

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08708

研究課題名(和文)3D膵癌オルガノイドモデルを用いた新たな癌細胞死形態とそれに伴う浸潤機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of cancer progression mechanism associated with novel forms of cell death in pancreatic cancer using organoid models

研究代表者

森山 大樹 (MORIYAMA, Taiki)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：70586859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵癌組織で恒常的に起こっている、あるいは癌治療で誘導される細胞死が癌の浸潤機構に与える影響を明らかにすることを目的とし、特に癌の進展に影響するとされるnecroptosisを中心に研究を行った。
ヒト膵癌組織ではnecroptosisのkey mediatorであるRIP3とMLKLが高発現しており、necroptosisが恒常的に起きていると考えられた。膵癌細胞へのnecroptosis誘導および上清添加実験から、necroptosisはCXCL5-CXCR2経路を介して膵癌細胞の遊走能および浸潤能を促進していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、特に癌の進展に大きく影響を与えていると考えられる、プログラムされた細胞死のひとつであるnecroptosisに注目した。
本研究結果から、膵癌の薬物治療において、apoptosis耐性となった癌細胞にnecroptosisを誘導することが有効である可能性が示唆されたとともに、タンパク発現の差異によってnecroptosis誘導への反応性が異なることや、necroptosisによって放出された因子が癌の進展を促進することが明らかとなった。necroptosisが誘導される条件や放出される因子を抑制する戦略をさらに研究することで、膵癌に対する新たな治療戦略の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Necroptosis is a form of programmed cell death that is accompanied by release of intracellular contents. We investigated the significance of necroptosis in pancreatic cancer.

RIP3 and MLKL are highly expressed in human pancreatic cancer tissues. CXCL5 released from necroptotic cells promotes cancer cell migration and invasion via CXCR2 in pancreatic cancer cells. Induction of necroptosis is a possible therapeutic strategy to overcome apoptosis resistance in pancreatic cancer, but it could also enhance cancer progression. Development of necroptosis induction therapy might include a means of suppressing its negative influences.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 細胞死 necroptosis オルガノイド 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は最難治がんのひとつであり、その惨たる予後改善のために膵癌の進展や転移のメカニズムを明らかにすることは必須の課題である。細胞死への抵抗性は癌の大きな特徴のひとつであるが、実際の癌組織内では虚血や低酸素などのストレスから、様々な細胞死が起こっている。apoptosis や autophagy, necroptosis は低酸素など様々なストレス環境下で誘発され、また死細胞から放出される分子についても細胞死形態によって違いがあり、腫瘍微小環境へ様々な影響を与えていると考えられる。癌組織では恒常的に細胞死が起こっているが、細胞死が癌浸潤機構に与える影響はほとんどが未解明であり、本研究ではそれらを明らかにすることとした。

2. 研究の目的

本研究では癌組織で恒常的に起こっている細胞死形態、あるいは治療によって誘導される細胞死形態が癌浸潤機構に与える役割について明らかにすることを目的とする。細胞死形態によっては微小環境を癌促進性に変化させる可能性があり、より高い治療効果を生み出すために細胞死形態を制御することが可能になる。癌組織における癌細胞や微小環境内に存在する間質細胞などの細胞死は必然のイベントであり、本研究の成果は他癌腫に対しても大きな波及効果を生み出すものと考えられる。

3. 研究の方法

(1)膵癌組織で恒常的に起こっている細胞死形態の同定

ヒト膵癌組織、自然発癌マウスモデル(KPC マウス)から primary culture で樹立した癌細胞や膵癌細胞株を用いて、2次元培養や3次元コラーゲン培養、3次元オルガノイドなど各種培養条件下で起こる細胞死形態について死細胞染色などを用いて検討する。

(2)細胞死形態に特異的な死細胞による癌細胞浸潤機構に与える影響の検討

膵癌細胞株や primary culture で樹立した膵癌細胞に薬剤を添加して各種細胞死を誘導し、その上清を回収して死細胞から放出される内因性分子や細胞外小胞が与える癌細胞への影響を migration assay, invasion assay, scratch assay, proliferation assay などで評価する。癌細胞浸潤への影響についてさらに2次元培養、3次元培養環境下にタイムラプスなどで経時的に観察する。また樹立した膵癌オルガノイドに細胞死を誘導し、細胞死の局在と、細胞浸潤形態を観察する。

(3)細胞死形態によって放出される内因性分子、細胞外小胞の同定

各種細胞死を誘導した死細胞上清を antibody array で比較、解析し、細胞死形態特異的な放出物質を同定し、その中から EMT や細胞接着、間質リモデリングなど、癌細胞浸潤に直接、あるいは間接的に関連する可能性のある分子をターゲットとして限定する。候補となった分子を薬剤や CRISPR Cas9 を用いた遺伝子改変などによって増強あるいは減弱して癌細胞の浸潤能、浸潤形態の変化を観察する。

(4)細胞死、あるいは死細胞から放出される内因性分子をターゲットとした治療方法の開発

自然発癌マウスモデルを用いて薬剤投与による細胞死誘導、抑制実験を行い、癌進展への影響について検討する。さらに、(3)で同定した放出物質の中から細胞浸潤に関わる分子を薬剤、遺伝子改変などによって抑制し、癌細胞浸潤、転移の評価を行う。

4. 研究成果

(1)ヒト膵癌切除標本組織での免疫染色において、necroptosis の key mediator である RIP3 と MLKL が腫瘍周囲の正常膵組織と比較して高発現しており、膵癌組織においては apoptosis や necrosis 以外に necroptosis が恒常的に起こっていると考えられた(図 1a)。さらに、MLKL は

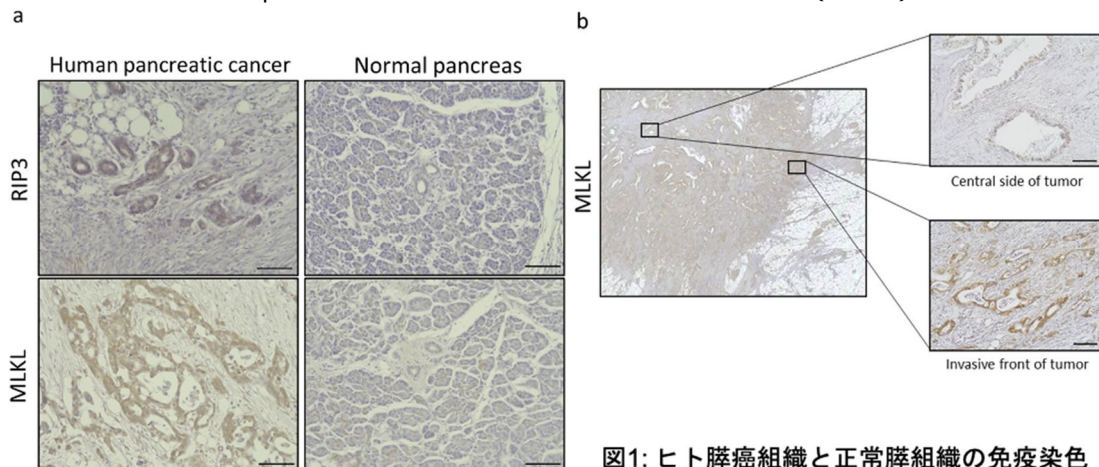


図1: ヒト膵癌組織と正常膵組織の免疫染色

腫瘍中心部よりも腫瘍辺縁の先進部でより高発現であることを見出した（図1b）。

(2) TNF- α /SMAC mimetic/zVAD-FMK (TSZ) 投与により膵癌細胞に necroptosis を誘導し、necroptosis をきたした癌細胞の上清を添加することで膵癌細胞の遊走能および浸潤能が促進されることを見出した（図2）。複数のヒト膵癌細胞株を用いた実験結果から、MLKL や RIP3 の発現レベルの低い細胞株においては TSZ 投与で necroptosis が誘導されないことが分かった。また、MLKL の発現レベルが低い細胞株では apoptosis が誘導されやすいことも分かった。

