

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10187

研究課題名(和文)膵癌局所浸潤における微小環境構成因子としての脂肪組織についての解析

研究課題名(英文) Role of adipose tissue in pancreatic cancer local invasion as a component of tumor microenvironment

研究代表者

当間 宏樹 (TOMA, Hiroki)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80437780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌自然発生マウスモデルであるKPCマウスに高脂肪食を投与すると、内臓脂肪の増加と共に膵原発腫瘍の増大、遠隔転移の増加が見られた。膵癌細胞の脂肪組織内浸潤を再現した3D培養実験モデルでは膵癌細胞の紡錘状形態変化と、周辺組織の線維化亢進を認めた。膵癌細胞は脂肪細胞培養上清に含まれる遊離脂肪酸の影響によって細胞質内に脂肪滴を蓄積し、遊走・浸潤能の亢進を示した。膵癌細胞との間接共培養によって脂肪細胞は縮小し、上清中に含まれる脂肪酸は増加した。

研究成果の概要(英文)：KPC mice fed a high fat diet had significantly larger visceral fat, primary pancreatic tumors and higher rate of distant organ metastasis than control group. In vitro 3D fat invasion model, pancreatic cancer showed more elongated shape and promoted adjacent tissue fibrosis. Adipose tissue-derived conditioned medium which contains fatty acid enhanced pancreatic cancer cell migration, invasion and increased the numbers of lipid droplets in its cytoplasm. Indirect co-culture of mature adipocytes with cancer cells resulted in adipocyte shrinkage, while elevating the concentration of fatty acids in the medium.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 癌関連線維芽細胞 活性化型膵星細胞 High fat diet 脂肪酸 リノレン酸

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌はこの30年以上ほとんど生存率の改善が見られない癌腫である。膵臓癌による死亡率が年々増加する中、膵臓癌への新たな治療法および診断法の開発は、社会的要請度・貢献度・緊急性が高い。

近年、肥満およびそれに関連したメタボリックシンドロームや2型糖尿病の患者が増加してきており社会的問題となっている。高度肥満は様々な癌種の死亡率と相関することが疫学研究によって報告され、膵癌もその中の一つに含まれるが(Calle, E. 2003. New England Journal.), 肥満によって増加した脂肪組織と膵癌細胞との直接的な相互作用を分子生物学的な観点から解明した報告はない。

一方、乳癌は周囲に豊富な脂肪組織が存在し、癌細胞に近接する脂肪細胞や、脂肪細胞が脱分化した線維芽細胞様の細胞に対して Cancer Associated Adipocyte (CAAs) や Adipocyte derived Fibroblast (ADFs) といった概念が提唱され、これらの細胞集団が従来報告されてきた Cancer Associated Fibroblast (CAFs) と同様に癌細胞の遊走・浸潤能を増強したり、細胞外基質の産生を増加させたりして癌細胞に有利な環境を提供していることが報告されている (B. Dirat. 2011. Cancer Res) (L. Bochet. 2013. Cancer Res)。

また、脂肪組織内には Adipose derived Stromal/Stem cell (ASCs) と呼ばれる細胞集団が脂肪組織内の毛細血管周囲に存在するが、ASCs は invitro で分化誘導を行うと、脂肪細胞や軟骨細胞、骨芽細胞に分化することが知られており、骨髄由来の間葉系幹細胞に類似した多分化能を有する細胞である。ASCs と乳癌細胞との関連性について解析した報告はいくつかあるが、いずれも ASCs は癌細胞の増殖進展に促進的な役割を担うことが報告されている (Y. Zang. 2012. Cancer Res.) (S. Orecchioni. 2013. Cancer Res.)。また、ASCs と癌細胞の関連については前立腺癌や卵巣癌でも報告されている。

ASCs 以外の脂肪組織に由来する間葉系幹細胞として Dedifferentiated fat cells (DFAT) と呼ばれる細胞が存在し、再生医療領域での臨床応用が進められている (T Matsumoto. 2008. Journal of cellular physiology)。DFAT は浮遊系細胞である脂肪細胞をプラスチックの天井に張り付けて培養する”天井培養”という方法によって樹立される細胞である。DFAT と癌との関連について詳細は不明であるが、この細胞の樹立過程が意味することは、脂肪細胞は周囲の環境の変化によって間葉系幹細胞へ脱分化しうる可塑性のある細胞であり、癌組織内においても同様の変化を来し、微小環境の構築を担っている可能性が考えられる。

