

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10700

研究課題名(和文) KPCLマウス用いた免疫細胞誘導性PSC基質リモデリングの解明とその制御

研究課題名(英文) Clarification and control of immune cell-induced PSC substrate remodeling using KPCL mice

研究代表者

鬼丸 学 (ONIMARU, Manabu)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80529876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌組織に豊富な細胞外マトリックスのリモデリングが癌浸潤や転移に関わることに着目し、膵星細胞を中心に基質リモデリングの解析を行った。

膵星細胞と微小環境との関わりとしては、膵星細胞のEndo180の発現と細胞外マトリックスの関係、MMP2分泌やMMP2受容体MT1MMP発現と基底膜浸潤や基質リモデリングの関係、ERK1/2とEMT・オートファジー・癌細胞浸潤の関係を明らかにした。

加えて、脂肪幹細胞由来間質細胞が基質密度や膵癌浸潤にもたらす影響や、リンパ管の単層環状欠陥形成に対し膵癌細胞のS100P発現が及ぼす影響を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は、罹患者数と死亡者数がほぼ同数の極めて難治性の癌で、5年生存率は約7%と極めて予後不良な疾患であり、その診断法や治療法の新規開発は、社会的要請度・緊急性が高い。

本研究においては、細胞外マトリックスの新たなリモデリング機構としての脂肪幹細胞の働きや、膵癌細胞のリンパ管浸潤の機序などにも着目し、解析を重ねた。

それぞれにおいて基質リモデリングや上皮間葉転換などを介する癌細胞浸潤の抑制を誘導しうる有望な治療標的を各種同定するに至ったことは、膵癌治療に対する学術的、社会的要請に応じる結果が得られたといえる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the fact that remodeling of extracellular matrix abundant in pancreatic cancer tissues is involved in cancer invasion and metastasis, we analyzed the substrate remodeling centering on PSC (pancreatic stellate cells).

For the PSC, we have clarified the relationship between Endo180 expression in PSC and extracellular matrix, between MMP2 secretion / MT1MMP expression and basement membrane infiltration / substrate remodeling, and between ERK1 / 2 and EMT, autophagy, and cancer cell infiltration.

In addition, we elucidated the effect of the adipose stem cell-derived stromal cells on substrate density or pancreatic cancer invasion, and the effect of S100P expression in pancreatic cancer cells on the formation of single-layer circular defects in lymphatic vessels.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 膵星細胞 リモデリング 癌微小環境

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は、罹患者数と死亡者数がほぼ同数の極めて難治性の癌で、5年生存率は約7%と極めて予後不良な疾患であり、その診断法や治療法の新規開発は、社会的要請度・緊急性が高い。腫瘍性病変が多種多様な細胞からなる集団であることは当然認識されているが、従来の癌研究は腫瘍細胞を中心として進められてきた。膵癌は豊富な細胞外基質を伴う過剰な desmoplasia を病理学的な特徴とする。近年、間質細胞が産生する液性因子が腫瘍細胞の増殖・浸潤を促進し、細胞外マトリックスは腫瘍細胞の足場となって膵癌の悪性度を増し (Br J Cancer, 2008, Beckermann)、腫瘍細胞のみならず各種間質細胞の様々な細胞間の相互作用が膵癌の治療抵抗性を高めていることが報告された。さらに VEGF 抗体治療など周囲間質細胞との相互作用を標的とした治療はすでにその臨床的効果が証明されている。

膵癌を含め様々な癌の前駆細胞である癌幹細胞の研究が進む一方で、膵癌の特徴である desmoplasia を誘導する間質細胞の起源となる細胞に関する研究は立ち遅れていたが、近年膵星細胞 (Pancreatic Stellate Cells; PSCs) と呼ばれる活性型線維芽細胞がその間質増生を主軸であることが明らかになった (Gastroenterology, 2005, Bachem)。しかし、その星細胞の活性化機序は星細胞と癌細胞だけからなるモデルだけ解明することは困難であり、癌微小環境中に存在する他の間質細胞の相互作用を含めて解析する必要性が認識されてきている。

また、膵癌の手術組織標本を観察すると、癌細胞はもちろんのこと PSC も認めるが、その他多くを占めるのは膵癌の硬さの由来となる細胞外基質である。その多くを構成しているものは整然と敷き詰められたコラーゲンやプロテオグリカンで、膵癌組織では特有の細胞外基質の再配列 (リモデリング) を認めており、このリモデリングをコントロールすることで癌の悪性度を制御できると期待されている (Cell, 2009, Levental)。さらに、癌特有の配列をしめず癌間質細胞外マトリックスが存在する状態では抗癌剤などの Drug Delivery が不十分であるため癌細胞に対する治療効果も減少すると考えられている (Pancreas, 2012, Michael)。