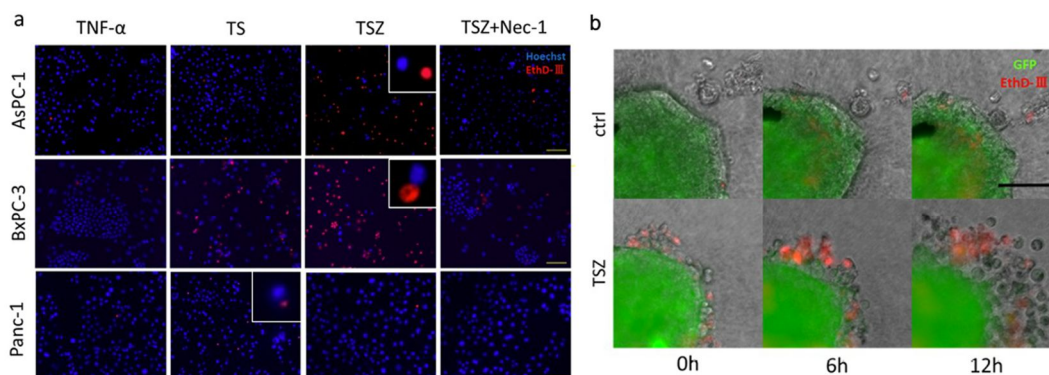


図2: necroptosis誘導およびnecroptosis上清添加による浸潤能変化

(3) 各種細胞死によって放出されるサイトカインをアレイ解析で同定し、MIP3- α 、CXCL5、IL-8などが上昇していたが、necroptosis 誘導細胞においては特に CXCL5 が特異的に上昇していることを見出した（図3）。さらに、CXCL5 が膵癌細胞に与える影響およびそのシグナル伝達経路を同定するため、レセプターの発現をノックダウンした実験やヒト膵癌組織の免疫染色による詳細な観察結果から、特に腫瘍先進部において CXCL5 がケモカインレセプターである CXCR2 を介して膵癌細胞の進展を促進する影響を与えていることが示唆された。また、CXCL5 を膵癌細胞に投与することで遊走、浸潤能が促進されることを確認した。

