

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06258

研究課題名（和文）オルガノイドを用いた膵癌phenotypeによる膵星細胞の基質リモデリング解析

研究課題名（英文）Elucidation of the difference in extracellular matrix remodeling ability of pancreatic stellate cells depending on pancreatic cancer phenotype via organoid models

研究代表者

池永 直樹（IKENAGA, Naoki）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90759755

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト膵癌組織から樹立した膵癌オルガノイドのphenotypeを分類し、膵癌phenotypeに応じた活性化膵星細胞による基質リモデリング能の違いおよびそのメカニズムの解明を目的とした。樹立した膵癌オルガノイドは実際の膵癌組織の形態を維持しており、微小環境因子への依存性と組織分化度に基づいたphenotype分類が可能であった。膵癌オルガノイドと膵星細胞を用いた三次元共培養モデルを作製し、膵癌細胞が細胞外マトリックスへ浸潤する様子を観察し、膵星細胞によるMMP2およびMT1-MMPを介した基底膜破壊が寄与していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の予後を規定する癌浸潤メカニズムを解明する上で、従来の細胞株のような単一的なphenotypeではなく、患者個々の膵癌組織から樹立した膵癌オルガノイドを用いることで様々な膵癌phenotypeに応じた浸潤形態を観察可能となった。本研究では、この膵癌オルガノイドと膵星細胞の三次元共培養モデルを作製することで、より生体内を反映した環境での浸潤形態を観察可能となり、膵星細胞のMMP2及びMT1-MMPを介した膵癌基底膜破壊が膵癌細胞浸潤に関わっていることを解明した。今後は、樹立した様々な膵癌phenotypeに応じた浸潤過程の差違を明らかにすることで、膵癌患者の予後改善に寄与し得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study was performed to classify the phenotype of pancreatic cancer organoids derived from human pancreatic tissue and to clarify the difference in the extracellular matrix (ECM) remodeling ability of activated pancreatic stellate cells (PSCs) depending on the phenotypes. The organoids maintained the morphology of the pancreatic tissues, and phenotype classification was possible based on the niche factors dependency and the tumor differentiation. We established a three-dimensional co-culture model using the organoids and PSCs, and observed how the pancreatic cancer cells invade the ECM. These revealed that the basement membrane destruction by PSCs via MMP2 and MT1-MMP. In the future, we challenge to elucidate the differences in ECM remodeling by PSCs depending on each pancreatic cancer phenotype and to develop a personalized treatment that controls cancer cell invasion.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 オルガノイド 膵星細胞 癌周囲微小環境 基質リモデリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

他の消化器癌などにおける飛躍的な治療法の改善とは対照的に、膵癌はここ 30 年ほとんど生存率の改善が見られない取り残された癌腫である。外科的切除が唯一の根治的治療法だが、切除可能である症例は 20% で、たとえ根治切除ができてその 5 年生存率はわずか 15% である。よって膵癌の新規治療法の開発は、社会的要請度・貢献度・緊急性が高い喫緊の課題である。

膵癌は豊富な Desmoplasia を病理学的特徴とし、コラーゲンやプロテオグリカンなどで構成される細胞外基質(Extracellular matrix; ECM)の影響により抗癌剤などの Drug Delivery が不十分となることで癌細胞への治療効果が減少すると考えられている(Michael et al., Pancreas, 2012)。また、癌細胞は間質細胞との相互作用でその悪性度が増す癌間質相互作用が報告され(Bhowmick et al., Nature, 2004)、その中でも膵星細胞(Pancreatic Stellate Cell: PSC)は、種々の液性因子を分泌して膵癌細胞の増殖や浸潤・転移を促進することや(Vonlaufen et al., Cancer Res, 2008)、Desmoplasia を促すことが報告されており(Gastroenterology, 2005)、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。

一方で、近年では 3 次元培養モデルを用いて、膵切除組織より分取した膵細胞からオルガノイドが作成できるようになり(Boj et al., Cell, 2015; 図 1)、より生体に近い環境で培養・観察が行えるようになった。我々のこれまでの研究から、膵癌細胞と PSC の 3 次元共培養モデルでは、PSC が膵癌細胞より先に浸潤していく様子が観察され(図 2)、その際にコラーゲンゲル層を収縮し、線維方向を変化させていることがわかっており(図 3)、癌の浸潤においては PSC が ECM リモデリングを行い、癌細胞が増殖・浸潤しやすい環境を整えていると推測された。また、ECM リモデリングの性質は膵癌細胞株間において異なっていることもわかっており、実際のヒト膵癌組織においても間質量や浸潤様式には個体差があることから、これらは膵癌細胞によって誘導された Activated PSC の ECM リモデリング能の差によるものと推測された。

