞外マトリックスは、膵癌細胞の上皮間葉転換を促進する可能性を見出した。また、低酸素環境が、膵星細胞の産生する細胞外基質のリモデリングを通して、膵癌細胞の遊走を促進することを原著論文で報告した。さらに、膵星細胞は細胞外基質のリモデリングを行い、コラーゲン線維の配列を変化させることで癌の浸潤を亢進している可能性が示唆されたことを国内外の学会で発表した。

研究成果の概要(英文)：In pancreatic cancer, cancer microenvironment composed of fibroblasts and extracellular matrix play an important role in invasion, metastasis, and anti-cancer drug resistance. We studied qualitative characteristics of pancreatic cancer stroma that have been focused on quantitative features, and investigated how the impact of this qualitative change on pancreatic cancer.

We found the possibility that extracellular matrix, formed by pancreatic stellate cells, promote the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells. Further, we reported in the original papers that hypoxia promoted the migration of pancreatic cancer cells through the remodeling of extracellular matrix produced by pancreatic stellate cells. In addition, we announced at domestic and international scientific meeting that pancreatic stellate cells perform remodeling of the extracellular matrix, and that can enhanced invasion of cancer cells by remodeling the arrangement of collagen fiber.

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 人工ウイルス

1. 研究開始当初の背景

従来の膵癌研究は腫瘍細胞自体を中心として進められてきたが、革新的な治療法の開発には至っていない。近年、膵癌が治療抵抗性を示す一因として、癌間質に注目が集まっている。特に、膵癌は豊富な細胞外基質を伴う **desmoplasia** が病理学的な特徴であり、この癌間質は癌細胞の刺激によって活性化した線維芽細胞様の膵星細胞により形成されると考えられている (*Gastroenterology*, 2005, Bachem)。この癌間質は腫瘍栄養血管と膵癌細胞の間隙を増大させることで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 (K Olive, *Science*, 2009)。

間質の質的特性が細胞機能に影響を与えることは知られているが、質的特性に関する理解はほとんど進んでいない。Levental らは、細胞外マトリックスの主要成分である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** シグナル系を介し浸潤能が増すことを乳癌モデルで見出した (Levental et al., *Cell*, 2009)。Goetz らは、線維芽細胞の形質を制御することで微小環境における細胞外マトリックスの配列や硬度に違いが生まれ、癌の転移能に差がでることを見出した (Goetz, et al., *Cell*, 2011)。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着目し、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に注目した。

また、我々は全く新しい **Drug Delivery System** として古細菌由来の **Mj285** を用いたナノシステムの開発を進めてきた。我々のシステムの最大の特徴は、ウイルス様細胞侵入・脱核を模倣するナノ粒子作成過程において意図する蛋白の遺伝子導入を行うことで、ナノカプセルの標識を可能としており、標的細胞に対する高い選択性を実現できることである。

2. 研究の目的

膵星細胞が癌間質形成に及ぼす影響とその癌間質のremodelingによるnormalizationの2つに着目して、それらを制御する薬剤を同定し、さらには人工ウイルスに既存の抗癌剤や抗線維化薬を内包させそれらを併用することで、癌間質がもたらす膵癌治療抵抗性を克服し、新たな膵癌治療戦略を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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 (Bachem, *Gastroenterology*, 1998, Apte, *Gut*, 1998) によりヒト膵星細胞を作成する。

また作成した細胞が、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。さらに Vimentin や CD90 が陽性であること、CK19 が陰性であることを免疫染色で確認する。

(2) 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する。さらに、作成したマトリックス上で培養した膵癌細胞の変化を観察する。

(3) 膵星細胞が作り出す細胞外基質は、膵星細胞の活性化因子として知られる TGF β の添加や低酸素状態によってどのように変化するかを、膵星細胞の 3D 培養によって得られた細胞外基質の蛍光免疫染色によって検討する。

(4) さらに膵星細胞の 3D 培養によって得られた細胞外基質の低酸素状態による変化が、膵癌細胞の運動能に与える影響を、タイムラプスイメージングとその統計解析によって検討する。

(5) コラーゲンゲルを用いて、膵癌細胞と膵星細胞の三次元共培養モデルを作成し、膵癌細胞の浸潤・増殖能を検討する。また、浸潤様式を蛍光顕微鏡・共焦点顕微鏡・免疫染色法によって観察する。

4. 研究成果

(1) 膵星細胞の癌間質形成誘導機序を検討するにあたり、まず我々はヒト膵癌切除組織より樹立した膵星細胞を蛍光免疫染色で確認した(図1)。

(2) 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。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た(図1)。

