

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02797

研究課題名(和文) 3D培養による膵癌線維化モデル構築と膵癌細胞 膵臓星状細胞間相互作用の機序解析

研究課題名(英文) Establishing a 3D model of fibrosis in pancreatic cancer and analysis of interaction between tumor cells and stellate cells

研究代表者

狩野 光伸 (Kano, Mitsunobu)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・教授

研究者番号：80447383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵がんでは顕著な腫瘍組織内の線維化が臨床薬効による難治性の重要な規定因子という仮説の検証を、その構成細胞である膵星細胞PSCの立体培養により取り組んだ。具体的には、ヒト膵がん症例で線維組織の厚みを測定し、同等の厚みを有する三次元培養組織を作成した。得られた線維組織モデルで線維化に関わるタンパクの可視化と解析を行い、腫瘍由来PSCと正常線維芽細胞の差を見出した。PSCと膵がん細胞との三次元共培養モデルの構築に取り組み、臨床的に認められる腫瘍組織占有割合の範囲を再現する三次元共培養組織の作成に成功した。その結果、膵がん細胞との共培養によるPSCの形質異常の獲得を再現でき、その機構解明が進展した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんは我が国のがん死亡の原因4位である。特にその8割以上を占める膵管腺癌は難治である。膵がんの五年生存率は依然として1割前後であり、数十年来、本質的な改善がない。特に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であるが不応例が多い。膵がんでは薬物療法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なか、本研究では顕著な腫瘍組織内の線維化が臨床薬効の重要な規定因子であるという仮説の検証を進めた。膵がんを含む線維化を伴う疾患の新規治療法開拓への礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Our hypothesis is that fibrosis within tumour tissue is an important determinant of clinical drug efficacy. We worked on the verification of this hypothesis through three-dimensional culture of its constituent cells, pancreatic stellate cells (PSCs). Specifically, the thickness of fibrotic tissue was measured in human cases and three-dimensional cultured tissue with equivalent thickness was created. The ECM proteins involved in fibrosis were visualised and analysed in the fibrotic tissue model, and differences between pancreatic cancer-derived PSCs and normal fibroblasts were revealed. We developed a three-dimensional co-culture model between PSCs and pancreatic cancer cells, and succeeded in creating three-dimensional co-cultured tissue that reproduced the range of tumour tissue occupancy rates observed clinically. Consequently, we were able to reproduce and analyse mechanism of the acquisition of PSC trait abnormalities by co-culturing with pancreatic cancer cells.

研究分野：ナノ病態生理学

キーワード：膵がん 間質 線維化 三次元培養

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 4 位である。特にその 8 割以上を占める膵管腺癌は難治である。膵がんの五年生存率は依然として 1 割前後であり、数十年来、本質的な改善がない。特に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であるが不応例が多い。膵がん薬物療法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の異常構築と顕著な腫瘍組織内の線維化が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 (*Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007, *Cancer Sci* 2009, *Nat Nanotechnol* 2011/2016 他)。

に関し、線維組織は膵がんの病理学的な特徴で腫瘍の 80% を占めるとされる。膵がんの線維化は患者予後に関わる。たとえば PDGF 受容体発現陽性度が強い線維組織を有する症例は予後不良であることを、代表者は既に報告していた (*Med Oncol* 2012)。膵がんの線維組織は、主たる構成細胞として膵臓星状細胞 (Pancreatic Stellate Cell: 以下 PSC) の研究が盛んである。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.* *Gut* 2012 他)。単離 PSC の平面培養系とヒト病理組織がこれまで PSC の解析に用いられ、PSC は正常膵臓での静止型から腫瘍や炎症時に活性化に分化すること、活性化型 PSC は α -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 (Extracellular Matrix: 以下 ECM) を大量に生成すること、活性化型 PSC の刺激には腫瘍細胞や活性化型 PSC 自体による TGF- β の発現増加が重要であること、等が報告されている。