以上から、3 次元共培養モデルや膵オルガノイドを用いることでより生体内に近い環境で詳細な検討が行え、癌細胞の phenotype によって誘導される PSC と ECM リモデリング能を解析することで癌細胞の phenotype から微小環境の性状に応じた個別化治療が可能となるのではないかと考え本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

ヒト膵癌組織より樹立した膵癌オルガノイドの phenotype を解析し、膵癌 phenotype に応じた活性化膵星細胞による基質リモデリング能の違いおよびそのメカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

ヒト膵癌組織から膵癌オルガノイドおよび PSC の樹立

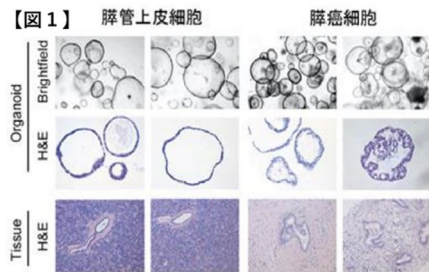
形態学的評価および微小環境因子依存性に基づいた膵癌オルガノイドの phenotype 分類および各 phenotype の RNA 発現解析

膵癌オルガノイドと PSC の 3 次元共培養モデルを用いた膵癌細胞浸潤機序の観察および浸潤に寄与する因子の解析

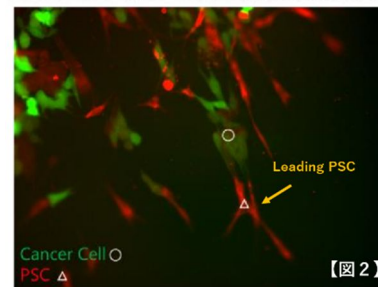
In vitro / in vivo における標的因子抑制による膵癌細胞の浸潤形態の評価

4. 研究成果

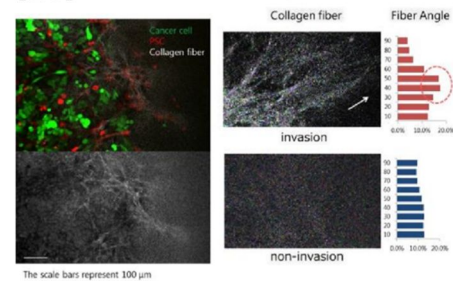
まず、ヒト膵癌組織から膵癌オルガノイドおよび膵星細胞の樹立を行った。計 11 例の膵癌オルガノイドの樹立に成功し、そのうち継代維持が可能であった 8 例の膵癌オルガノイドを用いて実験を行った。それぞれのオルガノイドを H.E 染色を用いて形態学的評価を行うと、低分化型・中分化型・高分化型の 3 つの subtype に分類でき、いずれも実際の膵癌組織の形態を維持していた(図 4)。オルガノイド培養を行う上で微小環境因子の添加を行うが、分化度が高くなるにつれて微小環境因子への依存性が高かった。微小環境因子依存性の高分化型膵癌オルガノイドは血清培地では培養不可であるが、膵星細胞と共培養を行うと微小環境因子のない血清培地でも培養可能であった。したがって、高分化型膵癌細胞は膵星細胞に依存してホメオスタシ