### 2. 研究の目的

本研究では、膵癌における基質リモデリングに関与する PSC の働きを同定し、癌細胞との相互作用やマトリックス生産能を含めた生物学的特徴を明らかにする。特に予後に直接関わる治療抵抗性や遠隔転移などにも焦点を当て、膵癌根治を目的とした新規治療標的や治療法を開発することを最終的な目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず初めに膵癌患者より手術で切除された膵癌組織を免疫染色や特殊染色で基質リモデリング活性が高い領域を同定し、その局所に特異的に存在する間質細胞や発現する分子を中心に検索する。膵癌切除組織からヒト PSC を樹立し、オルガノイドモデルで樹立したヒト膵癌細胞への影響を検討する。さらに、PSC が基質リモデリングを誘導する機序を明らかにし、その機序の制御による基質の質的あるいは量的変化を評価し、本機序の制御による癌の浸潤・転移への影響を検討する。

### 4. 研究成果

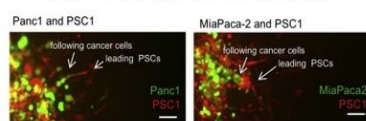
#### 1. 基質リモデリングにおけるコラーゲン線維の配列制御に関わる PSC の役割

膵星細胞に発現する Endo180 によって、細胞外マトリックスに含まれるコラーゲンが PSC に取り込まれ、MMP(matrix metalloproteinase)活性が亢進した PSC が新たに細胞外マトリックスを産生することで基質リモデリングを促進することを示した。

さらに、PSC の基質リモデリングによって、コラーゲン線維配列が浸潤方向へ構築されるとともに、PSC がリーディングセルとして癌細胞の浸潤を誘導することを明らかにした。

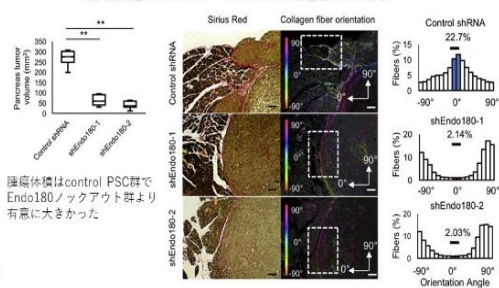
またマウスモデルにおいては、PSC における Endo180 をノックダウンすることで、膵実質浸潤方向へのコラーゲン線維配列を制御し、腫瘍進展を減弱させることを示した。

#### 3Dマトリックスリモデリングアッセイ



膵癌細胞とPSCを3Dコラーゲンマトリックス内で共培養し、単培養と比較し高頻度にコラーゲンマトリックスに侵入すること、PSCに引き続いて癌細胞が侵入することがそれぞれ示された。  
※Panc1, MiaPaca-2; 膵癌細胞株、PSC1; 膵星細胞株

#### in vivo 共移植膵癌モデルにおける Endo180 ノックダウン PSC の働き (膵癌細胞と PSC をヌードマウスの膵尾部に共移植)



膵癌体積は control PSC 群で Endo180 ノックアウト群より有意に大きかった

膵癌前面のコラーゲン線維の角度を解析したところ、共移植モデルの侵襲的前面で大変に変化していること、侵入の方向に沿って線維が平行になっていること、Endo180 ノックアウト群では線維が腫瘍表面に接線方向なことを確認した。

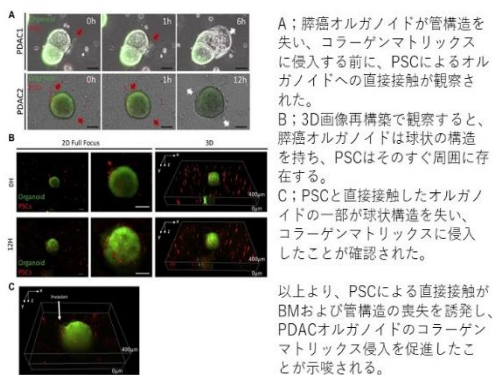
#### 2. 膵癌の基底膜浸潤と PSC の関わりについての解析

膵癌切除組織から樹立した膵癌オルガノイドと PSC とのコラーゲンマトリックス含有三次元培養モデルを構築し、タイムラプス撮影によって基底膜浸潤が引き起こされる動的な構造変化を詳細に観察した。

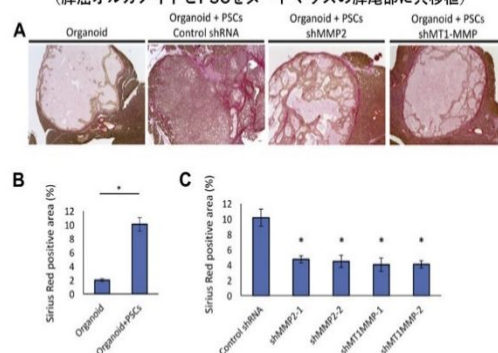
膵癌の基底膜浸潤の誘導には、PSC より分泌される MMP2 や、MT1MMP (Membrane type-1 MMP) を高発現する PSC との直接的なコンタクトが関与することを見出した。

オルガノイド同所移植マウスモデルでは、PSC の MMP2 や MT1MMP のノックダウンによって基底膜浸潤や基質リモデリングが抑制されることを示した。

膵癌細胞オルガノイドとPSCのコラーゲンマトリックス共培養



in vivo共移植膵癌モデルにおけるMMP2・MT1MMPノックアウトの影響 (膵癌オルガノイドとPSCをヌードマウスの膵尾部に共移植)

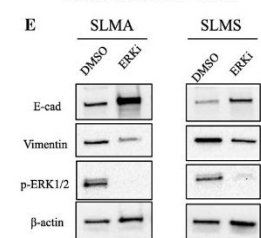


3. PSC の ERK1/2 発現と癌間質相互作用の関係

p-ERK1/2(リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ 1/2)は、癌細胞や正常な PSC と比較して、癌関連 PSC で強く発現を認めることを免疫染色で示した。

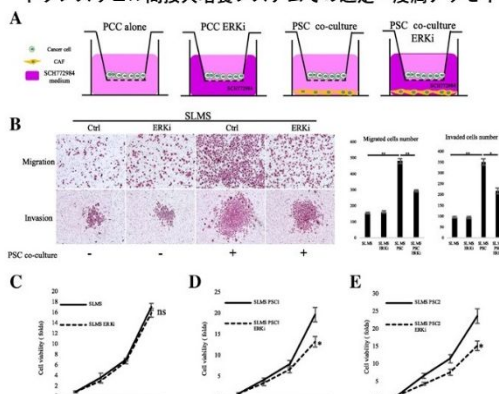
加えて ERK1/2 の抑制は高転移性膵癌細胞の上皮間葉転換を抑制し、細胞老化マーカーを上方向制御し、癌関連 PSC のオートファジーを活性化すること、癌間質の相互作用を抑制し、癌細胞の浸潤性と生存率を高めることを明らかにした。

ERK1/2阻害のEMTへの影響



ERK1/2阻害後の膵癌細胞株においては、上皮細胞マーカー(E-cadherin)のupregulation、および間葉系マーカー(Vimentin)のdownregulationが観察された。  
 ※SLMA / SLMS: 転移性膵癌細胞株

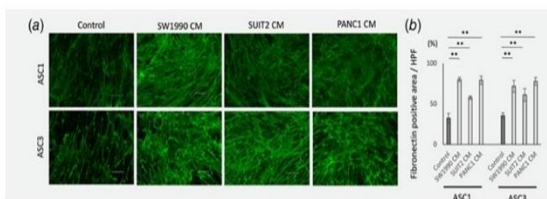
トランスウェル間接共培養システムでの遊走・浸潤アッセイ



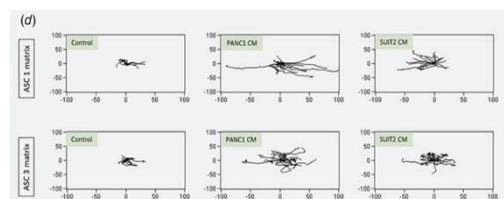
ERK1/2選択的阻害剤SCH772984は膵癌細胞株の遊走・浸潤を抑制した。  
 ※PCC: 膵癌細胞、ERKi: ERK阻害剤、SLMS: 転移性膵癌細胞株

4. 脂肪幹細胞由来間質細胞の基質密度や膵癌浸潤における働き

細胞外マトリックスの新たなリモデリング機構として、脂肪幹細胞由来の間質細胞が膵癌基質の供給源の一つとして関与し、基質の密度が増強されるとともに膵癌浸潤に寄与することを明らかにした。



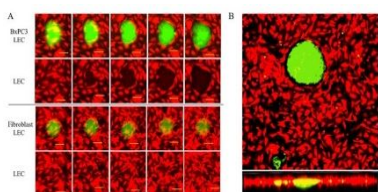
a, b: 脂肪幹細胞由来の間質細胞(ASC; adipose tissue-derived stromal cells)によって生成された細胞外マトリックスは、より密な構造に変化する。



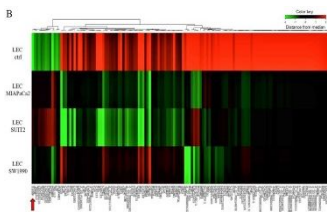
d: 膵癌培養上清で培養されたASCによって生成されたマトリックス上では、PANC-1膵癌細胞株はより移動する。

5. 膵癌細胞がリンパ管に単層環状欠陥形成を引き起こす機序

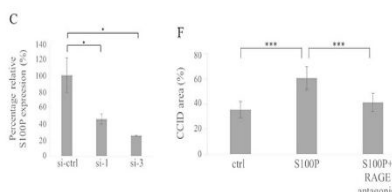
膵癌細胞からのスフェロイドがリンパ管内皮に単層環状欠陥(CCID; circular chemorepellent-induced defects)を引き起こし、培養癌細胞上清はそれを増強することや、培養癌細胞上清でリンパ管内皮細胞を処理するとS100Pが大幅に発現上昇し、S100P拮抗薬を投与するとリンパ管内皮細胞遊走とCCIDが大幅に抑制されることを明らかにした。



BxPC3膵癌細胞株のスフェロイド(緑)がCCIDを形成した。一方、線維芽細胞ではCCIDを誘発できなかった。  
 A: タイムラプス撮影。B: 3D観察  
 ※BxPC3: 膵癌細胞株、LEC: リンパ管内皮、Fibroblast: 線維芽細胞



未処理のリンパ管内皮と、癌細胞の培養上清で処理したリンパ管内皮の遺伝子発現プロファイルを比較した。マイクロアレイ分析ヒートマップ  
 ※緑色の赤矢印がS100P  
 ※MIAPaCa2 / SUI12 / SW1990: 膵癌細胞株



C: S100P mRNAレベルは、siRNAトランスフェクション後に大幅に減少  
 F: 組織ヒトS100Pタンパク質(1nM)およびRAGEアンタゴニストペプチド(1 μg/ml)での処理後のCCID領域

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Yan Z, Ohuchida K, Fei S, Zheng B, Guan W, Feng H, Kibe S, Ando Y, Koikawa K, Abe T, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M	4. 巻 381
2. 論文標題 Inhibition of ERK1/2 in cancer-associated pancreatic stellate cells suppresses cancer-stromal interaction and metastasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Exp Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-019-1226-8	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 Nakayama Hiromichi, Ohuchida Kenoki, Yonenaga Akiko, Sagara Akiko, Ando Yohei, Kibe Shin, Takesue Shin, Abe Toshiya, Endo Sho, Koikawa Kazuhiro, Okumura Takashi, Shido Koji, Miyoshi Kei, Nakata Kohei, Moriyama Taiki, Miyasaka Yoshihiro, Inoue Shigetaka, Ohtsuka Takao, Mizumoto Kazuhiro, Nakamura Masafumi	4. 巻 55
2. 論文標題 S100P regulates the collective invasion of pancreatic cancer cells into the lymphatic endothelial monolayer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 211 ~ 222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4812	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 1
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 Lett	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 Okumura T, Ohuchida K, Kibe S, Iwamoto C, Ando Y, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Koikawa K, Sada M, Horioka K, Mochidome N, Arita M, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M	4. 巻 144
2. 論文標題 Adipose tissue-derived stromal cells are sources of cancer-associated fibroblasts and enhance tumor progression by dense collagen matrix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Cancer	6. 最初と最後の頁 1401-1413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31775	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中山宏道、大内田研宙、安藤陽平、岐部晋、武居晋、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 膵癌リンパ節転移におけるcollective cell invasion 制御因子の検討
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 中山宏道、大内田研宙、相良亜希子、米永晃子、安藤陽平、岐部晋、武居晋、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、藤田逸人、永井俊太郎、岡部安博、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 S100Pが癌細胞塊のリンパ管内皮層へのクリアランスに関与しリンパ節転移に関わる
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 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 Iwamoto C, Ohuchida K, Okumura T, Koikawa K, Takesue S, Nakayama H, Endo S, Kibe S, Ando Y, Shindo K, Nakata K, Miyawaki K, Murata M, Akashi K, Nakamura M, Hashizume M
2. 発表標題 BM-derived cells differentiated into multilineage hematopoietic cells regulate invasion and proliferation of pancreatic cancer
3. 学会等名 Pancreas 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohuchida K, Kibe S, Okumura T, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nakamura M
2. 発表標題 Fat tissue and pancreatic parenchyma play different roles in pancreatic cancer invasion
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、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 膵星細胞が誘導する新たな膵癌局所微小浸潤機序の解明
3. 学会等名 第25回日本消化器関連学会週間 第15回日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	三好 圭  (MIYOSHI Kei)  (70755272)	九州大学・大学病院・助教   (17102)	
研究分担者	寅田 信博  (TORATA Nobuhiro)  (00398075)	九州大学・大学病院・臨床検査技師   (17102)	
研究分担者	大内田 研宙  (OHUCHIDA Kenoki)  (20452708)	九州大学・大学病院・講師   (17102)	