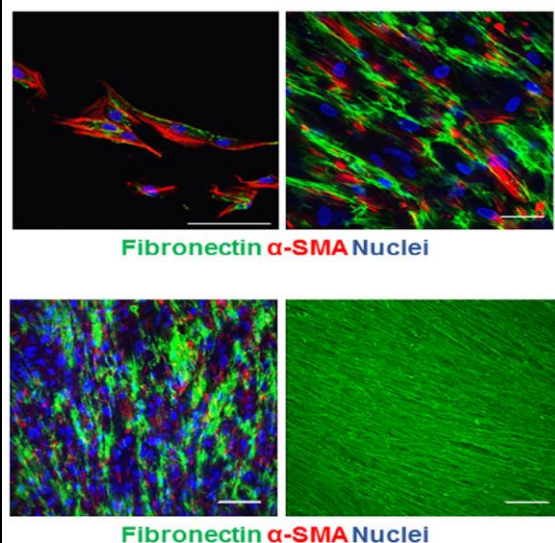


図1：膵星細胞と、膵星細胞から作成した細胞外マトリックスの蛍光免疫染色画像。

ヒト膀胱細胞から作成した、細胞外マトリックス上で癌細胞を培養すると、癌細胞の形態は通常のディッシュやI型コラーゲンをコートしたディッシュ上での培養と比較して、紡錘形となり有意なビメンチンの発現増加、E-カドヘリンの発現低下を認め、三次元細胞外マトリックスは癌細胞の上皮間葉転換を促進することが判明した。

(3) 膀胱細胞が細胞外マトリックスの質的特性に与える影響を検討したところ、作成する際の細胞数が多いほどマトリックスの平行な線維の割合が増加することが判明した。膀胱細胞の活性化因子として知られるTGFβを添加したところ、細胞外マトリックスに有意な変化はみられなかったが、低酸素下で膀胱細胞が作成した細胞外マトリックスは正常酸素下と比較して平行な線維の割合が増加した(図2)。

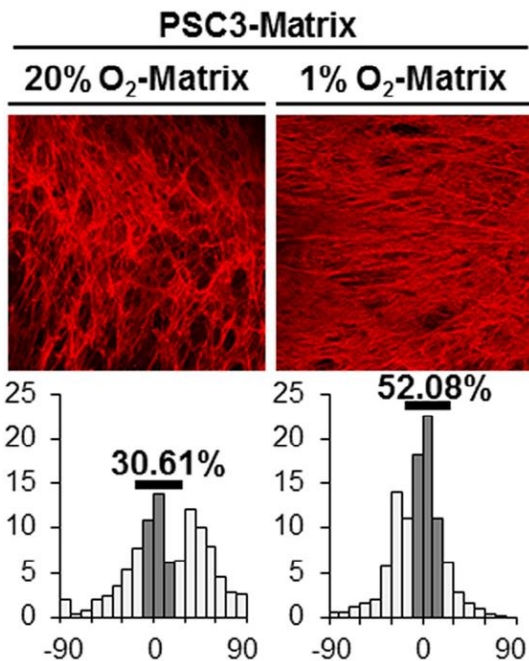


図2：膀胱細胞の3D培養によって得られた細胞外基質。低酸素環境での培養によって、線維方向がより平行となった。

(4) 低酸素下で膀胱細胞が作成した細胞外マトリックス上では、正常酸素下と比較して癌細胞の運動距離が増加(図3)しており、低酸素下及び正常酸素下での培養膀胱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。間質におけるPLOD2発現は、正常膀胱組織よりも膀胱切除組織で強く、特に癌細胞周囲で高発現であった。培養膀胱細胞のPLOD2 mRNA 発現は、正常線維芽細胞MRC-5 や膀胱細胞株より高く、低酸素培養により増加し、蛋白レベルでも同様であった。

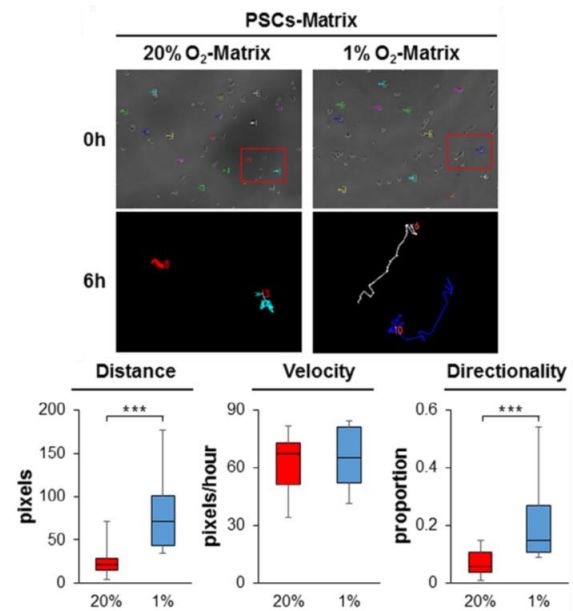


図3：細胞外基質内での膀胱癌細胞の運動軌跡。低酸素環境で膀胱細胞によって産生された細胞外基質での膀胱癌細胞の移動距離が延長した。

RNA 干渉によるPLOD2 抑制膀胱細胞より作成したマトリックスの線維の平行性は低酸素下で減弱し、同マトリックス上では癌細胞の運動軌跡の直線性と直線距離は抑制された(図4)。