【図 1】 膵管上皮細胞 膵癌細胞



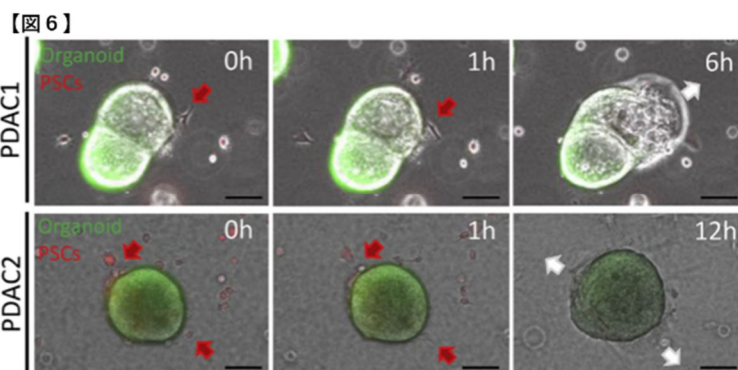
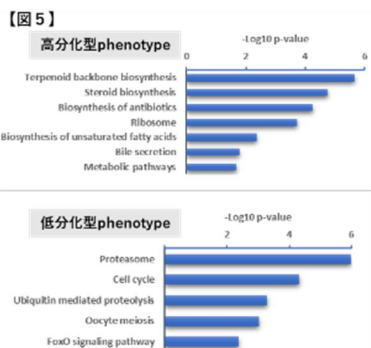
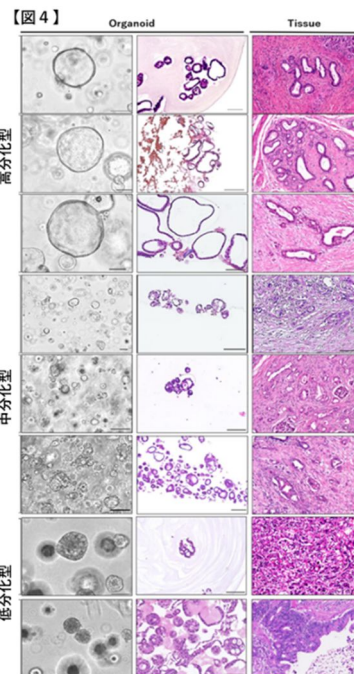
【図 3】 PSC の浸潤に伴い collagen fiber が変化する



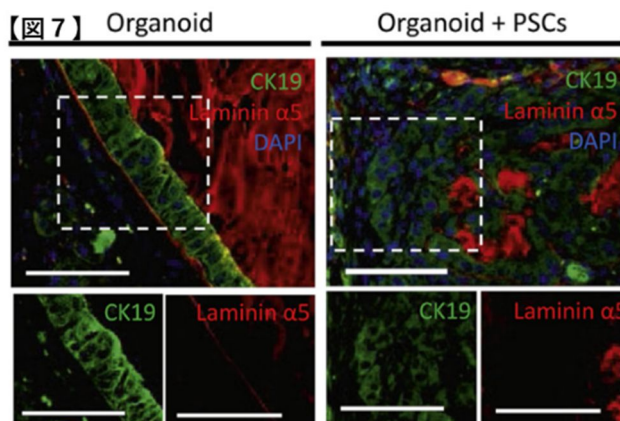
The scale bars represent 100 μm

スを維持していることが示唆された。実際の組織標本においても、高分化型膵癌では低分化型よりも周囲の間質が多い傾向にあり、高分化型 phenotype では膵星細胞との相互作用により癌細胞自身のホメオスタシスを維持している一方で、膵星細胞の基質リモデリングが亢進している可能性が示唆された。これら膵癌オルガノイドをマイクロアレイ発現解析し、phenotype に応じた細胞増殖パスウェイを比較解析した。各遺伝子の発現レベルを基にした主成分分析により、各膵癌オルガノイドのクラスタリングを行うと、微小環境因子への依存性が高い高分化型膵癌 phenotype と微小環境因子への依存性が低い低分化型 phenotype に分類された。各 phenotype の発現プロファイルからパスウェイ解析を行うと、高分化型 phenotype ではメバロン酸代謝を中心とした脂肪酸代謝に関わる遺伝子発現が亢進しており、一方で低分化型ではプロテアソーム代謝に関わる遺伝子発現が亢進していた（図5）。

次に、樹立した膵癌オルガノイドと膵星細胞をコラーゲン1ゲル内で3次元共培養を行い、膵癌細胞が膵星細胞との相互作用を介して浸潤する経過を、タイムラプスイメージングを用いてリアルタイムに観察を行った。すると、膵癌オルガノイドへ膵星細胞が直接接触した直後から膵癌オルガノイドの管腔構造が崩れ、膵癌細胞の浸潤が起こる



様子が観察された。そのため、膵癌細胞の浸潤に膵星細胞による基底膜破壊がかかわっている可能性が推測された。そこで、基底膜破壊に関わる因子としてマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)に着目して解析したところ MMP2, MT1-MMP の発現が膵癌オルガノイドに比べて膵星細胞で mRNA, タンパクレベルにおいていずれも著明に高発現していることがわかった。shRNA も用いた MMP2 あるいは MT1-MMP ノックダウン膵星細胞を作成し、膵癌オルガノイドとの 3D 共培養実験を行ったところ、いずれもノックダウン群で有意にオルガノイドのコラーゲン内浸潤能が低下した。一方で MT1-MMP の活性化に必要な TIMP2 はオルガノイド、膵星細胞の両方で発現しており、共培養時に TIMP2 阻害薬を添加するとオルガノイドのコラーゲン浸潤能は低下したものの、shRNA による膵星細胞の MMP2 あるいは MT1-MMP 発現抑制と組み合わせた場合には浸潤能低下について相加・相乗効果は見られなかった（図6）。また、in vivo において膵癌オルガノイドと膵星細胞の同所移植モデルを作製し、MT1-MMP と MMP2 ノックダウンの効果を検証したところ、ノックダウン群では基底膜破壊が減少し管腔構造が維持されていた（図7）。



