

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16376

研究課題名(和文) スフィア形成法を駆使した膵癌幹細胞の機能解析と指標の確立

研究課題名(英文) analysis of function and establishment of specific marker of pancreatic cancer stem cell by using sphere formation assay

研究代表者

清水 徹之介 (Shimizu, Tetsunosuke)

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00727092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではPANC01よりスフィアを作製し、S100A4タンパク発現との関連を検証してきた。完全な球形のものではS100A4タンパクが細胞内の一部へ局在する傾向を示した。スフィアではS100A4の発現自体が低下している事も明らかになった。このスフィアの悪性度や性質を細胞浸潤アッセイなどで検証すべく、一度に大量の細胞を作成する必要があった。しかし、無血清培地(Prime XV)の供給が終了し、他の培地では再現性をもって同等のスフィアを作成する事は困難であったため、スフィア作成を軸にした研究は断念せざるを得なくなった。引き続き、関連する研究を模索したが、うまく展開させる事ができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

その存在や分離方法が定まっていない癌幹細胞に対し、再現性をもって分離培養しようとする研究であった。無血清培地を用いて、スフィア形成法を確立し、その形態によって構成する細胞の性質が異なるであろう事は確認できた。特にS100A4に関してはE-cadherinとの関連も本研究で指摘できた。E-cadherinはEMTに関連するマーカーであり、癌の悪性度の変化とスフィア形成との関連性が示唆された。当初目的とした膵癌幹細胞の分離・培養には至らなかったが、今後の膵癌治療分野における研究のヒントを得る事ができたのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, spheres have been prepared from PANC01 and their relationship to S100A4 protein expression has been verified. The spheres with a perfect sphere shape showed a tendency for S100A4 protein to localize to a part of the intracellular region. In spheres, S100A4 expression itself was found to be downregulated. In order to verify the malignancy and properties of the spheres by cell invasion assay, it was necessary to generate a large number of cells at a time. However, since the serum-free medium (Prime XV) was no longer available and it was difficult to reproducibly create equivalent spheres with other media, we had to give up the research centered on sphere creation. We continued to search for related studies, but were unable to successfully develop them.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：膵癌

キーワード：スフィア S100A4 膵癌 癌幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌治療が飛躍的に進歩した現代においても、膵癌は極めて予後が悪い癌腫である。「腫瘍内に存在し、自己再生能と腫瘍を構成する様々な系統の癌細胞を生み出す能力を併せ持つ細胞」と定義される癌幹細胞が注目された。特に、抗癌剤耐性との関係性が指摘されており、癌幹細胞を治療ターゲットにおく事で、膵癌治療のブレイクスルーになる事が期待された。しかしながら、その存在や確実な同定方法など、明確でない点が多く、研究も十分に進められていなかった。癌幹細胞研究を確実に進めるためには、再現性のあるモデルを作成する手技の確立が求められた。

2. 研究の目的

本研究では我々の確立したスフィア形成モデル及び臨床検体を用いて癌幹細胞の真の指標を確立し、再現性をもって癌幹細胞を分離する事を目的とした。

3. 研究の方法

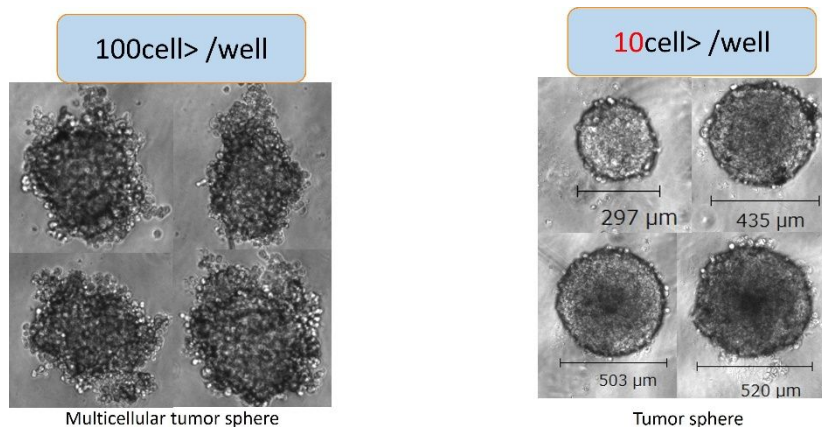
本研究では細胞株として PANC-01、無血清培地として PRIME-XV® Tumor Sphere を使用した。96well plate に 10cell > /well になるように分注し、37℃ で培養した。得られた Sphere を 1 個ずつ個別にゲル中に固め、パラフィンブロックを作成した。このブロックに対して HE 染色、Stem cell marker および S100A4 の免疫染色を施行した。

S100A4 に注目し、Sphere の形状と S100A4 の局在を検討すべく、同様に免疫染色を繰り返し、検証した。Sphere 中の S100A4 の局在を蛍光二重染色を用いて検証した。また、それと同時進行で、当院で得られた膵癌の臨床検体を用いて、S100A4 の免疫染色を施行し、S100A4 高発現/低発現とで予後を比較した。

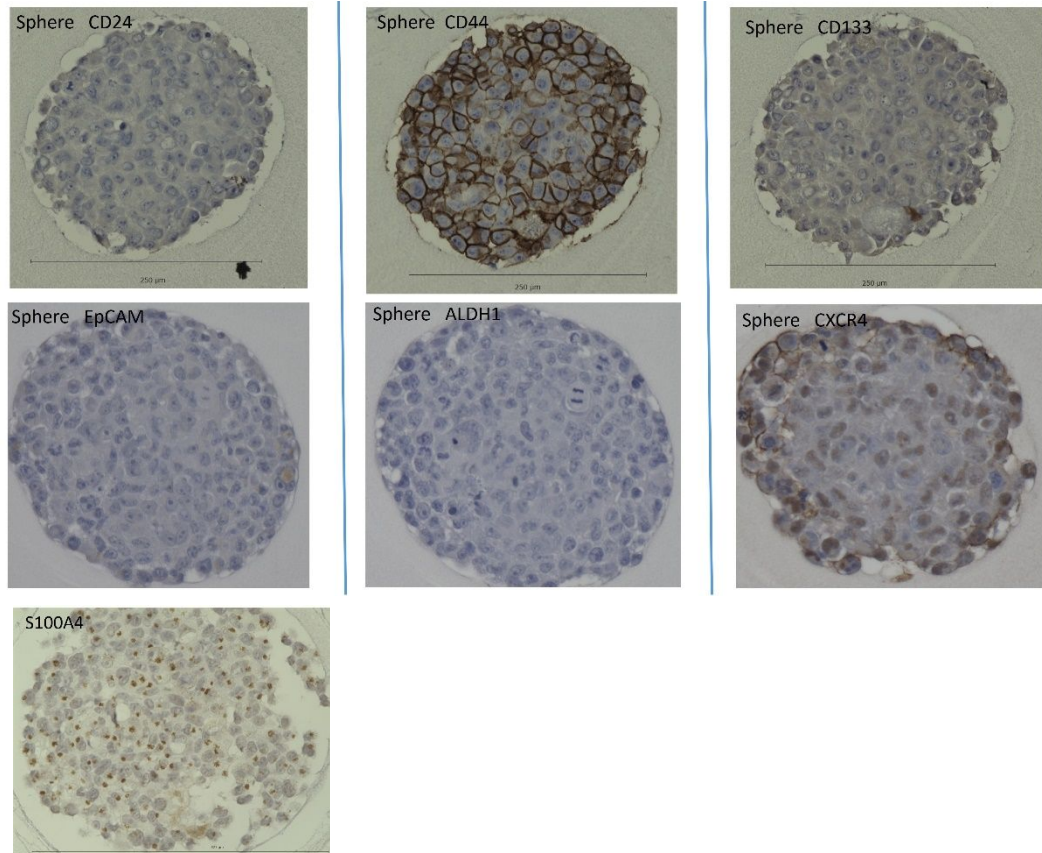
Sphere 形成前後で S100A4 の発現程度の変化を Western blot 法を用いて比較した。その際、当教室で作成している 5-FU 耐性 PANC-01 でも S100A4 の発現の程度を評価した。PANC-01, 5-FU 耐性 PANC-01、Sphere、5-FU 暴露後の PANC-01 を用いて、S100A4 の発現の程度と局在を蛍光二重染色で評価した。S100A4 をノックダウンした PANC-01 で細胞浸潤アッセイを試みた。

4. 研究成果

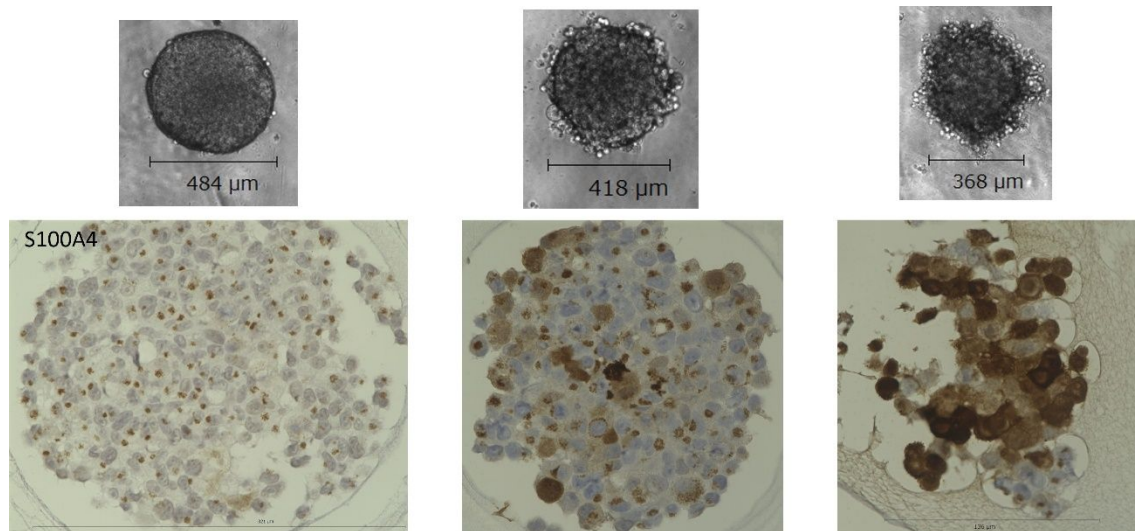
本研究では細胞株として PANC-01、無血清培地として PRIME-XV® Tumor Sphere を使用した。96well plate に 10cell > /well になるように分注する事で、球形の Sphere の作成に成功した。



得られた Sphere を 1 個ずつ個別にゲル中に固め、パラフィンブロックを作成した。このブロックに対して HE 染色、Stem cell marker および S100A4 の免疫染色を施行した。

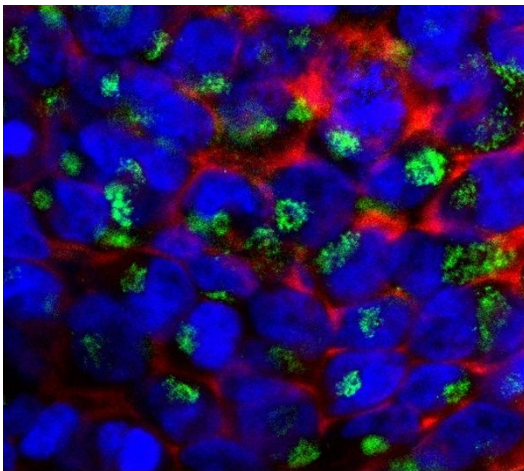
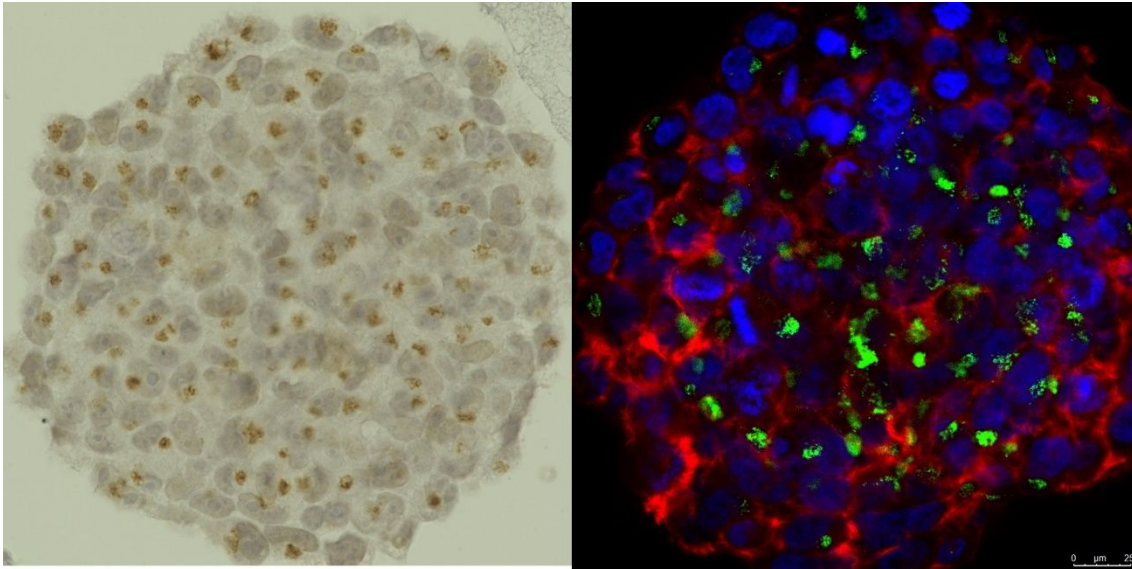


この中で、S100A4 に注目すると、Sphere の形状によって S100A4 の局在が異なっていた。

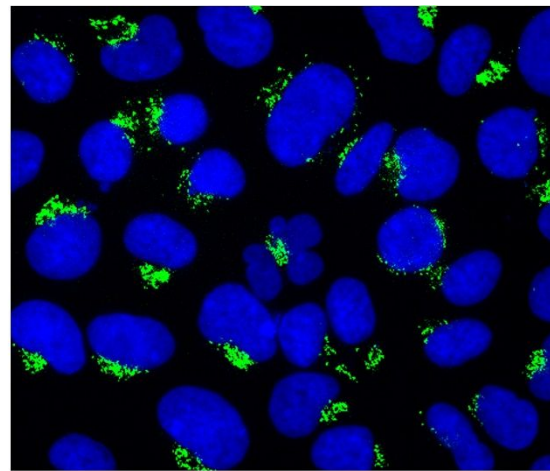


球形の Sphere ほど細胞の中心に局在し、形が崩れた Sphere になるほど細胞質全体への広がりを見せていた。

Sphere 中の S100A4 の局在を蛍光二重染色で検証したところ、Golgi 染色の染色パターンと酷似しており、S100A4 も Golgi 体に存在している可能性が考えられた。