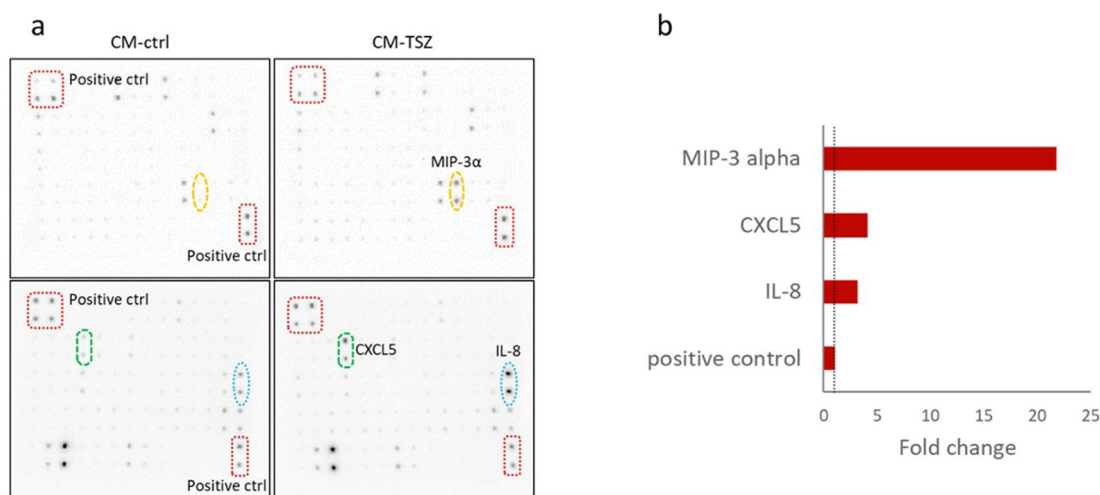


図3: necroptosis誘導細胞でのアレイ解析

(4) 膵癌治療に使用される抗癌剤のひとつであるパクリタキセルは necroptosis を誘導することが知られており、膵癌細胞に対してパクリタキセル単独あるいは necroptosis 阻害剤である nec-1 との併用により各種 mediator の変化を観察したところ、パクリタキセルによる細胞死の増加と、一部の細胞株では CXCR2 のタンパクレベルでの発現低下を認めた。これらの結果から、細胞株によって necroptosis 誘導に対する反応性が違うことが示唆された。

necroptosis の誘導は apoptosis 耐性の癌に対する治療として有効な可能性があるが、本研究結果からは necroptosis によって放出される分子が癌の進展を促進することが示唆され、そのマイナスイネを克服する戦略を同時に開発する必要があると考えられる。今後は実臨床への応用を目指し、より効率的な necroptosis の誘導法、今回同定したもの以外の necroptosis にかかわるシグナル伝達経路の同定、そして CXCL5 をはじめとした necroptosis によって放出される因子による腫瘍促進的な影響を抑制する戦略について研究を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Feng Haimin, Moriyama Taiki, Ohuchida Kenoki, Sheng Nan, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Shirahane Kengo, Ikenaga Naoki, Nagai Shuntaro, Nakata Kohei, Mizumoto Kazuhiro, Nakamura Masafumi	4. 巻 40
2. 論文標題 N-acetyl cysteine induces quiescent-like pancreatic stellate cells from an active state and attenuates cancer-stroma interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-021-01939-1	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 Iwamoto Chika, Ohuchida Kenoki, Shinkawa Tomohiko, Okuda Sho, Otsubo Yoshiki, Okumura Takashi, Sagara Akiko, Koikawa Kazuhiro, Ando Yohei, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Moriyama Taiki, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Eto Masatoshi, Akashi Koichi, Nakamura Masafumi	4. 巻 512
2. 論文標題 Bone marrow-derived macrophages converted into cancer-associated fibroblast-like cells promote pancreatic cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 15～27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.04.013	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 Ando Yohei, Ohuchida Kenoki, Otsubo Yoshiki, Kibe Shin, Takesue Shin, Abe Toshiya, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis in pancreatic cancer promotes cancer cell migration and invasion by release of CXCL5	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0228015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0228015	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、仲田興平、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 微小環境因子依存性に基づいた膵癌subtype分類および薬物治療抵抗性についての検討
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinkawa T, Ohuchida K, Iwamoto C, Shindo K, Nakata K, Ohtsuka T, Nakamura M
2. 発表標題 Subtype classification of pancreatic ductal adenocarcinoma based on microenvironmental niche factors dependency and chemotherapy resistance
3. 学会等名 14th World Congress of International Hepato-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、久野恭子、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、永井俊太郎、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 R-spondin依存膵癌オルガノイド形成に関わる膵星細胞由来微小環境因子の検索
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ando Y, Ohuchida K, Otsubo Y, Sagara A, Kibe S, Takesue S, Nakayama M, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2. 発表標題 Necroptosis in Pancreatic Cancer Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Release of CXCL5
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤陽平、大内田研宙、岐部晋、武居晋、中山宏道、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 膵癌細胞への異なった細胞死誘導による遊走・浸潤能への影響の比較
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤陽平、大内田研宙、相良亜希子、米永晃子、岐部晋、武居晋、中山宏道、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 膵癌細胞のnecroptosisによって放出されるCXCL5は膵癌細胞の遊走・浸潤を促進する
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	寅田 信博 (TORATA Nobuhiro) (00398075)	九州大学・大学病院・臨床検査技師 (17102)	
研究分担者	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	鬼丸 学 (ONIMARU Manabu) (80529876)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	水元 一博 (MIZUMOTO Kazuhiro) (90253418)	九州大学・大学病院・准教授 (17102)	

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