今後は、上記のような浸潤形態の差を他の膵癌 phenotype においても検証し、さらには基底膜破壊のみならず、浸潤における膵癌 phenotype ごとの ECM リモデリングの違いについて解析を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okumura T, Ohuchida K, Nakamura M	4. 巻 1882
2. 論文標題 An In Vitro Three-Dimensional Organotypic Model to Analyze Peripancreatic Fat Invasion in Pancreatic Cancer: A Culture System Based on Collagen Gel Embedding	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 135 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8879-2_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koikawa K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Takesue S, Endo S, Abe T, Okumura T, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M	4. 巻 425
2. 論文標題 Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 65 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.03.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koikawa K, Ohuchida K, Takesue S, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Endo S, Abe T, Okumura T, Horioka K, Sada M, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohuchida R, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M.	4. 巻 412
2. 論文標題 Pancreatic stellate cells reorganize matrix components and lead pancreatic cancer invasion via the function of Endo180	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 143 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2017.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 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.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Autophagy is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2017.01.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 岩本千佳、大内田研宙、安藤陽平、新川智彦、大坪慶志輝、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、宮脇恒太、赤司浩一、江藤正俊、中村雅史
2. 発表標題 膵癌微小環境を構築する骨髄由来細胞が膵癌浸潤を先導する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相良亜希子、仲田興平、山下智大、松本奏吉、大坪慶志輝、新川智彦、安藤陽平、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 膵癌微小環境の制御に着目した既存薬剤を用いた膵癌治療の新たな展開
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馮海旻、森山大樹、大内田研宙、巖子龍、武居晋、岐部晋、永井俊太郎、進藤幸治、仲田興平、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 N-Acetyl-Cysteineによる活性化膵星細胞の不活化の検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米永晃子、肥川和寛、大内田研宙、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 膵オルガノイドを用いた浸潤性膵管癌の新たな局所微小浸潤機序の解明
3. 学会等名 第49回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koikawa K, Ohuchida K, Yonenaga A, Sagara A, Ando Y, Kibe S, Takesue S, Nakayama H, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2. 発表標題 Endo180 Expression and Histologic Categorization in Cancer Stroma is an Independent Prognostic Index in Pancreatic Cancer.
3. 学会等名 49th Annual Meeting of the APA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koikawa K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Takesue S, Endo S, Abe T, Okumura T, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M
2. 発表標題 Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 Pancreas 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 肥川和寛、大内田研宙、岐部晋、安藤陽平、武居晋、中山宏道、阿部俊也、遠藤翔、奥村隆志、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 膵オルガノイドによる新たな膵癌局所微小浸潤機序の解明 膵星細胞が誘導する基底膜破壊と間質浸潤
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 肥川和寛、大内田研宙、安藤陽平、岐部晋、中山宏道、武居晋、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 膵癌局所浸潤を先導するleading cell - 膵星細胞がつくる膵癌局所微少環境の機序解明 -
3. 学会等名 第38回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 肥川和寛、大内田研宙、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 膵オルガノイドを用いたリアルタイムイメージングによる新たな膵癌局所微小浸潤機序の解明
3. 学会等名 第72回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第116回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 肥川和寛
2. 発表標題 膵癌浸潤を先導する leading cell 膵星細胞の基質リモデリング機能と浸潤機序の解明
3. 学会等名 第71回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Koikawa K, Ohuchida K, et al
2. 発表標題 Establishment of Pancreatic Organoid from human and murine pancreas tissue.
3. 学会等名 The 20th meeting of the International conference of Pancreatology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Koikawa K, Ohuchida K, Kibe S, Ando Y, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Okumura T, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M.
2. 発表標題 Endo180 regulate phosphorylation of myosin light chain 2 activity and increase the ability of extracellular matrix remodeling in leading pancreatic stellate cells.
3. 学会等名 The 47th Annual meeting of American Pancreatic Association (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大内田研宙、中村雅史	4. 発行年 2016年
2. 出版社 最新医学社	5. 総ページ数 250(76-84)
3. 書名 【膵炎・膵がん】膵がん浸潤・転移における微小環境の病態	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----