

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22663

研究課題名（和文）膵癌オルガノイドを用いたpartial EMTによるクラスター浸潤機序の解明と制御

研究課題名（英文）Elucidation and control of the mechanism of cluster invasion by partial EMT using pancreatic cancer organoids

研究代表者

中村 雅史（NAKAMURA, Masafumi）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30372741

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト膵癌オルガノイドを用いた共培養モデルを作成し、partial EMTによるクラスター浸潤機序の解明及び制御を目的とした。ヒト膵癌組織から膵癌オルガノイド及び膵星細胞の樹立を行い、独自の三次元共培養モデルを作成することで形態変化および浸潤をリアルタイムで観察した。その結果、分化型膵癌オルガノイドは膵星細胞の有無によってその形態およびEMT関連遺伝子の発現を変化させており、膵星細胞の有無といった外的要因によって影響を受けるpartial EMTの状態であり、一方で外的要因に左右されず恒常的にEMT関連遺伝子の発現が高い低分化型膵癌はcomplete EMTの状態であると考えられた。

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ために、partial EMTによるクラスター浸潤機序に着目して研究を行い、上皮可塑性をもたないcomplete EMTをきたすか、クラスター浸潤するpartial EMTをきたすかといった差は膵癌の分化型に関係していることが示唆された。これは膵癌subtypeごとに異なる浸潤機序を持つことを示したものであり、subtypeごとの制御法を確立し臨床応用することによって、個別化治療を推し進め、今後の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）：The purpose of this study was to elucidate and control the mechanism of cluster invasion by partial EMT. We established pancreatic cancer organoids and pancreatic stellate cell (PSC) from human pancreatic cancer tissues and observed their morphological changes and invasion in real time by creating a unique three-dimensional co-culture model. As a result, the morphology and expression of EMT-related genes of differentiated pancreatic cancer organoids were changed depending on the presence or absence of PSCs. On the other hand, undifferentiated pancreatic cancers with high expression of EMT-related genes were suggested to be in the state of complete EMT.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 オルガノイド partial EMT collective invasion 膵星細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、最も予後不良な癌のひとつであり、予後不良の原因として、早期から浸潤・転移をきたすといった生物学的悪性度の高さがあげられる。癌の浸潤・転移において注目されている model の一つとして上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) がある。かつてより EMT は上皮から間質様へ完全に転換するといった binary process としてされてきたが、最近では二つの要素をあわせ持つ hybrid な phenotype を partial EMT として認識されるようになってきた。こういった partial EMT はさらに 間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition, MET) をきたす上皮可塑性が示されており、そういった phenotype は浸潤・転移において細胞同士が接着したまま集団的に浸潤するクラスター浸潤をきたすと考えられる。また、こういった上皮可塑性は可塑性修飾、つまりはエピジェネティック調節の変化によって可能となる

と考えられ、こういった可塑性修飾は癌周囲微小環境が変化すればその環境に合わせて変化しうると考えられるがその詳細なメカニズムは明らかとなっていない。我々は、かつてより膵癌の浸潤・転移機序を、膵星細胞 (pancreatic stellate cell, PSC) を含めた癌周囲微小環境に注目し研究してきた (図 1)。また、最近では患者個々より膵星細胞の樹立のみならず膵癌オルガノイドモデルの樹立を積極的に行っており (図 2)、ヒト膵癌由来のオルガノイドと PSC の共培養を基とした患者個々の膵癌周囲微小環境の再現を積極的に行っている。すでに、膵癌細胞株と PSC のコラーゲンゲル三次元直接共培養系で、PSC が癌細胞の浸潤を先導する現象を明らかにしており、この確立したコラーゲンゲル三次元共培養系を用いて共焦点レーザー顕微鏡によるタイムラプス観察することで、リアルタイムに EMT (もしくは MET) 変化いわゆる partial EMT を観察し得ると考えられた。このようにして上皮可塑性を可視化し、EMT/MET 前後のエピゲノム解析を行うことで、可塑性修飾に関与する因子を同定することは、膵癌における新たな転移・浸潤機序を解明することにつながり、新たな治療法開発につながるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は『膵癌オルガノイドを用いた partial EMT によるクラスター浸潤機序の解明と制御』である。上皮可塑性を可視化し、EMT/MET 前後のエピゲノム解析を行うことで、可塑性修飾に関与する因子を検索し、またその可塑性修飾にどのような癌周囲微小環境因子が関与しているかを明らかとする。