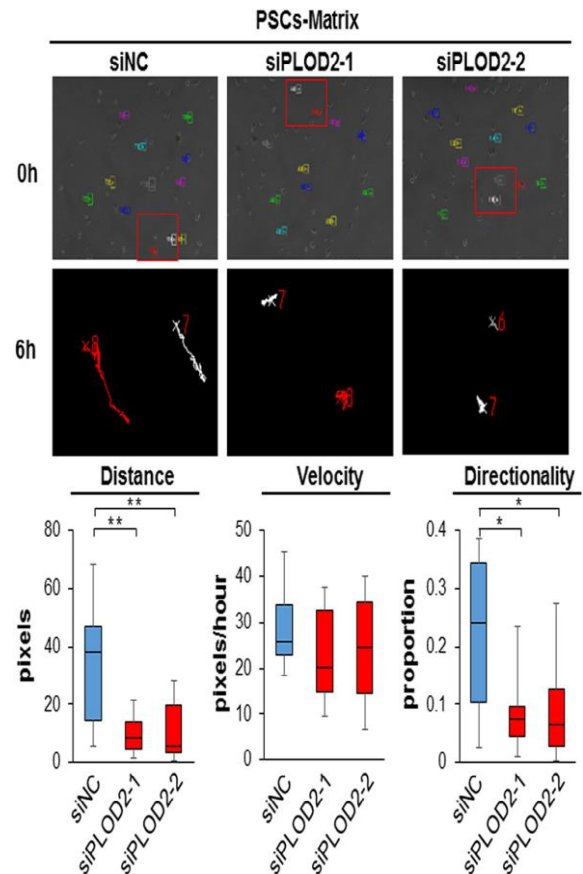


図4: RNA 干渉によるPLOD2 抑制膵星細胞より作成したマトリックスの線維の平行性は低酸素下で減弱し、同マトリックス上では癌細胞の運動軌跡の直線性と直線距離は抑制された。

(5) コラーゲンゲルを用いて、膵癌細胞と膵星細胞の三次元共培養モデルを作成し、膵癌細胞の浸潤・増殖能が、膵星細胞との共培養によって亢進することを見出した。また、浸潤様式を蛍光顕微鏡・共焦点顕微鏡・免疫染色法によって観察すると、膵癌細胞の浸潤に先立って、膵星細胞の浸潤がみられた。膵星細胞の浸潤に伴い、有意にコラーゲン層の厚みが増し、コラーゲン線維方向が細胞の浸潤方向と平行に変化した。膵星細胞は、細胞外基質のリモデリングを行い、コラーゲン線維の配列を変化させることで癌の浸潤を増殖している可能性が示唆された(図5)。

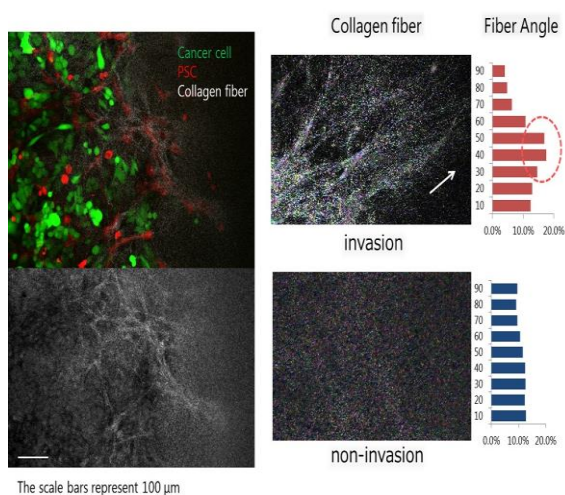


図5: 膵星細胞の浸潤に伴い、コラーゲン線維が変化する。

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 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 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

- ③ Zheng B, Ohuchida K, Chijiwa Y, Zhao M, Mizuuchi Y, Cui L, Horioka K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Tanaka M, CD146 attenuation in cancer-associated fibroblasts promotes pancreatic cancer progression. *Mol Carcinog*, 2016, in press, 査読有, DOI: 10.1002/mc.22409

[学会発表] (計2件)

- ① Horioka K, Suppression of CD51 in Pancreatic Stellate Cells Inhibits Tumor Growth by Reducing Stroma and Altering Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer., American Pancreatic Association 46th Annual Meeting., 2015.11.4., San Diego(America)
- ② Koikawa K, 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., San Diego(America)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 隆晴 (YASUI, Takaharu)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号: 60611283

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし