

令和元年6月5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：17K19607

研究課題名(和文) 膵癌クラスター浸潤を導くPSCの機序解明と微小環境基質変化による制御

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of PSC leading to pancreatic cancer cluster invasion and pancreatic cancer control by microenvironmental substrate remodeling

研究代表者

池永 直樹 (IKENAGA, Naoki)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90759755

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)：三次元共培養モデルにおいて膵癌細胞と膵星細胞との共培養群で浸潤細胞数は有意に増加し、癌細胞浸潤を先導する形式での膵星細胞浸潤がみられ、コラーゲン・ゲルの線維方向が細胞の浸潤方向に沿って変化した。さらに、それらがEndo180によって抑制されることも見出した。また、ヒト膵癌組織検体から実際の器官に類似した組織体であるヒト膵癌由来オルガノイドを樹立した。オルガノイドを膵星細胞と共培養すると、オルガノイドは膵星細胞の直接接触が誘因となり管状構造・基底膜構造を失い、周囲への浸潤が亢進した。さらに、膵星細胞でのMMP2またはMT1MMPのノックダウンで、膵星細胞による基底膜破壊が有意に減弱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞は様々な形態で浸潤・転移を行う。本研究では、クラスター浸潤を導くPSCが形成する浸潤微小環境を改変することで癌の進展制御を目指した。その結果、Endo180ノックダウンPSCは、インビボで共移植された膵臓癌モデルにおける腫瘍増殖および局所浸潤を減少させる、またヒト膵癌由来オルガノイドを樹立し、PSCの直接接触でオルガノイドの基底膜が破壊されることを見出した。この研究は、今までの膵癌の浸潤・転移に関する研究とは全く異なるアプローチによる研究であり、予後改善が進まない膵癌治療を進展させる一助となりうる可能性があり、学術的意義、社会的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Using three-dimensional matrix remodeling assay, we found that pancreatic stellate cells (PSCs) frequently invaded the collagen matrix with pancreatic cancer cells (PCCs), which invaded behind the invading PSCs. Invading PSCs changed the alignment of collagen fibers, resulting in ECM remodeling and an increase in the parallel fibers along the direction of invading PSCs. In addition, Endo180 knockdown in PSCs attenuated the invasive abilities of PSCs and co-cultured PCCs. Next, we established human PDAC organoids from resected PDAC specimens. When the organoids were co-cultured with PSCs, organoids lost their BM and ductal structures by PSCs direct contact and invaded collagen matrix more frequently. Matrix metalloproteinase 2 or membrane type-1 MMP knockdown in PSCs significantly attenuated BM destruction by PSC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 膵星細胞 leading cells クラスター浸潤 微小環境基質変化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はかねてから膵癌の進展における膵星細胞(Pancreatic stellate cells: PSC)の役割について研究を行ってきた。これまでに放射線により線維芽細胞が癌間質相互作用を増強して膵癌の浸潤を促進することや、CD10 陽性膵星細胞集団が膵癌の進展を促進することなど、膵癌細胞と PSC の heterogeneity に注目した細胞間ネットワークについて報告を行ってきた。また、膵癌原発巣の desmoplasia を対象とした間質標的治療の有効性も報告してきた。同時に癌の浸潤・転移における癌細胞および間質の形態変化についても解析を進めており、これまでの研究から、膵癌細胞と PSC の 3 次元共培養モデルでは、PSC が膵癌細胞より先に浸潤していく様子が観察され、その際にコラーゲン線維を浸潤方向へと変化させていることがわかっている。このことから、癌の浸潤においては、PSC が細胞外基質(Extracellular Matrix: ECM)のリモデリングを行い、癌細胞が増殖・浸潤しやすい環境を整えていることが示唆される。また転移を想定した浮遊培養条件下では、膵癌細胞は PSC との共培養でクラスター形成が促進されることが確認されている。これらの研究成果と最近の preliminary な研究経過から、PSC は間質浸潤および転移においても重要な役割を担っており、leading cell として間質浸潤を先導した後、癌細胞と共に血液中へ入りクラスターを形成し、circulating tumor cells(CTCs)となって肝転移など遠隔転移を促進している可能性を考え、本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

癌細胞は様々な形態で浸潤・転移を行い、その形態は浸潤・転移能や治療抵抗性との関連が報告されている。中でも複数の細胞が集塊となったクラスターの状態では、転移能が促進されるとの報告があるが、未だ不明な点が多い。一方、我々の研究ではこれまでに膵星細胞(Pancreatic stellate cells: PSC)が基質リモデリングにより浸潤微小環境を形成し、膵癌浸潤を先導することを見出しており、PSC による持続的な基質リモデリングが浸潤・転移において重要であると考えている。本研究では、膵癌クラスター浸潤・転移を導く膵星細胞を同定し、そのメカニズムを解明する。我々は preliminary な解析でクラスター浸潤においても、膵星細胞が浸潤・転移に適した浸潤微小環境を形成している知見を得ており、クラスター浸潤を導く膵星細胞が形成する浸潤微小環境を改変することで癌の進展制御を目指すという、これまでにない新たな方法での膵癌治療の開発につなげる。

3. 研究の方法

まず、膵癌細胞株やヒト膵癌切除組織から樹立した膵癌細胞を用い、クラスター状態での癌細胞の浸潤能について解析する。クラスター形成能を持つ膵癌細胞と膵星細胞との 3 次元共培養によって、クラスター浸潤を導く膵星細胞を同定する。さらに、クラスター浸潤を導く PSC との 3 次元共培養で得られる ECM の質的・量的特徴の変化と浸潤・転移能との関連について検討する。以上の結果によって得られた検討を元に、膵癌クラスター・PSC をヌードマウスに共移植し、癌の増殖、浸潤、誘導される間質の特徴について *in vivo* で評価する。また、原発巣だけでなく、転移巣、播種巣についても検討を行う。

膵癌クラスター浸潤を導く PSC によって誘導される間質の特徴に応じ、同定された関連分子の inhibitor や siRNA/shRNA 導入による抑制実験を行う。膵癌クラスターと PSC の *in vivo* 共移植モデルを用いて、ECM リモデリング関わる分子を標的とした治療実験を行い、新規分子標的治療薬を開発する。同時に誘導される癌微小環境に応じた治療薬の選択を可能にし、個別化治療についても検討を行う。同時に膵癌 FFPE サンプルを対象に間質の質的特性に関連する分子の発現と臨床病理学的因子の相関を調べる。

4. 研究成果

(1) PSC は、膵癌細胞の局所浸潤を導き、促進する。

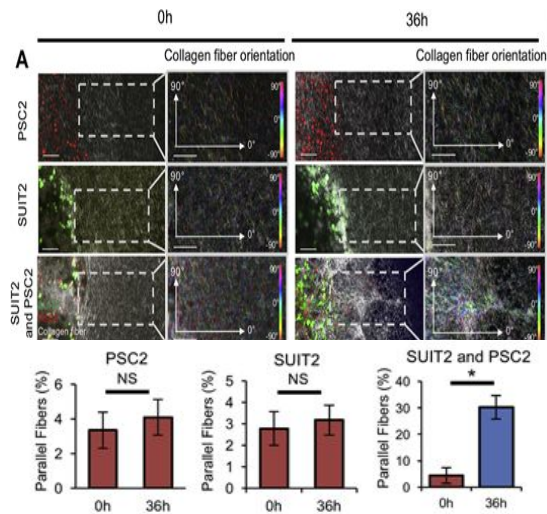
まず、クラスター浸潤を導く leading cells を同定するために、コラーゲン・ゲルを用いた三次元共培養モデルを作成した。膵癌細胞と膵星細胞を三次元培養したところ、単独群と比較して膵癌細胞と PSC を共培養した群において浸潤細胞数は有意に増加し、癌細胞の浸潤を先導する形式での膵星細胞浸潤がみられた。次に、H&E で染色されたコラーゲンマトリックスのパラフィン切片を用いて測定した浸潤細胞の数および最大浸潤距離は、単培養モデルと比較して共培養モデルで有意に増加した。



図: コラーゲンマトリックス中の共培養 24 時間後にコラーゲンマトリックスに侵入した膵癌細胞: Panc1 細胞 (緑色) および PSC1 細胞 (赤色) の代表的な蛍光顕微鏡画像。

(2) PSC は、ECM を物理的にリモデリングすることにより、PCC の局所浸潤を導く。

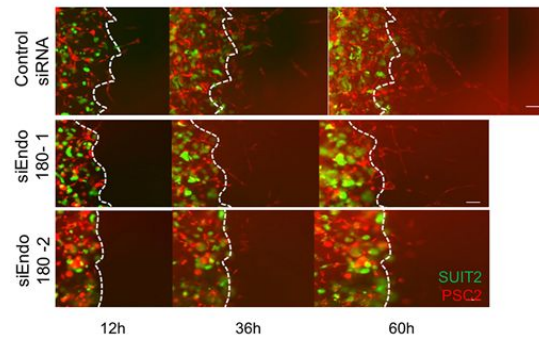
共焦点顕微鏡法を用いてコラーゲンマトリックスの変化を観察した。膵癌細胞：SUIT2とPSC2の共培養36時間後の3Dマトリックスリモデリングアッセイでは、浸潤しているPSC2の周囲で反射率が増加した。次に、コラーゲン繊維の角度を測定したところ、SUIT2とPSC2を共培養した36時間後に、浸潤するPSC2の方向に沿った平行繊維が有意に増加することが見出された。対照的に、SUIT2またはPSC2がコラーゲンマトリックス中で単培養された場合、細胞はコラーゲンマトリックスにわずかに侵入し、コラーゲンファイバーの角度はほとんど変化しなかった。これらの結果は、浸潤PSCが、コラーゲン繊維配列の変化を伴うコラーゲンマトリックスを物理的改変することによって、膵癌細胞の局所浸潤をもたらすことを示唆している。



図：SUIT2（緑）とPSC2の0時間・36時間後の共焦点顕微鏡法によるコラーゲン繊維画像（左パネル）ImageJソフトウェアにより作成したコラーゲン繊維配列（右パネル）。繊維角度の比較（下パネル）

(3) PSCにおけるEndo180ノックダウンは、先導する膵癌細胞およびPSCと共培養した癌細胞の浸潤能を低下させる。

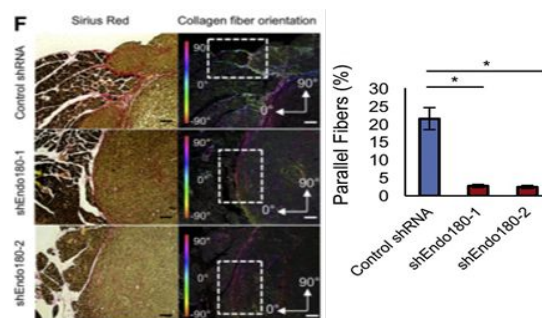
Endo180は、ECMリモデリング因子であり、コラーゲン結合および内在化受容体である。さらに、Endo180は、PCCよりもPSCでより高度に発現される。TCGAデータベースより膵腺癌患者におけるEndo180高発現と全生存率とに有意な相関があることが示された。そのため、PSCにおけるEndo180ノックダウンの影響を調べた。PSCのEndo180をノックダウンで、PSCの浸潤能が低下することが明らかになった。さらに、PSCのEndo180をノックダウンした場合、浸潤細胞数の有意な減少を示した。



(4) Endo180ノックダウンPSCは、インビボで共移植された膵臓癌モデルにおける腫瘍増殖および局所浸潤を減少させる。

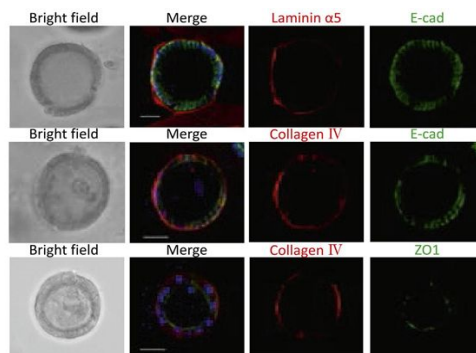
マウスモデルにおいては、膵星細胞に発現しそのコラーゲン取り込みに関与するEndo180をノックダウンすることで、浸潤方向のコラーゲン線維配列が抑えられ、腫瘍進展が抑制されることを示した。