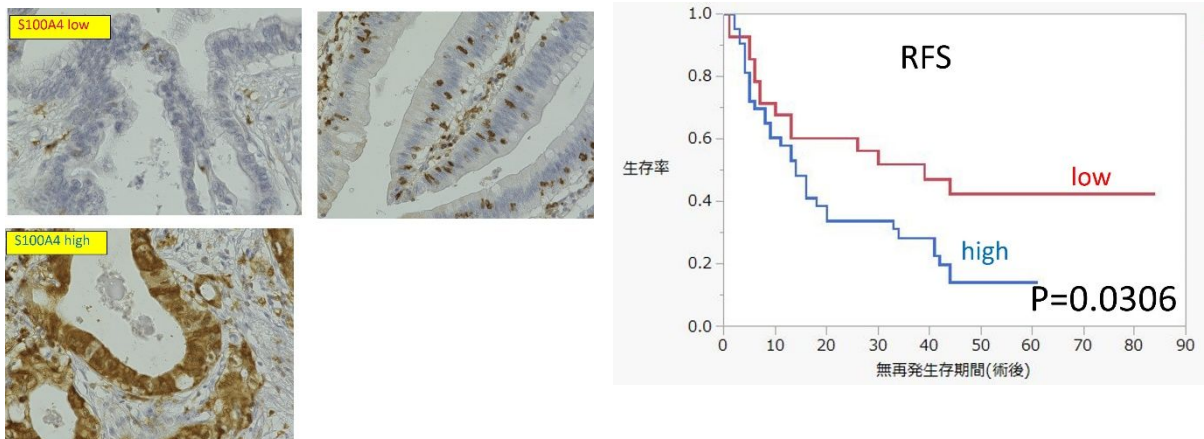


Sphere



Golgi体染色の例

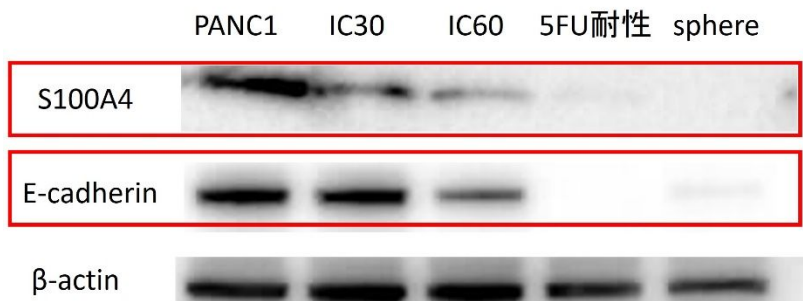
当院で得られた膵癌の臨床検体 71 例を用いて、S100A4 の免疫染色を施行し、S100A4 高発現群 (43 例)、低発現群 (28 例) で無再発生存期間を比較したところ、低発現群で良好であった。



	High(n=43)	Low(n=28)	P value
Recurrence-free survival, median(month)	20.2	27.6	0.03

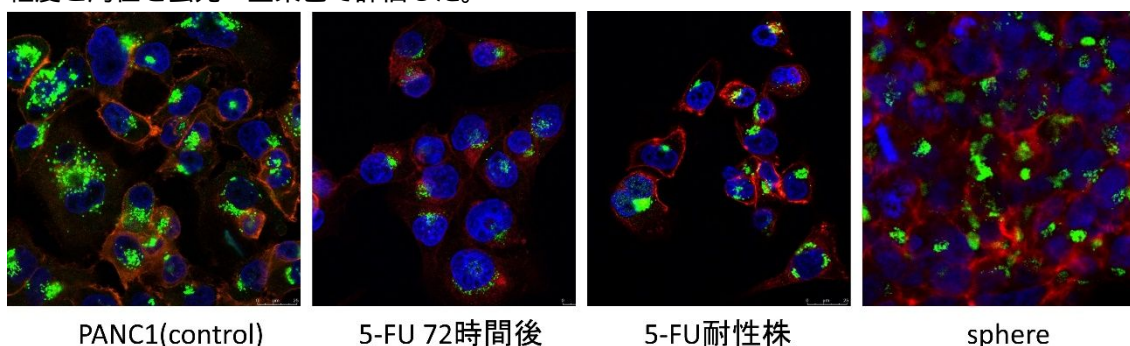
これにより、S100A4 高発現は予後不良因子であると考えられた。

次に、Sphere 形成と S100A4 とのかかわりを検証した。Sphere 形成前後で S100A4 の発現程度の変化を Western blot 法を用いて比較した。その際、当教室で作成している 5-FU 耐性 PANC-01 でも S100A4 の発現の程度を評価した。



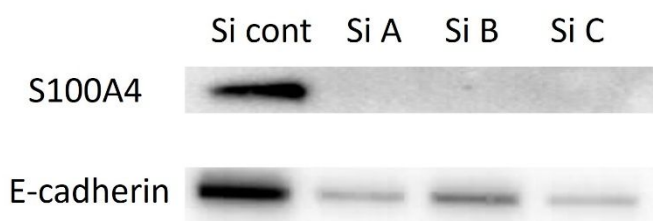
PANC01 では発現を認めていた S100A4 が、5-FU 耐性株、Sphere ではほとんど発現を認めなかった。また 5-FU に暴露された PANC01 では 5-FU の濃度が高くなればなるほど、S100A4 の発現は低下していた。また、S100A4 の発現低下に伴い E-cadherin の発現も低下していた。

同様に PANC-01, 5-FU 耐性 PANC-01、Sphere、5-FU 暴露後の PANC-01 を用いて、S100A4 の発現の程度と局在を蛍光二重染色で評価した。



PANC01 と比較して、5-FU 耐性株や Sphere では細胞の Golgi 体と考えられる部位への局在化を見せると共に、全体の発現量が低下していた。

次に、S100A4 と E-cadherin との関連を検討すべく、S100A4 をノックダウンした PANC01 での E-cadherin 発現を確認した。



以上より、S100A4 をノックダウンする事で E-cadherin の発現低下を確認した。E-cadherin の低下は浸潤能の獲得(EMT)などを示唆するため、E-cadherin が低下している Sphere で浸潤能の評価を行うべく、細胞浸潤アッセイを計画した。

この時点で、無血清培地 PRIME-XV® Tumor Sphere の市場供給がなくなり、研究の継続が不可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------