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 の樹立および 3 次元共培養モデルの作成

膵癌オルガノイドは、コラーゲン分解酵素および GentleMACS (Miltenyi Biotec 社) を用いて切除組織から膵癌細胞を分取し、基底膜マトリックスを用いた 3 次元培養を行って細胞を培養した。培養液に Wnt, Rspodin-1, EGF, TGF inhibitor などのニッチ因子を加えることで、膵癌オルガノイドの樹立を行った。また、outgrowth 法により膵星細胞の樹立も行った。これらを基底膜マトリックスおよび非接着性 U 底 well を用いて 3 次元共培養を行った。

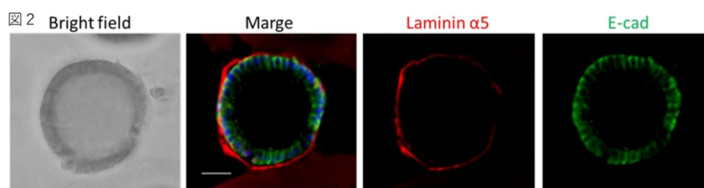
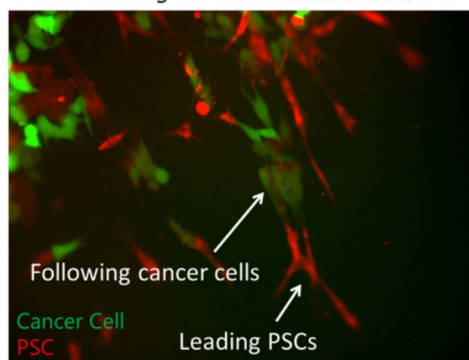
3 次元共培養を用いた、タイムラプスイメージングによる浸潤形態のリアルタイム撮像

膵癌オルガノイドに蛍光タンパクである GFP を、膵星細胞に RFP を transfection し、3 次元共培養モデルをタイムラプスイメージングによってリアルタイムに観察した。その浸潤形態からクラスター浸潤機序を詳細に評価した。

各分化型における膵癌浸潤機序の差違の評価

で確立した 3 次元共培養モデルを用いて、低分化・中分化・高分化それぞれの浸潤形態や CAF の存在有無による EMT 関連遺伝子を含む発現の変化を評価した。

図 1
PSC が leading cell として癌浸潤を先導する



4. 研究成果

はじめに、ヒト膵癌組織を積極的に採取し、同一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。結果として、8 症例の膵癌オルガノイドおよび膵星細胞を樹立できた。これら膵癌オルガノイドおよび膵星細胞を基底膜マトリックスおよび非接着性 U 底 well を用いて遠心後に培養を行うといった独自の方法で 3 次元共培養モデルを作製した。それらをパラフィン固定後に H&E 染色し形態学的評価を行った(図 3)。さらに Vimentin, SMA, CK19 を免疫組織学的染色で評価したところ、実際の膵癌組織の形態学的特徴を保持していることがわかった(図 4)。さらに浸潤形態を観察するために、膵癌オルガノイドに蛍光タンパクである GFP を、膵星細胞に RFP を transfection し、3 次元共培養モデルをタイムラプスイメージングによってリアルタイムに観察した。すると、膵癌細胞同士が接着したまま浸潤するクラスター浸潤の様子が観察・記録された(図 5)。

しかし、浸潤部位が本体から分離し、新たにオルガノイドを形成する様子は観察されなかった。次に、樹立した膵癌オルガノイドおよび膵星細胞 8 サンプルによる共培養モデルをそれぞれ作成し、その形態変化および浸潤能を評価した。8 サンプルのうち、高・中分化型は膵星細胞の有無によってその形態を変化させ、膵星細胞共培養下では腺腔構造を有する分化型を呈するのに対して、膵星細胞非存在下では solid な低分化型を呈した。一方で、低分化型は膵星細胞の有無にかかわらず Solid な低分化型を呈した。また、各分化度の膵癌オルガノイドの網羅的発現解析を行ったところ、低分化型では分化型よりも有意に EMT 関連遺伝子の発現がいずれも増加していた。以上より、分化型膵癌は膵星細胞の有無によって EMT 関連遺伝子の発現を変化させ、一方で低分化型膵癌は膵星細胞の有無に影響されることなく EMT 関連遺伝子の発現が亢進していると考えられた。これは、分化型膵癌は膵星細胞の有無といった外的要因によって影響を受ける partial EMT の状態であり、一方で外的要因に左右されず恒常的に EMT 関連遺伝子の発現が高い低分化型膵癌は complete EMT の状態であると考えられた。また、分化型膵癌オルガノイドでは CDH1 などの細胞接着因子の発現が低分化型よりも高く、一方で低分化型膵癌オルガノイドでは単細胞化によるアノキス耐性を有していたことから、分化型膵癌は partial EMT を介した collective invasion の形態を呈し、低分化型は恒常的に EMT 関連遺伝子の発現が亢進しており、アノキス耐性を有していることから単細胞浸潤を引き起こしていると考えられた。

