

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09125

研究課題名(和文) 局所浸潤を先導する癌関連脂肪細胞(CAA)を標的とした新規膵癌制御法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method to control pancreatic cancer by targeting cancer-associated adipocytes (CAAs) that lead to local invasion

研究代表者

富永 洋平 (TOMINAGA, Yohei)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90304823

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)：膵癌の膵外浸潤における癌関連脂肪細胞(CAA)の形態的・機能的な変化と癌細胞の浸潤・転移に及ぼす影響を明らかにし、それらを標的とした局所浸潤を制御する新規治療法を確立することを目的とした。

CAA由来の間質細胞が膵癌細胞の浸潤に寄与し、活性化により癌関連線維芽細胞(CAF)と類似した形態や分布をとるが、CAFよりも柔らかいマトリクスを生成することを明らかにした。また非活性化時にS100A4の発現上昇を認め、マーカーとなりうると考えた。この細胞の活性化を阻害し、マトリクス構造を変化させることにより、膵外浸潤を制御する新たな治療ターゲットとなる可能性があると判断した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の局所浸潤を制御することは、切除可能性の向上に繋がり、ひいては極めて不良な予後を改善することに繋がる。

膵臓は脂肪組織に覆われた臓器である。本研究では、膵癌の局所浸潤における脂肪細胞に着目し、癌関連脂肪細胞由来間質細胞が浸潤に寄与することおよびその特徴について明らかにしたことで学術的・社会的意義がある。さらにこの研究で得られた知見は、脂肪組織で構成される大網や腸間膜への腹膜播種の研究にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the morphological and functional changes of cancer-associated adipocytes (CAAs) in the extrapancreatic invasion of pancreatic cancer and their effects on cancer cell invasion and metastasis. Furthermore, we aimed to establish novel therapeutic strategies to control local invasion by targeting CAAs.

We found that CAA-derived stromal cells contribute to the invasion of pancreatic cancer cells, and upon activation they assume a morphology and distribution similar to cancer-associated fibroblasts (CAFs), but produce a softer matrix than CAFs. We also found increased expression of S100A4 on inactivation, which we considered to be a marker. We determined that inhibiting the activation of these cells and altering their matrix structure could be a new therapeutic target to control extrapancreatic invasion.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 局所浸潤 癌関連脂肪細胞 癌微小環境 癌関連線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

膵癌は早期から浸潤・転移を起こす悪性度の高い腫瘍であり、新規治療の開発は急務である。膵臓は周囲を脂肪組織に囲まれた臓器で、境界には薄い線維性の被膜が介在するのみである。膵被膜を超えて浸潤した局所進行膵癌の予後は悪く、この制御は重要な課題の一つである。膵癌細胞が膵外に浸潤する最初のステップとして周囲の脂肪組織への浸潤がある。脂肪組織浸潤部では脂肪細胞の退縮や著明な線維化がみられることから、膵癌細胞の浸潤に何らかの影響を及ぼしていることが予想される。しかしながら脂肪組織浸潤の過程や癌細胞と脂肪細胞との相互作用を分子生物学的な視点から詳細に解析した過去の報告は乏しい。さらに脂肪細胞は単なる中性脂肪を貯蓄するだけの細胞ではなく、アディポカインや炎症性サイトカインを放出する内分泌臓器としても機能していることが明らかになってきている。以上のことから、脂肪細胞は受動的に浸潤されているだけではなく、膵外浸潤において微小環境構成因子として膵癌細胞の浸潤に影響を及ぼしている可能性があると考えた。

2. 研究の目的

膵癌組織内には、癌関連脂肪細胞(Cancer Associated Adipocyte ; CAA)と呼ばれる癌組織に近接している脂肪細胞が存在するが、その機能については不明な点が多い。本研究の目的は、膵外浸潤における CAA の形態的・機能的な変化と癌細胞の浸潤・転移に及ぼす影響を明らかにし、それらを標的とした局所浸潤を制御する新規治療法を確立することである。

3. 研究の方法

(1)脂肪細胞が膵癌微小環境に及ぼす影響の検討

in vitro にてマウス脂肪細胞と膵癌細胞の 3D 局所浸潤モデルを作成し、脂肪細胞が浸潤に与える影響を評価。次に、マウスに脂肪細胞と膵癌細胞を共移植し、腫瘍形成能および腫瘍微小環境について免疫染色などを用いて評価した。

(2)脂肪細胞由来間質細胞(Adipose tissue-derived Stromal Cells; ASC)の機能的評価

ヒト膵癌組織から脂肪細胞由来間質細胞(ASC)と癌関連線維芽細胞(CAF)を樹立し、蛍光免疫染色、Western Blotting、リアルタイム RT-PCR などを施行し、それぞれの機能的特徴を明らかにした。また、ASC 産生細胞外基質を 3D で評価し、膵癌細胞株の遊走能を MetaMorph software で測定した。

(3)癌細胞が ASC に与える影響を検討

癌細胞株の上清を添加した ASC の産生する細胞外基質を 3D で評価し、膵癌細胞株の遊走能を MetaMorph software で測定した。

(4)ASC 特異的因子の解析および治療標的の同定

同一のヒト膵癌組織から ASC と CAF を樹立し、3 組の膵癌組織由来の ASC と CAF を得た。それぞれの発現解析としてマイクロアレイを施行した。さらに TGF 添加による活性化 ASC における特異的遺伝子発現およびタンパク発現をリアルタイム RT-PCR、Western Blotting、免疫染色で確認した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞が膵癌微小環境に及ぼす影響の検討

マウスから GFP 発現脂肪細胞を得、これを in vitro で癌細胞と共培養し、3D での局所浸潤モデルを作成し、浸潤について評価した。その結果、脂肪細胞が癌細胞側に浸潤すること、その際には癌関連線維芽細胞(CAF)に類似した形態を取ることを明らかにした(図 1)。

次にマウスモデルにて、脂肪細胞が癌細胞に与える影響を検討した。

その結果、癌細胞と脂肪細胞の共移植では、脂肪細胞のみ、癌細胞のみと比較し腫瘍増大をきたすことを明らかにした。さらにこの共移植した腫瘍では、間質増生を認めた。間質において SMA 陽性細胞と、GFP 発現脂肪細胞と蛍光免疫染色で一致することから、CAA 由来の間質細胞(ASC)が CAF 様の形態をとり、分布もそれと近似しているということを示した(図 2)。すなわち、脂肪細胞は癌組織内で CAF 様に変化していると考えた。

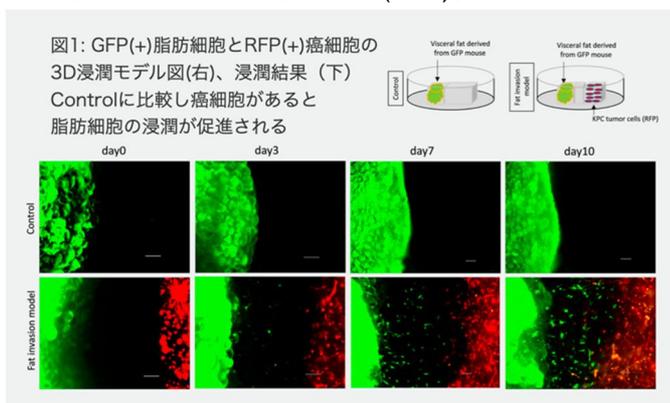
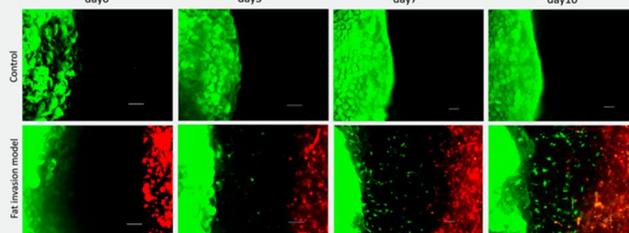
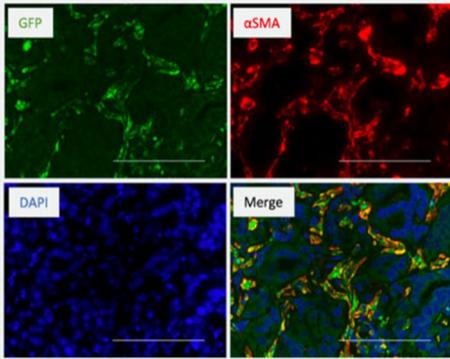


図1: GFP(+)脂肪細胞とRFP(+)癌細胞の3D浸潤モデル図(右)、浸潤結果(下) Controlに比較し癌細胞があると脂肪細胞の浸潤が促進される



すなわち、脂肪細胞は癌組織内で CAF 様に変化していると考えた。

図2: マウスにGFP(+)
脂肪細胞を
癌細胞と共移植した組織の
蛍光免疫染色結果
間質におけるGFPとαSMAの
分布が一致



(2) CAF と比較した ASC の機能的評価

ヒト膵癌組織から ASC と CAF を樹立し、機能的評価を行った。その結果、TGF の刺激により、ASC は CAF 様の SMA や collagen 1、PDGF などの発現が上昇することを qRT-PCR、Western Blotting などでも明らかにした。