膵臓は周囲を脂肪に囲まれた臓器であり、膵外への浸潤の際には周囲脂肪組織との相

互作用によって癌細胞の浸潤・転移が増強されている可能性があり、これらの機序を詳細に解明することは膵癌の特徴である高度な局所浸潤の制御に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

膵癌細胞と脂肪組織の相互作用を明らかにし、膵癌の特徴でもある高度な局所浸潤を制御する。

3. 研究の方法

①脂肪組織の増加が膵癌の進行にあたる影響の評価

膵癌自然発生マウスモデル (Pdx1-Cre; LSL-Kras<sup>G12D</sup>; Trp53<sup>R172H/+</sup>; KPC マウス) に、高脂肪食を投与し、肥満によって膵癌の局所浸潤・遠隔転移にどのような影響を来すか病理組織学的に検討する。

②in vitro における 3D 培養モデルを用いた膵周囲脂肪組織浸潤の再現と観察

マウスの内臓脂肪を採取し、type I コラーゲン内で包埋、培養し、上層に癌細胞を播種して膵癌細胞の浸潤形態や周辺脂肪細胞の変化を組織学的に評価する。

③脂肪細胞が膵癌細胞に与える影響の検討

膵癌細胞に脂肪細胞培養上清を添加し、癌細胞の形態学的変化の観察や、創傷治癒アッセイ、トランスウェル遊走アッセイ、マトリゲルを組み合わせた浸潤アッセイ、増殖アッセイなどによる機能解析、ウェスタンブロット法によるタンパク発現変化の解析などを行う。

④膵癌細胞が脂肪細胞に与える影響の検討

マウスの内臓脂肪組織から Adipose derived Stromal/Stem cell (ASCs) や Dedifferentiated fat cells (DFAT) を樹立し、成熟脂肪細胞へと分化誘導して癌細胞と共培養し、その形態学変化やタンパク発現変化について評価する。

4. 研究成果

膵癌自然発生マウスモデルである KPC マウスに高脂肪食である High fat diet を投与すると、コントロール群に比べて High fat diet 群ではマウスの体重、内臓脂肪量は有意に増加し、同時にマウスに発生する膵原発腫瘍の大きさや胃、小腸など周辺臓器への直接浸潤、遠

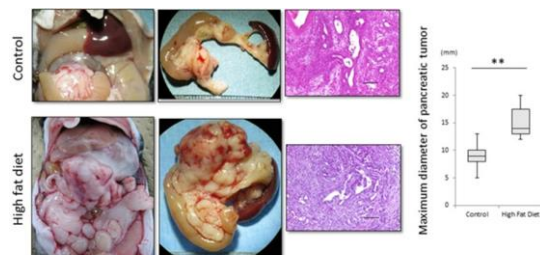


図1. 高脂肪食がKPCマウスの膵原発腫瘍へ与える影響

隔転移の頻度が有意に増加することが分かった(図1)。このことから、内臓脂肪の増加は膵癌の浸潤転移に促進的な作用を及ぼすことが示唆された。

次に、脂肪細胞が膵癌細胞の局所浸潤能や増殖能に及ぼす影響を観察するため、in vitroで膵周囲脂肪組織浸潤を擬似的に再現した3D培養モデルをコラーゲンゲル包埋法によって作成した。マウスから採取した内臓脂肪を細かく切断してコラーゲンゲル内に埋めると少なくとも3週間はその形態が維持されることを確認した。脂肪組織を下層に、膵癌細胞を上層にそれぞれコラーゲンゲル内に埋めて2週間培養を行い、その組織学的な変化を評価したところ、脂肪組織浸潤モデルではコントロール群と比較して、膵癌細胞は紡錘状の形態に変化して散在性に配置し、その増殖能は低下することを同定した(図2)。また脂肪組織浸潤モデルでは、癌細胞周囲の線維化が亢進していた。以上から、膵周囲脂肪組織は膵癌細胞の形態や機能に影響しつつ、線維化を伴いながら、腫瘍促進的な作用を及ぼしていることが明らかになった。

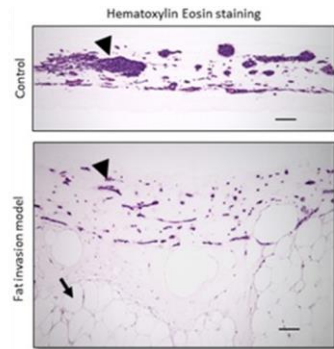


図2. 膵周囲脂肪組織浸潤モデル

脂肪組織浸潤モデルでは、癌細胞周囲の線維化が亢進していた。以上から、膵周囲脂肪組織は膵癌細胞の形態や機能に影響しつつ、線維化を伴いながら、腫瘍促進的な作用を及ぼしていることが明らかになった。