右図：control shRNAとshEndo180群との腫瘍前面におけるコラーゲン繊維角度の比較。



(5) ヒト膵癌由来オルガノイドを樹立した。

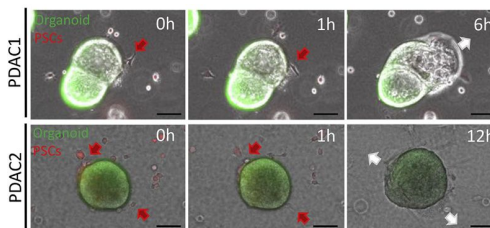
Cell lineを使用した三次元共培養モデルではヒト組織に類似しているとは言い難いため、ヒト膵癌組織検体から人為的に創出した実際の器官に類似した組織体であるヒト膵癌由来オルガノイドを樹立した。樹立したオルガノイドはこれまでの他癌による報告の通り、管状構造・基底膜構造を持つことを確認した。



図：膵癌由来オルガノイドの蛍光免疫染色画像

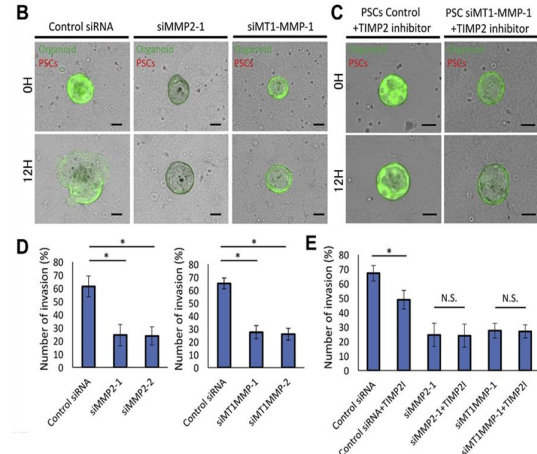
(6) **PSC の直接接触でオルガノイドの基底膜が破壊される。**

オルガノイドを PSC と共培養すると、オルガノイドは管状構造・基底膜構造を失い、周囲への浸潤が亢進した。3D 培養での局所を詳細に観察すると、オルガノイドへの PSC の直接接触が基底膜破壊の誘因となった。



図：3D 培養での PSC の直接接触によるオルガノイドの基底膜破壊

(7) **膵星細胞での MMP2 または MT1MMP のノックダウンで、膵星細胞による基底膜破壊が有意に減弱した。**



膵星細胞による直接接触が、膵星細胞上の MT1MMP に結合する MMP2 を介して基底膜破壊および膵癌細胞の間質浸潤を誘導することを示唆した。

図：B：PSC と膵癌オルガノイドの共培養の蛍光顕微鏡画像。PSC-1 を siMMP2 または siMT1MMP でトランスフェクトした。C：PSC に siMMP2 または siMT1MMP をトランスフェクトし、TIMP2 阻害剤で処理した。D：PSC-1 (siCtrl・siMMP2・siMT1MMP) と直接共培養した膵癌オルガノイドの浸潤数、E：TIMP2 阻害剤で処理した PSC-1 (siCtrl・siMMP2・siMT1MMP) と直接共培養した膵癌オルガノイドの浸潤数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

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

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 4 件)

Koikawa K, Ohuchida K, Yonenaga A, Sagara A, Ando Y, Kibe S, Takesue S, Nakayama H, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M. Endo180 Expression and Histologic Categorization in Cancer Stroma is an Independent Prognostic Index in Pancreatic Cancer. 49th Annual Meeting of the APA、2018 年

米永晃子、肥川和寛、大内田研宙、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、水元一博、中村雅史、膵オルガノイドを用いた浸潤性膵管癌の新たな局所微小浸潤機序の解明、第 49 回日本膵臓学会大会、2018 年

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

肥川和寛、大内田研宙、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、膵星細胞が誘導する新たな膵癌局所微小浸潤機序の解明、第 25 回日本消化器関連学会週間、2017 年

〔図書〕(計0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：井上 重隆

ローマ字氏名：(INOUE, shigetaka)

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)：00529802

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：藤田 逸人

ローマ字氏名：(FUJITA, hayato)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁)：40611281

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：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。