

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19332

研究課題名(和文) 膵癌と周囲脂肪組織のメタボロームを介した相互作用の解明

研究課題名(英文) Crosstalk between Adipocytes and Tumor Cells in Pancreatic Cancer

研究代表者

木村 哲夫 (KIMURA, Tetsuo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：30564489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織は、単に「エネルギーの貯蔵庫」として働くだけでなく、様々な組織と直接的ないしは間接的な相互作用を有することが明らかになってきている。本検討では、膵癌組織と脂肪組織における局所での相互作用について明らかにすることを目的とした。脂肪細胞とヒト膵癌細胞の共培養を行うと、脂肪細胞は線維芽細胞様に形質転換することがわかった。さらにこの形質転換を来した脂肪細胞は、膵癌細胞の遊走・浸潤能を上昇させ、これには膵癌細胞内でのSAA1遺伝子発現の上昇が関与していることが判明した。以上から、膵癌細胞と脂肪細胞の間に癌の転移・浸潤に有利な環境を作り出す相互作用があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer cells come into close contact with adipocytes in the retroperitoneal fat tissue at the tumor invasive front. However, the role of these adipocytes in pancreatic cancer progression remains unclear. We show that adipocytes co-cultivated with human pancreatic cancer cells (panc-1) exhibit an altered phenotype in terms of delipidation, decreased adipocyte markers, and increased expression of fibroblast marker (S100A4). Likewise, human pancreatic cancer cells co-cultivated with these morphologically changed adipocytes, termed as cancer associated adipocyte (CAA), exhibited increased invasive capacity and mobility. Microarray analysis of panc-1 cultivated with conditioned media from CAA showed 78.5-fold overexpression of serum amyloid A1 (SAA1). Our data suggest that SAA1 played a key role in the acquired proinvasive effect in tumor cells. These data indicate that crosstalk between tumor cells and adipocytes contribute to the highly malignant potential of pancreatic cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 脂肪細胞 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

膵癌は強い浸潤傾向を示し、豊富な間質成分を特徴とする腫瘍であり、臨床早期より周囲組織への浸潤と間質繊維化反応 (desmoplastic reaction : DR) を認めることが知られている。また、膵臓は解剖学的に後腹膜脂肪組織に包まれているため、膵癌の進展過程において癌細胞は容易に脂肪組織へ浸潤し、両者の接触が認められる。近年、脂肪組織は単なる「エネルギーの貯蔵庫」として働くだけでなく、様々な組織と直接的ないしは間接的な相互作用を有することが明らかになってきている。がん研究においても、生体内の脂質代謝やアディポサイトカインを介した脂肪組織と腫瘍増殖の関連は数多く報告され、脂肪組織と腫瘍の直接接合による局所での相互作用があることも明らかになってきている。

2. 研究の目的

これまで、膵癌と間質細胞の相互作用の中で癌関連繊維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) や腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage : TAM) を中心になされた研究は多くあるが、腫瘍微小環境を構築する新たな担い手として、脂肪細胞に注目した研究はほとんどない。Dirat らは、癌細胞の存在下で形質転換が起こった脂肪細胞を cancer-associated adipocyte (CAA) と呼び、この CAA が乳癌細胞の浸潤能を促進するという両細胞間のクロストークが存在すると唱えている。また Bochet らは、CAA が FSP-1 (S100A4) を発現する紡錘形細胞に形態を変え、乳癌組織内に遊走し癌間質成分の起源の一つとなっている可能性を示唆した。本研究では、乳癌同様に生体内で脂肪組織との直接接触が起こる膵癌において、脂肪細胞と癌細胞の cell to cell interaction が存在するかどうかを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1)脂肪細胞へ分化誘導させたマウス 3T3-L1 細胞とヒト膵癌細胞の cell culture insert を用いた共培養

マウス 3T3-L1 細胞を differentiation medium (500mM IBMX, 100mM デキサメサゾン, 10mg/ml インスリン添加 DMEM) にて 3 日間培養後、maintenance medium (100mM デキサメサゾン, 10mg/ml インスリン添加 DMEM) でさらに 2 日間培養し、脂肪細胞へ分化誘導させた。1×10⁴ 個の panc-1 細胞を播種した cell culture insert を設置し、上記脂肪細胞と panc-1 細胞株の共培養を行った (8 日間)。

(2)Cancer Associated Adipocyte (CAA) conditioned medium を用いたヒト膵癌細胞株の培養

Panc-1 細胞と 5 日間共培養を行った 3T3-L1 脂肪細胞 (cancer associated adipocyte: CAA) を FBS 非添加培地 (DMEM) で 24 時間培養し、その後培養上清を回収した

(CAA-CM)。CAA-CM を用いてヒト膵癌細胞株を 48 時間培養し、増殖能、遊走能、浸潤能の変化をそれぞれ BrdU assay, invasion assay, scratch assay によって評価した。

(3)CAA-CM による培養で形質転換を来した panc-1 細胞株の cDNA マイクロアレイ解析
CAA-CM で 48 時間培養した panc-1 細胞より mRNA を抽出し、SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8x60K Microarray Kit® (Agilent Technologies) を用いてマイクロアレイ解析を行った。さらに、有意な発現上昇、低下を来したのものについては、リアルタイム PCR 法にて発現量変化の確定および定量化を行った。