続いて、脂肪細胞培養上清が膵癌細胞にどのような影響を与えるか調べるため、脂肪細胞培養上清添加実験を行った。形態学的評価では、膵癌細胞質に脂肪滴が蓄積されていることが分かり(図3)、機能解析では膵癌細胞の遊走能・浸潤能が亢進していた。増殖能については3D培養モデルと同様に低下していた。さらにタンパク発現変化について評価すると、E-cadherinの発現低下、vimentinの発現上昇が見られ、膵癌細胞に上皮間葉転換(EMT)様の変化が起こっていることが分かった。また、膵癌細胞質における脂肪滴の蓄積はKPCマウスの膵癌組織凍結切片でも観察された

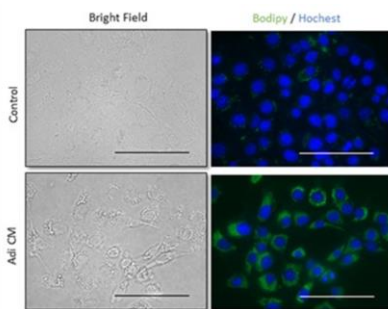


図3. 膵癌細胞への脂肪細胞培養上清添加と脂肪滴染色

された

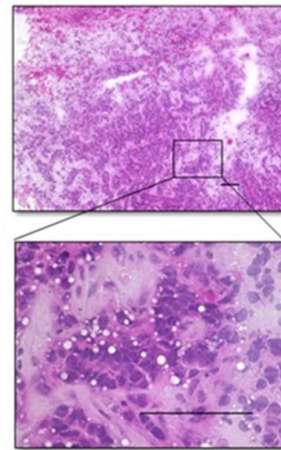


図4. マウス膵癌細胞質内の脂肪滴

(図4)。

脂肪細胞培養上清にはコントロールの培養液に比べて遊離脂肪酸濃度が高く、トータルイオンクロマトグラフィー(TIC)を用いて分析すると、オレイン酸やリノレン酸、パルミトレイン酸などの脂肪酸が多く含まれていることが分かった(図5)。それぞれの脂肪酸を膵癌細胞に添加し、遊走能の変化について評価するといずれの脂肪酸も遊走能を増加させた

が、特にリノレン酸の添加はより強力に癌細胞の遊走能を亢進することが分かった(図6)。

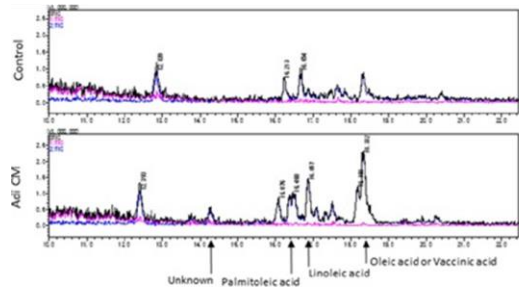


図5. 脂肪培養上清のTIC分析

また、リノレン酸の投与によって膵癌細胞質内の脂肪滴は容量依存的に増加し、それに伴って遊走能、浸潤能も亢進した。しかし、増殖能については影響を与えなかった。また、脂肪酸受容体CD36の阻害剤であるsulfo-N-succinyl oleate(SSO)をリノレン酸と同時に添加すると膵癌細胞質内の脂肪滴の蓄積は抑制され、遊走能の亢進についても抑制された。脂肪細胞培養上清と同時にSSOを添加した場合も同様の抑制効果が見られた。

次に膵癌細胞が脂肪細胞に与える影響について解析するため、マウス内臓脂肪からASCs、DFATを樹立した。樹立したASCs、DFATに脂肪細胞や骨芽細胞への分化誘導実験を行うことで、間葉系細胞への多分化能を有し

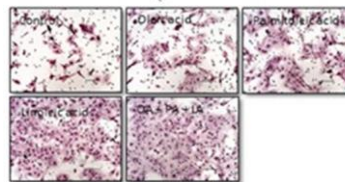
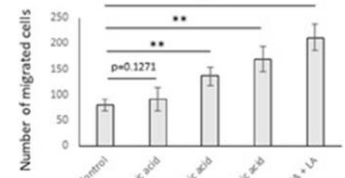


図6. 膵癌細胞への各種脂肪酸添加と遊走能の変化

次に膵癌細胞が脂肪細胞に与える影響について解析するため、マウス内臓脂肪からASCs、DFATを樹立した。樹立したASCs、DFATに脂肪細胞や骨芽細胞への分化誘導実験を行うことで、間葉系細胞への多分化能を有し

次に膵癌細胞が脂肪細胞に与える影響について解析するため、マウス内臓脂肪からASCs、DFATを樹立した。樹立したASCs、DFATに脂肪細胞や骨芽細胞への分化誘導実験を行うことで、間葉系細胞への多分化能を有し



ていることを確認した。同様に樹立した膵星細胞と比較検討すると、膵星細胞は脂肪細胞や骨芽細胞への分化能はみられなかった。ASCsは膵星細胞よりも増殖能は低く、遊走能は高かった。qRT-PCRで細胞外基質関連の遺伝子の発現を評価すると、ASCsは膵星細胞よりもコラーゲンIやフィブロネクチンの産生は低く、TGFβ添加によるASCsの活性化を行うと、コラーゲンIの発現が増加した。樹立したASCs、DFATを用いて分化誘導した成熟脂肪細胞を膵癌細胞と間接共培養すると、コントロールに比べて膵癌細胞共培養群では脂肪細胞のサイズが縮小し、脂肪細胞特異的のマーカであるホルモン感受性リパーゼ(HSL)やペリリピンの発現が低下することがわかった。ヒト膵癌切除標本を用いた病理組織学的検討でも浸潤先端近傍にある脂肪細胞はその他の脂肪細胞に比べて明らかに小さく、癌細胞は脂肪細胞に対して脂肪分解を誘導し、脂肪酸の放出を促している可能性が示唆された

(図7)。以上から膵癌細胞は脂肪細胞に対して脂肪酸の放出を誘導し、放出された脂肪酸、特にリノレン酸などを細胞内に取り込んで腫瘍浸潤や転移の促進に利用している可能性が示唆された。

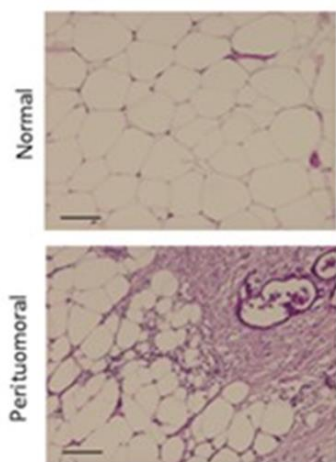


図7. ヒト膵癌切除標本の腫瘍周囲脂肪細胞

#### 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 1 件)

Okumura T, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Koikawa K, Iwamoto C, Miura D, Mizuuchi Y, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells, *Oncotarget*, 8(11):18280-18295, 2017, 査読有, doi:10.18632/oncotarget.15430

[学会発表] (計 4 件)

- ① 奥村隆志、大内田研宙、安藤陽平、岐部晋、武居晋、中山宏道、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、巖子龍、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、膵癌における膵周囲脂肪組織線維化と脂肪組織由来幹細胞の役割、第117回日本外科学会定期学術集会、2017

- ② 奥村隆志、大内田研宙、森山大樹、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、膵周囲脂肪細胞から放出された遊離脂肪酸は膵癌細胞に取り込まれ、遊走・浸潤能を増強する、第71回日本消化器外科学会、2016
- ③ 奥村隆志、大内田研宙、武居晋、中山宏道、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、千々岩芳朗、吉田真樹、鄭彪、佐田政史、堀岡宏平、森山大樹、三好圭、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、膵周囲脂肪組織は肝癌細胞の遊走・浸潤機能を増強し、局所浸潤に関与する、第116回日本外科学会定期学術集会、2016
- ④ 奥村隆志、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、千々岩芳朗、吉田真樹、佐田政史、堀岡宏平、真鍋達也、大塚隆生、高畑俊一、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、田中雅夫、脂肪組織由来幹細胞は膵癌細胞の遊走・浸潤を促進し悪性度に関与する、JDDW2015 第23回消化器関連学会週間、2015

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

当間 宏樹 (TOMA, Hiroki)  
九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80437780

(2)研究分担者

水元 一博 (MIZUMOTO, Kazuhiro)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：90253418

大内田 研宙 (OHUCHIDA, Kenoki)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20452708

(2017年度)

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )