

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19605

研究課題名(和文)3Dバイオフィンターを用いた膵癌微小環境モデルによる新たな浸潤・転移機序の可視化

研究課題名(英文) Novel method to visualize invasion and metastasis of pancreatic cancer using in vitro microenvironment model constructed by 3D bioprinter

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)：本研究の目的は膵癌細胞を含むスフェロイドを剣山に積層する3Dバイオフィンターを用いて再現した膵癌微小環境を経時的に観察し、膵癌細胞が進展する新たなメカニズムを解明することである。膵癌細胞と癌関連線維芽細胞を混合することで強固なスフェロイドを作成することができ、3Dバイオフィンターでの積層も可能であった。膵癌細胞の分布の変化は観察できたものの、長期間の観察では癌細胞の増殖が優位となり構造体の強度が極端に低下し観察が困難であった。オルガノイドを用いた実験では癌関連線維芽細胞がオルガノイドの基底膜を破壊して癌細胞の浸潤を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在使用しているスフェロイドやオルガノイドモデルでは、固形癌において微小環境中に存在する癌細胞や間質細胞を忠実に再現し、観察することは難しい。この研究では、膵癌細胞と癌関連線維芽細胞を混合することで強固なスフェロイドを作成することができ、3Dバイオフィンターでの積層も可能であった。オルガノイドを用いた実験では癌関連線維芽細胞がオルガノイドの基底膜を破壊して癌細胞の浸潤を促進することを明らかにした。この成果により、従来のモデルでは再現できない癌間質を伴う膵癌微小環境をin vitroで再現し、リアルタイムで観察することにより膵癌の浸潤、転移のメカニズムを明らかにする一助となりうると考えられる。

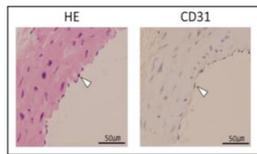
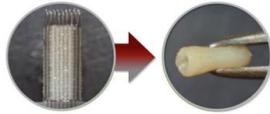
研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to reveal the underlying mechanisms in which pancreatic cancer progress using spheroid-based 3D structure imitating the tumor microenvironment and made by 3D bioprinter. Spheroids containing both cancer cells and cancer-associated fibroblast were hard enough to manipulate with the 3D bioprinter in order to construct 3D structures. Although confocal microscopy revealed the changes in the cellular distribution in the 3D structures, they lost their physical strength as the cancer cells proliferate over cancer-associated fibroblasts. Experiments using organoid revealed that cancer-associated fibroblasts promote the invasion of cancer cells through destruction of the basement membrane.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 3Dバイオフィンター オルガノイド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

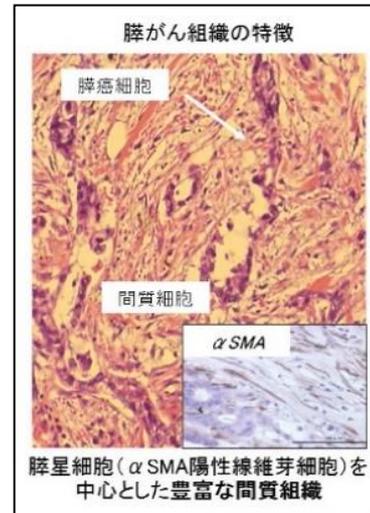


血管様の構造体の組織像

細胞の性質は培養条件に大きな影響を受けるため、近年癌の研究においてより生体内に近い環境を作り出す目的で癌細胞集塊をゲル内で培養するスフェロイドやゲル内で腺管構造を構築させるオルガノイドが使用されるようになりつつあるが、これらの3次元培養においても細胞外基質は人工的なものである。膵癌組織内の細胞はその7-9割は癌関連線維芽細胞が占めており、その他に膵癌細胞を始め血管内皮細胞、免疫細胞等種々の細胞で構成されている。その点においてオルガノイドやスフェロイドの構造は生体内とは大きく異なる。

固形癌における浸潤機序を真に理解するためには、微小環境中に存在する癌細胞や間質細胞の動態を解析する技術が必須である。現在、膵癌細胞の浸潤形態に微小環境中の癌関連線維芽細胞による基質リモデリングの関与や癌細胞のcollective invasionといったEMTに依存しない形態などが実際の生体内の腫瘍環境においては重要である

として注目されてきている。しかしながら、現在使用しているスフェロイドやオルガノイドモデルでは、固形癌においては微小環境中に存在する癌細胞や間質細胞を忠実に再現し、観察することは難しく、依然として不明な点が多い。

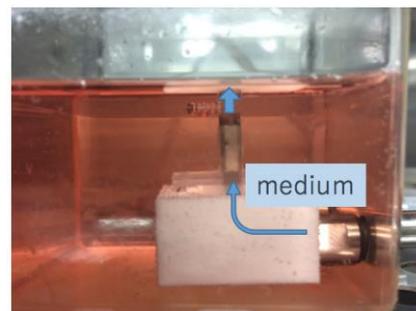


2. 研究の目的

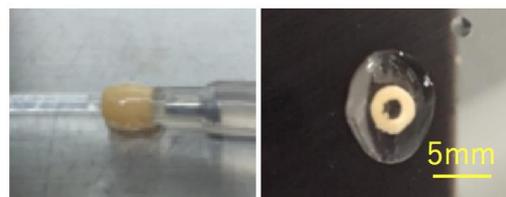
本研究の目的は3Dバイオプリンターを用いて、オルガノイドやスフェロイド等のモデルでは再現できない癌間質を伴う膵癌微小環境をin vitroで再現し、リアルタイムで観察することにより膵癌の浸潤、転移のメカニズムを明らかにすることである。そのために、まず膵癌細胞、癌関連線維芽細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞で構成されるスフェロイドで構造体を作成することで膵癌組織に近い環境を再現すること膵癌細胞が接合した構造体に浸潤する様子を観察することを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では主に再生医療の分野において既に軟骨、血管、心筋、肝臓等の組織を作成する研究で用いられている3Dバイオプリンター、Regenovaを使用した。Regenovaは予め設定したプログラムの通りにスフェロイドを剣山上に配置する3Dバイオプリンターである。剣山上に配置された構造体の内部まで栄養、酸素を効率的に送達するために循環培養を行う。表面積を確保するために構造体は円筒形のデザインとした。一定期間循環培養を行うことでスフェロイド同士が癒合し、連続した構造体を形成することができる。また、スフェロイド中に存在する細胞種毎に蛍光で標識することにより、共焦点顕微鏡を用いることで細胞の空間的配置の変化を観察することができる。また、ヒト膵癌細胞には膵癌細胞株であるSUIT2を使用し、癌関連線維芽細胞はヒト膵癌切除組織を細断し、ディッシュ上で培養するoutgrowth法を用いて樹立した。



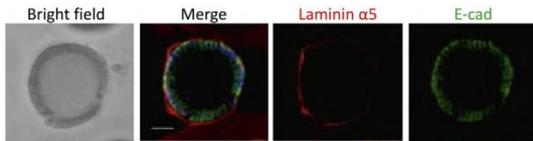
循環培養装置



Regenovaで作成した血管様の構造体

SUIT2にはレンチウイルスを用いてGFP(緑色)を導入した。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、癌関連線維芽細胞には用途に応じてCell tracker(赤色)を用いて染色を行った。膵癌細胞と癌関連線維芽細胞、HUVECを種々の割合で混合して作成したスフェロイドをRegenovaで積層し3Dの構造体を作成した。また、ヒト膵癌切除組織を分散しゲル内で培養することにより基底膜を有する膵癌由来のオルガノイドを作成した。

得られたオルガノイド（下図）を用いて癌関連線維芽細胞が膵癌細胞の浸潤に与える影響を観察した。



4. 研究成果

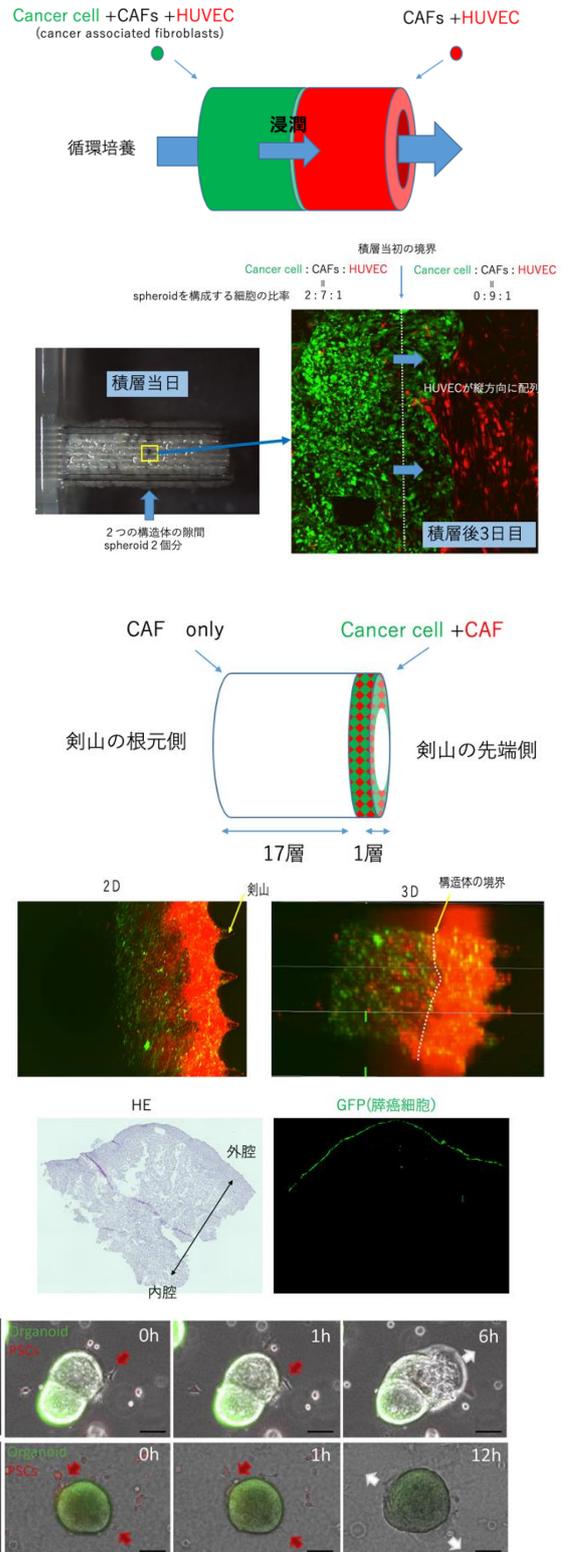
まず、Regenova でハンドリング可能な膵癌細胞のスフェロイドの作成を試みた。癌細胞単独ではほとんどの膵癌細胞株ではハンドリングに耐えうる強度を持ったスフェロイドは作成することができなかった。そこで膵癌組織の大半を占める癌関連線維芽細胞と癌細胞を種々の割合で混合してスフェロイドを作成すると、癌細胞 90% + 癌関連線維芽細胞 10% の割合でも強固なスフェロイドを作成することができた。膵癌組織内の細胞構成を再現するために上述のスフェロイドを構成するヒト膵癌細胞 (SUIT2) に GFP (緑色) を導入し、HUVEC に cell tracker (赤色) で染色を行い、ヒト膵癌切除組織から outgrowth 法で樹立した癌関連線維芽細胞と混合したスフェロイドを作成した。膵癌細胞を含まないスフェロイドも同時に作成し、剣山上に円筒形の構造体を積層し、それぞれのスフェロイドのみで構成される円筒形の構造体同士が接合するようにデザインした。この構造体を循環培養し共焦点顕微鏡で観察すると、GFP で標識した膵癌細胞が徐々に膵癌細胞を含まない構造体に移動していく様子が観察された。

次に、癌関連線維芽細胞が膵癌細胞の浸潤に与える影響を観察するために未標識の癌関連線維芽細胞のみで作成した構造体に GFP で標識した膵癌細胞と cell tracker で赤色に染色した癌関連線維芽細胞を混合して作成した構造体を接合し、癌細胞と癌関連線維芽細胞の経時的变化を観察した。膵癌細胞、癌関連線維芽細胞とも癌関連線維芽細胞のみで作成した構造体の方向に移動する様子が確認できた。浸潤速度は膵癌細胞の方が早い傾向があった。しかし、膵癌細胞浸潤部の構造体の断面を観察すると膵癌細胞は構造体の表面を這うように移動し、構造体の内部には浸潤していないことが判明した。培養条件や細胞組成を変更し実験を行ったが、癌細胞が構造体の内部に浸潤する様子は観察できなかった。オルガノイドを用いた実験では膵癌細胞のオルガノイドを癌関連線維芽細胞と共培養すると癌関連線維芽細胞がオルガノイドの基底膜を破壊し、癌細胞の周囲への浸潤をサポートする現象を観察することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Yan Z, [Ohuchida K](#), Zheng B, Okumura T, Takesue S, Nakayama H, Iwamoto C, Shindo K, [Moriyama T](#), Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, [Nakamura M](#), CD110 promotes pancreatic cancer progression and its expression is correlated with poor prognosis, *J Cancer Res Clin Oncol*, 145(5):1147-1164, 2019, 査読有、DOI: 10.1007/s00432-019-02860-z



- ② 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, Adipose tissue-derived stromal cells are sources of cancer-associated fibroblasts and enhance tumor progression by dense collagen matrix, *Int J Cancer*, 144(6), 1401-1413, 2018, 査読有、DOI: 10.1002/ijc.31775
- ③ 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, Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Letters*, 1(425), 65-77, 2018, 査読有、DOI:10.1016/j.canlet.2018.03.031
- ④ Koikawa K, Ohuchida K, Takesue S, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Endo S, Abe T, Okumura T, Horioka H, Sada M, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohuchida R, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Pancreatic stellate cells reorganize matrix components and lead pancreatic cancer invasion via the function of Endo180, *Cancer Letters*, 1(412), 143-15, 2018, 査読有、DOI:10.1016/j.canlet.2017.10.0104

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ohuchida K, Kibe S, Okumura T, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nakamura M, Fat tissue and pancreatic parenchyma play different roles in pancreatic cancer invasion, *Pancreas* 2018, 2018 年
- ② 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, Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Pancreas* 2018, 2018 年

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

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

○取得状況 (計 件)

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

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：前山 良

ローマ字氏名：(MAEYAMA, ryo)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：共同研究員

研究者番号（8桁）：10611668

研究分担者氏名：江上 拓哉

ローマ字氏名：(EGAMI, takuya)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：共同研究員

研究者番号（8桁）：40507787

研究分担者氏名：中山 功一

ローマ字氏名：(NAKAYAMA, koichi)

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50420609

研究分担者氏名：森山 大樹

ローマ字氏名：(MORIYAMA, taiki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70586859

研究分担者氏名：当間 宏樹

ローマ字氏名：(TOMA, hiroki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：共同研究員

研究者番号（8桁）：80437780

研究分担者氏名：大内田 研宙

ローマ字氏名：(OHUCHIDA, kenoki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：20452708

（2018年）

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。