

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293119

研究課題名(和文) 膵星細胞の立体培養法確立応用による膵がん難治性の要因解明

研究課題名(英文) Investigation of intractability of pancreatic cancer by using 3D culture of pancreatic stellate cells

研究代表者

狩野 光伸 (Mitsunobu, Kano)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80447383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵がんの五年生存率は1割前後であり30年来改善していない。とりわけ進行性膵がんでは、予後は6か月未満と短く、投与薬剤が有効に奏功していないと考えられる。その原因を腫瘍細胞以外の腫瘍組織構築因子に求め、本研究では、ヒト膵癌由来細胞を用いた新規三次元培養系の構築を通じて、薬剤送達経路である1)腫瘍血管と2)腫瘍線維組織に求める仮説の実証を進めた。ヒト患者由来膵星細胞(PSC)を用いた立体培養系を構築し、分子生物学およびナノ薬剤挙動という観点から解析を行った。これにより、PSCを用い、立体培養・立体共培養の方法を再現性良く構築することが可能となり、薬物送達の解析に用いることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The 5-year survival rate of pancreatic cancer is approximately 10% and has not improved for 30 years. Especially in advanced pancreatic cancer, the prognosis is still less than 6 months. The fact suggests that the efficacy of the administered anti-tumor agents are not enough.

In this study, we investigated the role of drug delivery pathway: via 1) tumor blood vessel and 2) tumor fibrous tissue.

For the purpose we constructed a novel three dimensional culture system in this study using cells derived from human pancreatic cancer, especially pancreatic stellate cells (PSC) derived from human patients. We investigated the developed model from the viewpoint of molecular biology and behavior of nanomedicine. As a result, we were able to construct a method of three-dimensional culture / co-culture with reproducibility using PSC, and succeeded in using the model for the analysis of drug delivery.

研究分野：がん研究

キーワード：線維化 膵臓がん 三次元培養 腫瘍微小環境 間質 膵星細胞

### 1. 研究開始当初の背景

膵がんは我が国のがん死亡の原因5位であり、特にその8割以上を占める膵腺癌は難治で悪名高い。膵がんの五年生存率は1割前後であり、この30年来改善がない。比較として大腸がんの五年生存率は約7割である。とりわけ手術不可の進行性膵がんでは、抗腫瘍剤が主な治療法であるが予後は6か月未満と特に短く、投与薬剤が奏功しない症例が多いと考えられる。膵腺癌で抗腫瘍剤の奏功程度が低い原因は、腫瘍細胞そのものの薬剤感受性や抵抗性を含めて様々ありうるが、本研究代表者は薬剤送達経路の腫瘍血管と腫瘍線維組織の関与は臨床薬効の重要な規定因子であるという仮説を提唱し、実証を進めてきた。

このうち要因 腫瘍血管については、ナノ薬剤の挙動と蓄積を指標とした解析という独自のアプローチで実証してきた(若手研究B、厚生労働科学研究費補助金;PNAS 2007、Nat Nanotechnol 2011ほか、Nature Asia Pacific等でハイライト)。すなわち膵腺癌では血管壁細胞(ペリサイト, pericyte, PC)の存在により、一般的に考えられる腫瘍血管の性質とは異なって、漏出性が低い。だがPCをTGF- $\beta$ シグナル阻害で減少させると、直径70nm以上のナノ薬剤の血管外移行が良好となって治療効果が発揮されることなどを既に示した。

他方、要因 腫瘍線維組織も、膵腺癌で特徴的にみられ線維化(desmoplasia)組織の中に血管が埋め込まれた組織構造を呈する。膵腺癌で線維組織は腫瘍量のおよそ80%を占めると報告されるが、その実質的な意義の解明はまだ世界的にも端緒についたところである。申請代表者はこの要因にもナノ薬剤挙動を指標とした解析の導入を、連携研究者松崎により開発された線維芽細胞立体培養法により世界に先駆け着手している(BBRC 2012)。

膵がんの病理学的解析から、以上の二要因のいずれにも深く関与しうる細胞群膵星細胞(PSC)を用いた解析の必要性に代表者は想到した。PSCは1998年に初めて単離培養が成功しそれから解析が始まった細胞種であり、膵癌間質への関与も研究が進行中で不明な点が多い。PSCの解析は我が国においては研究分担者の正宗らが中心に進め、国際的に評価されている(総説 Masamune et al Pancreatology 2013, Erkan et al Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012他)。解析には、単離PSCの平面培養系とヒト病理組織がこれまで主に用いられてきた。その結果、PSCは正常膵臓での静止型から腫瘍や炎症時に活性型に形質転換すること、活性型PSCは $\alpha$ -SMAなど筋線維芽細胞的なマーカーを発現し、線維組織を構成する細胞外基質を大量に生成すること、活性型PSCの刺激には腫瘍細胞や活性型PSC自体によるTGF- $\beta$ の発現増加が重要であること、等が報告されている。これらより、膵がんでの薬剤の腫瘍組織透過

抵抗性について、PSCの立体培養法を確立し応用することによる関与メカニズムの解析が重要である可能性が着想された。

### 2. 研究の目的

膵がんの五年生存率は1割前後であり30年来改善していない。とりわけ手術適応のない進行性膵がんでは、抗腫瘍剤が主な治療法となるが予後は6か月未満と特に短く、すなわち投与薬剤が有効に奏功していないと考えられる。このように抗腫瘍剤の奏功程度が低い原因を、申請代表者はナノ薬剤を用いた研究から、薬剤送達経路である腫瘍血管と腫瘍線維組織に求める仮説を提唱し、実証を進めてきた。近年の研究の結果、PSCは因子1,2ともに関与が考えられるが、申請者の研究視点からPSCの関与を探る研究はこれまでなかった。そこで本研究ではPSCを用いた立体培養系を構築し、分子生物学的解析に加えて系内に加えたナノ薬剤の挙動という申請者独自の視点から解析を行い、PSCの膵癌への関与メカニズム解明とそれに基づいた制御法開発を目指した。

### 3. 研究の方法

ヒト膵がん患者間質組織由来PSCは、分担者・正宗がすでに報告している通りの手順で単離した。初代培養PSCの不死化株の確立も既報通り行った。

積層培養法は、研究期間初期には既報(Nishiguchi A et al. Adv Mater. 2011)通りの手法を用いて行った。次項で述べるように、上記従来積層培養法はやや作業量・時間ともに長く、増殖が盛んでない細胞では十分な収率が得られないこともあったため、研究期間中盤以降は研究代表者が考案した簡便化した新規積層培養技術を確立し、利用した(特許出願済)。

三次元培養化した組織の厚みは、組織のパラフィンブロックを播種面に対して垂直な断面で薄切したサンプルをHE染色すること、ないし固定後の組織を核染色したもののZ-stack画像を共焦点レーザー顕微鏡で取得することを通じて測定した。

三次元培養PSC組織の分子生物学的解析は、組織からRNAを抽出したのちリアルタイムPCR法によりmRNAの発現解析を行い、組織全体ないしその上清からタンパクを回収したのちWestern blotting法によりタンパク質の発現解析を行った。なおタンパク発現の局在は必要に応じて蛍光免疫染色を合わせて実施した。

三次元培養PSCモデルの薬物透過性評価は、積層化したPSCに種々のサイズのFITC標識デキストランないしFITC標識アルブミンタンパク質を負荷し、カルチャインサートの反対側への通過量を蛍光分光光度計で測定することにより定量した。

#### 4. 研究成果

研究分担者・正宗により樹立された初代培養のヒト膵癌間質由来のPSCを用いた立体培養の構築に成功した。PSCの立体培養系で高分子物質の分布解析を通じ、細胞の分泌する線維量と立体透過性が相関することが示唆された(投稿準備中)。膵腫瘍細胞とPSCを混ぜ動物に皮下移植した実験系を作成した。この動物実験系でデキストラン分布が血管外に移行後やはり腫瘍細胞に至らずPSCの分布に阻まれることが示唆された。関連して、BxPC3腫瘍細胞とFGF-2を混合して動物移植すると、FGF-2を混合しない場合に比較し間質コラーゲン量が増加し、薬剤の送達及びアルブミンパクリタキセルによる治療効果が減弱した(発表論文)。in vitro立体培養について共同研究者により樹立された不活化PSCを用いても成功した。

なお、とりわけ初代PSCの立体培養を実施するにあたり、従来の立体細胞培養法では十分な細胞の収率が得られないという問題があったため、より細胞傷害性が低く、かつ操作上簡便な新規三次元培養法を考案・確立し、特許出願した。立体培養PSCの顕微鏡観察の結果、従来法よりも特許出願した新規の簡便培養法でヒト症例と同様の構造が再現されてきていた。

また、新規積層法によりPSCの立体培養を行い、解析に用いていくにあたり、その三次元組織の厚みが、ヒト病理と照合したときに十分であるかどうかの解析を行った。ヒト膵癌で典型的にみられる間質組織の厚みを複数PSCで再現することに成功した(投稿準備中)が、これらの三次元組織の分子生物学的解析では、三次元培養によるPSCの多層化に伴いコラーゲン分泌などがむしろ減少することが再現良く示された。以上のことは、まず膵癌の間質組織を三次元培養法によってモデル化するにあたり、膵がん患者間質組織由来PSCのみを用いるのでは十分に病態を反映しきれない可能性を示していると考えた。

そこで、正常線維芽細胞と腫瘍細胞を混合した、積層共培養モデルを作成すると、線維芽細胞1細胞あたりのコラーゲン産生量が増える(共同報告、発表論文)ことから、積層培養した患者間質組織由来PSCモデル系に他成分を追加することが必要であると考えた。実際、追加で行った初期的な検討では膵がん細胞との共培養系において、三次元培養したときにのみPSCのコラーゲン分泌が増加する場合も存在することがわかった。また、三次元培養時にPSCの腫瘍由来液性因子に対する応答性が平面培養時とは変化する(投稿準備中)ことから、PSCの活性化機序に関して、これまで平面培養系で得られてきた知見が不十分である可能性を意味するよう思われた。

他方で、膵がんにおいて腫瘍血管周囲に存

在する壁細胞に着目した実験モデルを作成し、これら壁細胞が血管構造を安定化することを通じて腫瘍内への薬物の送達を阻害すること(発表論文)さらにBxPC3細胞の動物移植系において、これまで静的な特性と考えられてきた、腫瘍血管高分子物質漏出性の時空間的動的変化が見られることを共同報告した(発表論文)。

#### 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10件)

田中啓祥、狩野光伸。Nanotechnologyを応用したDrug Delivery System. 肝胆膵. 2017;75:805-809. 査読無.

Matsusaki M, Komeda M, Mura S, Tanaka HY, Kano MR, Couvreur P, Akashi M. Desmoplastic Reaction in 3D-Pancreatic Cancer Tissues Suppresses Molecular Permeability. Adv Healthc Mater. 2017;6:1700057. 査読有. DOI: 10.1002/adhm.201700057.

Kamei R, Tanaka HY, Kawano T, Morii C, Tanaka S, Nishihara H, Iwata C, Kano MR. Regulation of endothelial Fas expression as a mechanism of promotion of vascular integrity by mural cells in tumors. Cancer Sci. 2017;108:1080-1088. 査読有. DOI: 10.1111/cas.13216.

Sakai S, Iwata C, Tanaka HY, Cabral H, Morishita Y, Miyazono K, Kano MR. Increased fibrosis and impaired intratumoral accumulation of macromolecules in a murine model of pancreatic cancer co-administered with FGF-2. J Control Release. 2016;230:109-115. 査読有. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.04.007.

Matsumoto Y, Nichols JW, Toh K, Nomoto T, Cabral H, Miura Y, Christie RJ, Yamada N, Ogura T, Kano MR, Matsumura Y, Nishiyama N, Yamasoba T, Bae YH, Kataoka K. Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery. Nat Nanotechnol. 2016;11:533-538. 査読有. DOI: 10.1038/nnano.2015.342.

狩野光伸。疾患難治化の原因病巣の組織構造による薬剤送達不足. Drug Delivery System. 2014;29:447-454. 査読無.

Kano MR. Nano-pathophysiology: a novel integrated approach to disease through application of nanotechnology. Adv Drug Deliv Rev. 2014;74:1. 査読有. DOI: 10.1016/j.addr.2014.07.014

Wu H, Cabral H, Toh K, Mi P, Chen YC, Matsumoto Y, Yamada N, Liu X, Kinoh H,

Miura Y, Kano MR, Nishihara H, Nishiyama N, Kataoka K. Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation. J Control Release. 2014;189:1-10. 査読有. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.06.018.

Ge Z, Chen Q, Osada K, Liu X, Tockary TA, Uchida S, Dirisala A, Ishii T, Nomoto T, Toh K, Matsumoto Y, Oba M, Kano MR, Itaka K, Kataoka K. Targeted gene delivery by polyplex micelles with crowded PEG palisade and cRGD moiety for systemic treatment of pancreatic tumors. Biomaterials. 2014;35:3416-3426. 査読有. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.086.

Kano MR. Nanotechnology and tumor microcirculation. Adv Drug Deliv Rev. 2014;74:2-11. 査読有. DOI: 10.1016/j.addr.2013.08.010.

〔学会発表〕(計13件)

Kano MR, Tanaka HY. Developing experimental models to analyze the behavior of Nano-DDSs within biological systems.第76回日本癌学会学術総会.2017年9月28日.横浜.

Kano MR. Thoughts on meaning of the "academy" activity. Y-KAST - YAJ Bilateral Workshop.2017年03月15日.韓国ソウル.meaning of the "academy" activity. Y-KAST - YAJ Bilateral Workshop.2017年03月15日.韓国ソウル.

狩野光伸.オルガノイドの創薬研究への応用.日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016.2016年11月21日.福岡.

狩野光伸.インフラストラクチャーの重要性.第二回血管生物若手研究会.2016年03月04日.仙台.

Kano MR. Unexpectedness and long-term goals. China-Japan S&T collaboration toward future smart society, China-Japan Interdisciplinary Science and Technology Innovation Salon 2015. 2015年11月25日~2015年11月26日.北京.

狩野光伸.ナノDDSと難治がんの微小環境:ナノ病態生理学.第37回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム.2015年11月20日.熊本.

狩野光伸.ナノメディシン活用の方途を広げる:ナノ病態生理学の可能性.第1回徳島ナノメディシン・シンポジウム.2015年07月29日.徳島.

狩野光伸.ナノ病態生理学:ナノ視点から見た腫瘍血管と間質.第104回日本病理学会総会.2015年04月29日.名古屋.

狩野光伸.ナノ薬剤にのっての腫瘍到達への関門.日本薬学会第135年会.2015年03月27日.神戸.

狩野光伸.ヒトの正常・異常部位における

薬剤の挙動はどのようにモデル化できるか:ナノ薬剤を用いた知見からの考察.安全性評価研究会.2014年09月05日.長野.

狩野光伸.ナノテクノロジーが拓く新しい医生物学.JST-CRDSナノテクノロジー・材料分野俯瞰ワークショップ.2014年08月28日.東京.

狩野光伸.疾患難治化の原因:病巣の組織構造による薬剤送達不足.第30回日本DDS学会.2014年07月31日.東京.

狩野光伸.がんの組織構造理解と製剤技術-違いを橋渡しして難局を克服する試み-.第51回薬剤学懇談会.2014年06月20日.沖縄.

〔図書〕(計1件)

田中啓祥、狩野光伸.技術情報協会.ナノDDSを臨床応用するための疾患モデルの開発.2017.23-28.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:モデル血管システム、シアストレス負荷用のモデル血管部及び循環器系疾患の治療薬のスクリーニング方法

発明者:狩野光伸、松崎愛子、田中啓祥

権利者:狩野光伸、松崎愛子、田中啓祥

種類:特許

番号:特願2017-017692

出願年月日:2017年2月2日

国内外の別:国内

名称:三次元細胞培養物の製造方法

発明者:狩野光伸

権利者:狩野光伸

種類:特許

番号:特願2016-067729

出願年月日:2016年3月30日

国内外の別:国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/ph\\_biomed/](http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/ph_biomed/)

6.研究組織

(1)研究代表者

狩野光伸(Kano, Mitsunobu)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号:80447383

(2)研究分担者

正宗 淳(Masamune, Atsushi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号:90312579