これまで、代表者は分担・正宗らとともにこの PSC の立体培養に取り組み、個々の細胞に事前に足場成分を添加してからカルチャーインサートに投入していくことで立体培養組織を形成する方法を樹立してきた (基盤 B H26-29)。こうした立体培養法の樹立までの過程の中で、立体培養時に 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ことを見出し、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に思われた。とりわけ ECM 構築は本質的に立体的であり、薬剤送達や (基盤 B H26-29, Kano *et al.* *J Control Release* 2016 他)、腫瘍細胞増殖等の制御に重要だが、1) 過剰に産生され蓄積している ECM がどのように構築されているのか、2) 腫瘍細胞 - PSC 間相互作用がどのように ECM 産生量・構築を制御しているのか、その詳細は平面培養系を主として従来研究では未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、代表者らがこれまでに開発してきた PSC 立体培養技術に基づいて、以下の 2 つの目的を果たすこととしていた。

目的 1: 膵がん細胞と PSC から構成される *in vitro* 膵がん線維化立体モデルを確立する。

目的 2: このモデルを活用することで、膵がん微小環境における腫瘍細胞 - PSC 間相互作用が ECM 構築に及ぼす影響を及ぼすかを評価し、解析を推進する。

以上の目的を達成すべく、次の 4 つの課題に取り組んだ。

課題 1: ヒト膵がん由来 PSC 単独での立体培養モデルにおける ECM 異常構築の機序解析

課題 2: PSC とヒト膵がん細胞株との立体培養を用いた共培養系の確立

課題 3: PSC とヒト膵がん細胞株との立体培養を用いた共培養系における ECM 異常構築の可視化

課題 4: PSC とヒト膵がん細胞株との立体培養を用いた共培養系における ECM 異常構築機序解析

3. 研究の方法

ヒト膵がん患者由来 PSC は、分担者・正宗が既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) の手法に改良を加えた手法により行った。すなわち、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 (特許第 6629119 号)。

積層培養法において、得られる三次元培養組織の厚みは、播種細胞数により規定される。PSC の単独での積層培養を行うにあたり、臨床的に認められる線維組織の厚み (= 腫瘍血管から腫瘍細胞までの距離) の計測を行い、この実測値を実現する播種細胞数を決定した。

PSC の積層培養時に、膵がん細胞株を種々の混合比率で加えることで、三次元共培養モデルの構築を行った。膵がん細胞株は Capan-2, SUIT-2, MiaPaCa-2, BxPC-3 など、複数種類を用いた。臨床的に認められる線維化組織の占有割合を病理組織学的解析により得て、妥当な混合比率の決定を行った。

三次元培養組織の厚みは、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、タンパク発現の局在は蛍光免疫染色により実施した。

三次元培養組織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、カルチャー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

ヒト膵がん26症例に対し、線維組織の厚みを50箇所測定したところ、線維組織の厚みはステージに依らず中央値が10-30 μm 前後であることが判明した。初代PSC、不死化PSCそれぞれを用い、積層培養時の播種細胞数を検討し、10-30 μm 程度の厚みを有する三次元培養組織を作成することに成功した(初代PSCでは24-wellカルチャーインサートに 5×10^5 cells程度以上、不死化PSCでは 1×10^6 cells程度以上)。さらに、得られた線維組織モデルにおいてCollagen IやFibronectinなどの線維化に関わるECMタンパクの蛍光免疫染色による可視化・解析を行った。膵がん由来PSCではCollagen Iの過剰沈着、Fibronectin線維の異常配向が認められるのに対し、正常線維芽細胞ではこうした現象は認められないことが判明した。小分子阻害剤、siRNAを用いた検討を通じ、TGF- β /ROCK/MMP経路が膵がん由来PSCにおける異常ECM構築に寄与すること、さらにこの経路をマトリセルラータンパクSPARCが制御していることを見出し、報告した(*Biomaterials* 2019; **192**:35-67)。以上により本研究の課題(1)を達成した。なお、上述の異常ECM構築を標的化することにより、線維組織中のナノ薬剤の通過効率が改善することも見出し、治療的介入への発展が期待される(投稿準備中)。

次に、PSCと膵がん細胞との三次元共培養モデルの構築に取り組んだ。The Human Protein Atlasデータの解析を通じ、ヒト膵がん組織において間質組織が40-80%を占有することをまず見出した。「PSC:膵がん細胞の混合比率を変化させることで、線維組織の占有割合の異なる三次元共培養組織が得られる」という仮説を立て、PSC播種数を固定し、膵がん細胞株の播種比率を1/10-1/5000の間で検討した。PSCと膵がん細胞の組合せによって同じ播種比率であっても形成される三次元共培養組織中の線維組織の占有割合は異なっていたが、いずれの組合せでも1/10-1/5000の範囲の混合比率で、臨床的に認められる占有割合の範囲(40-80%)をカバーする三次元共培養組織を作成しうることを見出した。以上により得られたPSCと膵がん細胞の三次元共培養組織では、CollagenやFibronectinの異常構築に加え、膵がん細胞との共培養により初めて認められるPSCの形質異常が認められた。すなわち、PSC単独での積層培養では、がん関連線維芽細胞の特徴とされる α -SMAの発現が減少するが、膵がん細胞との共培養によって膵がん細胞近傍のPSCは再び α -SMA発現を顕著に獲得する。小分子阻害剤、siRNAを用いた検討を通じ、転写調節因子YAPならびに転写因子SMAD2/3の協調的な活性化がこうしたPSCの形質異常の獲得(α -SMA陽性により特徴づけられる筋線維芽細胞分化)に必須であることを見出した。YAP、SMAD2/3活性を制御しているシグナル経路の探索を行い、YAPおよびSMAD2/3活性に共通して重要な経路(SRC, GSK3)に加え、YAPに特異的な経路(RHO/ROCK, RAC/PAK)、SMAD2/3に特異的な経路(PI3K)を見出した。逆に、 α -SMA発現やそれに伴う収縮力の阻害は、YAPおよびSMAD2/3活性を抑制することも判明し、異常形質の獲得・維持を促進するシグナルループの存在が明らかとなった(*Biomaterials* 2020; **251**:120077)。さらに、YAPならびにSMAD2/3活性の制御シグナルの上流を探索し、これらシグナルの活性を制御するECMタンパクならびにその受容体の同定に至った(投稿準備中)。以上により、本研究の課題(2)(3)(4)を達成した。

なお、膵がん細胞株をPSC・線維芽細胞の積層培養時に同時に混合するのではなく、積層培養後に事後的に追加することで、転移の研究に応用できることも見出し、報告している(*Biomaterials* 2018; **179**:144-55)。

以上の一連の成果を、和文総説2報、英文総説1報(招待あり; *Cancer Sci* 2018)、英文著書1件(*Springer Nature* 2019)としても報告した。また以上の研究成果を、国内学会での発表8件(招待講演3件、口頭発表5件)、国際学会での発表1件(ポスター1件)としても報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 田中啓祥、狩野光伸	4. 巻 36
2. 論文標題 がん微小環境における線維化とナノ DDS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 232-240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dds.36.232	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 狩野光伸	4. 巻 36
2. 論文標題 がん微小環境を取り巻く諸科学	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 229-229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dds.36.229	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Hiroyoshi Y., Kurihara Tsuyoshi, Nakazawa Takuya, Matsusaki Michiya, Masamune Atsushi, Kano Mitsunobu R.	4. 巻 251
2. 論文標題 Heterotypic 3D pancreatic cancer model with tunable proportion of fibrotic elements	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120077 ~ 120077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2020.120077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takashima Hiroki, Koga Yoshikatsu, Tsumura Ryo, Fuchigami Hirobumi, Matsumura Yasuhiro, Yasunaga Masahiro, Tanaka Hiroyoshi Y., Kurihara Tsuyoshi, Kano Mitsunobu R.	4. 巻 35
2. 論文標題 Selection of Tumor models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 443 ~ 447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dds.35.443	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe S, Hayashi K, Toh K, Kim HJ, Liu X, Chaya H, Fukushima S, Katsushima K, Kondo Y, Uchida S, Ogura S, Nomoto T, Takemoto H, Cabral H, Kinoh H, Tanaka HY, Kano MR, Matsumoto Y, Fukuhara H, Uchida S, Nangaku M, Osada K, Nishiyama N, Miyata K, Kataoka K	4. 巻 10
2. 論文標題 In vivo rendezvous of small nucleic acid drugs with charge-matched block cationers to target cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09856-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Hiroyoshi Y., Kano Mitsunobu R.	4. 巻 109
2. 論文標題 Stromal barriers to nanomedicine penetration in the pancreatic tumor microenvironment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2085 ~ 2092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiguchi Akihiro, Matsusaki Michiya, Kano Mitsunobu R., Nishihara Hiroshi, Okano Daisuke, Asano Yoshiya, Shimoda Hiroshi, Kishimoto Satoko, Iwai Soichi, Akashi Mitsuru	4. 巻 179
2. 論文標題 In?vitro 3D blood/lymph-vascularized human stromal tissues for preclinical assays of cancer metastasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 144 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2018.06.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Hiroyoshi Y., Kitahara Kentaro, Sasaki Naoki, Nakao Natsumi, Sato Kae, Narita Hirokazu, Shimoda Hiroshi, Matsusaki Michiya, Nishihara Hiroshi, Masamune Atsushi, Kano Mitsunobu R.	4. 巻 192
2. 論文標題 Pancreatic stellate cells derived from human pancreatic cancer demonstrate aberrant SPARC-dependent ECM remodeling in 3D engineered fibrotic tissue of clinically relevant thickness	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 355 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2018.11.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 田中啓祥、狩野光伸
2. 発表標題 線維化量を制御可能なヒト膵がん微小環境の三次元培養モデルの確立・解析とナノDDS研究への応用
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyoshi Y. Tanaka, Mitsunobu R. Kano
2. 発表標題 Heterotypic 3D Cell Culture Model Of The Pancreatic Cancer Tumor Microenvironment With A Tunable Proportion Of Fibrotic Elements
3. 学会等名 EACR Goodbye Flat Biology: Next Generation Cancer Models (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中啓祥、狩野光伸
2. 発表標題 がん微小環境とイメージング
3. 学会等名 MRI コラボ・ワークショップ2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中澤拓也、田中啓祥、狩野光伸
2. 発表標題 三次元培養法による膵がん線維化組織のモデル化および筋線維芽細胞分化機序の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中啓祥, 狩野光伸
2. 発表標題 膵臓がん線維化組織の3D培養モデルを利用したナノ薬剤送達効率の解析
3. 学会等名 第36回日本DDS学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中啓祥, 正宗 淳, 狩野光伸
2. 発表標題 Heterotypic 3D Culture Model of the Pancreatic Cancer Microenvironment with a Tunable Proportion of Fibrotic Elements
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsunobu R Kano
2. 発表標題 Why pancreatic cancer is difficult to treat: analyzing the characteristics of the disease tissue
3. 学会等名 4th International Pharma Conference "Global Challenges and Pharmaceutical Impacts" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsunobu R Kano
2. 発表標題 Scientific thinking and the real world-thoughts from medicine and SDGs
3. 学会等名 Challenges facing humanity at the age of COVID-19 and beyond: Women in Science Without Borders (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsunobu R Kano
2. 発表標題 Thoughts on the use of Information Science: Importance of QUESTIONS
3. 学会等名 "India-Japan Collaborative Workshop on Health Research" jointly organized by AMED and ICMR-DST (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsunobu R Kano
2. 発表標題 Thoughts on STI to achieve the SDGs
3. 学会等名 Tsukuba Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中啓祥, 狩野光伸
2. 発表標題 膵臓がんにおいてナノ薬剤送達の障壁となる線維化組織の立体培養法によるモデル化および解析
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中啓祥, 狩野光伸
2. 発表標題 Pancreatic stellate cells from human pancreatic cancer show aberrant ECM remodeling in 3D engineered fibrotic tissue
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中啓祥, 狩野光伸
2. 発表標題 立体培養法による組織微小環境モデルの開発および疾患研究への応用
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 狩野光伸
2. 発表標題 大学はSDGs達成にどのようにかわれるか
3. 学会等名 第71回生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 狩野光伸
2. 発表標題 世界と地域に新たな価値を創造しつづけるSDGs推進研究大学
3. 学会等名 日経SDGsフォーラム 特別シンポジウム 社会的共通資本としての医療 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 狩野光伸
2. 発表標題 難治の病気に科学技術で立ち向かうには
3. 学会等名 外務省科学技術外交セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 狩野光伸・田中啓祥
2. 発表標題 膵がんにおける組織構築の特徴とナノ薬剤の活用法を考える
3. 学会等名 日本DDS学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsunobu R Kano
2. 発表標題 Answering questions from the real world -from medicine to the SDGs-
3. 学会等名 3rd International Conference of Women in Science without Borders (WISWB), Cairo, Egypt（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tanaka HY, Kano MR	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 33
3. 書名 Stromal barriers within the tumor microenvironment and obstacles to nanomedicine (Cancer Drug Delivery Systems based on the Tumor Microenvironment, Chapter 4)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	正宗 淳 (Masamune Atsushi) (90312579)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------