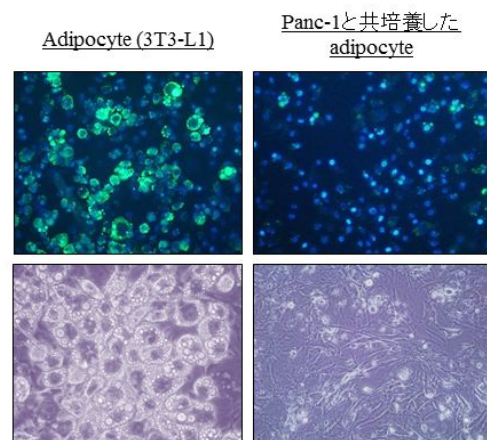
(4)panc-1 形質転換における SAA1 ノックダウンの影響

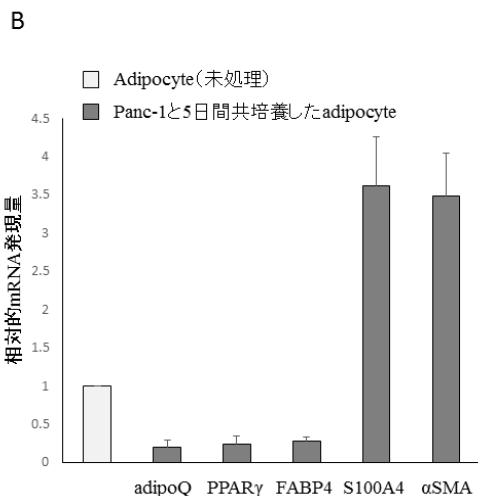
Panc-1 細胞における内因性 SAA1 の増加が、同細胞の浸潤・遊走能に及ぼす影響を検討するために、siRNA カクテルによる SAA1 ノックダウンを行った後、CAA-CM にて 48 時間培養を行い、増殖能、遊走能に与える影響について検討した。

4. 研究成果

(1)脂肪細胞へ分化誘導した 3T3-L1 細胞を、cell culture insert を用い panc-1 細胞と 8 日間共培養を行った。共培養した 3T3-L1 細胞は、未処理の細胞に比べ脂肪滴の減少が減少し、線維芽細胞様の紡錘形細胞へと形態変化を認めた (図 A 上段: 蛍光脂肪染色 [BODIPY: 緑]、核染色 [H33258: 青]、下段: 位相差顕微鏡による観察)。未処理の adipocyte (3T3-L1) と panc-1 と共培養を行った adipocyte の RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法 (比較 Ct 法) にて各 mRNA の発現量を比較した (図 B)。Panc-1 と共培養を行った adipocyte では、未処理 adipocyte に比べ、adipocyte marker (adiponectin, PPAR、FABP4) 減少と、線維芽細胞、筋線維芽細胞 marker (S100A4、SMA) の増加を認めた。つまり、ヒト膵癌細胞株との共培養により脂肪細胞の脱分化ととれる形質転換が確認された。

A





(2) この形質転化を認めた adipocyte (以下 cancer-associated adipocyte: CAA) の conditioned medium (CM) を用いて、ヒト膵癌細胞株 (Panc-1, MIA PaCa-2) を培養したところ、normal medium および adipocyte-CM に比べ、細胞増殖能に変化は認められなかったが、遊走能および浸潤能を有意に上昇させた (遊走能: scratch assay, $p < 0.05$ 、浸潤能: invasion assay $p < 0.01$)。つまり、膵癌細胞が脂肪細胞 CAA への形質転換を起こし、これによって自らの遊走、浸潤に有利な環境を形成するという cell to cell interaction が存在すると考えられた。

(3) CAA-CM により培養を行った panc-1 細胞から mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、CAA-CM を用いて培養を行った panc-1 において 15 倍以上の発現変動があった遺伝子は 10 遺伝子あった。そのうち最も高い発現上昇を示したのものとして、serum amyloid A1 (SAA1) が見出されており (fold change 78.5 倍, $p < 0.001$, vs. control) これが発転移・浸潤能の促進に何らかの関わりがあることが想定された。SAA1 の発現上昇については、リアルタイム PCR により再定量化および確認を行っている。現在、CAA-CM 中のどのような因子 (サイトカイン、ケモカイン、エクソソーム、miRNA、メタボライトなど) が、panc-1 内での SAA1 発現上昇に関わっているのか解析中である。

(4) SAA1 の発現上昇が、CAA と膵癌細胞株の相互作用に直接的な影響を与えているかを検討する目的に、siRNA を用いて panc-1 の SAA1 をノックダウンし、CAA-CM による培養を行ったところ、CAA-CM 培養による panc-1 の遊走能上昇は起こらず、このことから、panc-1 における SAA1 の発現上昇が膵癌細胞と CAA との間に存在する相互作用の key player となっていることが示された。

以上より、膵癌細胞と脂肪細胞の間に癌の転移・浸潤を促進する相互作用があることが明らかとなった。この新たなクロストークの解析により、膵癌の高い転移・浸潤能の病理説明を行う基盤となると考えられる。

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)

木村哲夫、武原正典、高山哲治 膵癌と脂肪組織の相互作用 雑誌「肝胆膵」査読無 75 巻 1 号 in press (ページ数未定) 2017 年

〔学会発表〕(計2件)

武原正典、木村哲夫、高山哲治 膵癌と周囲脂肪組織の相互作用について - Cancer associated adipocyte (CAA)は膵癌の転移・浸潤を促進する - JDDW2016 平成 28 年 11 月 3 日 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)

武原正典、木村哲夫、中川忠彦、谷口達哉、六車直樹、高山哲治 膵癌と周囲脂肪組織の相互作用について - Cancer associated adipocyte (CAA)は膵癌の転移・浸潤を促進する - 第 75 回日本癌学会学術総会 平成 28 年 10 月 8 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 哲夫 (KIMURA, Tetsuo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 30564489

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

武原 正典 (TAKEHARA, Masanori)
徳島大学・病院・医員

高山 哲治 (TAKAYAMA, Tetsuji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授