図 3 3次元共培養モデル

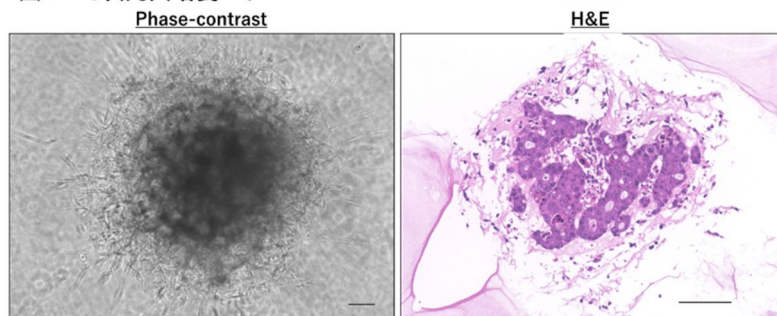
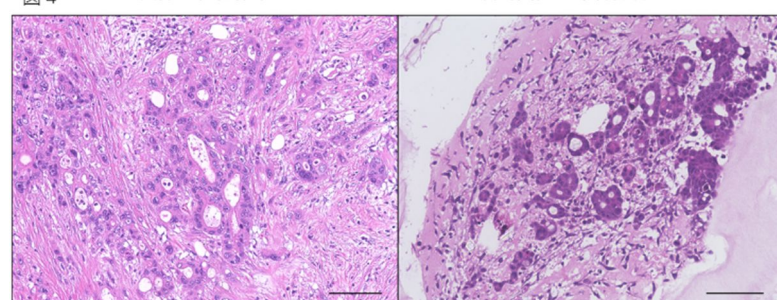
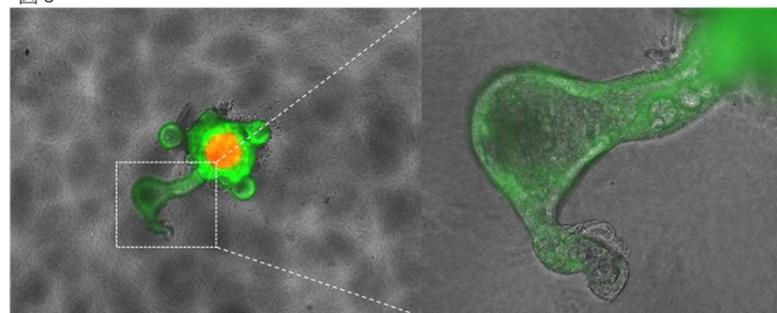


図 4 実際の組織標本



癌周囲微小環境再現モデル

図 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwamoto Chika, Ohuchida Kenoki, Shinkawa Tomohiko, Okuda Sho, Otsubo Yoshiki, Okumura Takashi, Sagara Akiko, Koikawa Kazuhiro, Ando Yohei, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Moriyama Taiki, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Eto Masatoshi, Akashi Koichi, Nakamura Masafumi	4. 巻 512
2. 論文標題 Bone marrow-derived macrophages converted into cancer-associated fibroblast-like cells promote pancreatic cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 15~27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.04.013	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 Feng Haimin, Moriyama Taiki, Ohuchida Kenoki, Sheng Nan, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Shirahane Kengo, Ikenaga Naoki, Nagai Shuntaro, Nakata Kohei, Mizumoto Kazuhiro, Nakamura Masafumi	4. 巻 40
2. 論文標題 N-acetyl cysteine induces quiescent-like pancreatic stellate cells from an active state and attenuates cancer-stroma interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-021-01939-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、中村祥一、持田郁己、久野恭子、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、永井俊太郎、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 膵癌における微小環境因子が腫瘍分化度に与える影響およびその分化度に応じた薬物治療反応性についての検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、中村祥一、久野恭子、奥田翔、大坪慶志輝、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、永井俊太郎、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞が膵癌分化度に与える影響についての検討
3. 学会等名 第57回九州外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinkawa T, Ohuchida K, Iwamoto C, Shindo K, Nakata K, Ohtsuka T, Nakamura M
2. 発表標題 Subtype classification of pancreatic ductal adenocarcinoma based on microenvironmental niche factors dependency and chemotherapy resistance
3. 学会等名 14th World Congress of International Hepeto-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、久野恭子、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、永井俊太郎、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 R-spondin依存膵癌オルガノイド形成に関わる膵星細胞由来微小環境因子の検索
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020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	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	岩本 千佳 (IWAMOTO Chika) (10752842)	九州大学・大学病院・特任助教 (17102)	
研究分担者	藤田 逸人 (FUJITA Hayato) (40611281)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	森山 大樹 (MORIYAMA Taiki) (70586859)	九州大学・大学病院・准教授 (17102)	
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	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関