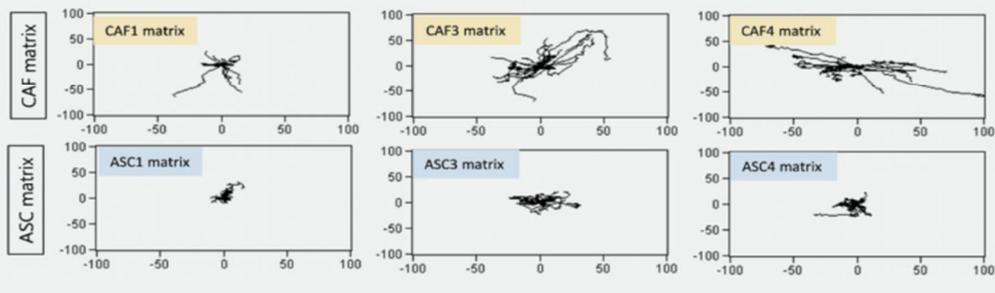
次に、ASC の細胞外基質産生能力について in vitro の 3D コラーゲンマトリクスを用い、評価した。その結果、ASC が産生するコラーゲンマトリクスは、CAF が産生するものよりも、より緩く柔らかいということを明らかにした。

ASC が産生するコラーゲンマトリクスにおけるヒト膵癌細胞株の遊走を測定した(図 3)。

その結果、ヒト膵癌細胞株は CAF の産生するコラーゲンマトリクス上の方が ASC の産生するコラーゲンマトリクス上より、より遠くまで遊走することが可能であることがわかった。

図3:CAF産生細胞外基質（上段）とASC産生細胞外基質（下段）での膵癌細胞の遊走能の違い

CAF産生細胞外基質の方が遊走能が上昇



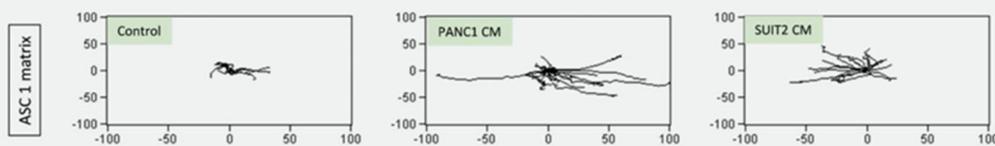
(3) 癌細胞が ASC に与える影響を検討

癌細胞株の上清を添加した ASC の産生コラーゲンマトリクスを評価した。その結果、癌細胞株の上清によりコラーゲンマトリクスがより密度が高くなることがわかった。さらに、この癌細胞の上清を添加した ASC が産生したコラーゲンマトリクス上では、癌細胞がより遠くまで遊走できることが明らかになった(図 4)。

以上のことから、ASC が産生するコラーゲンマトリクスは CAF が産生するものより、緩いものではあるが、癌細胞の存在下では細胞外基質のリモデリングを起こし、癌細胞の浸潤の際により有利な環境を誘導していることを示唆していると考えた。

図4:ASC産生細胞外基質における膵癌細胞株の遊走能の違い

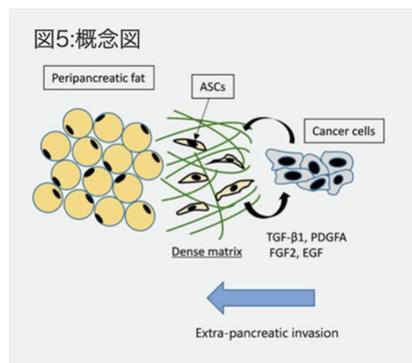
Controlと比較し膵癌細胞の上清添加では遊走能が上昇



(4)ASC 特異的因子の解析および治療標的の同定

膵癌患者の ASC と CAF のマイクロアレイを施行した。その結果、CAF と比較して ASC では S100A4 の発現上昇を認めた。さらにこれが癌細胞からの TGF により低下することを明らかにし、S100A4 は ASC の非活性化マーカーとなり得ると考えた。

本研究成果から、ASC の活性化を阻害し、マトリックス構造を変化させることにより、膵外浸潤を制御する新たな治療ターゲットとなる可能性があるかと判断した(図5:概念図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shinkawa Tomohiko, Ohuchida Kenoki, Mochida Yuki, Sakihama Kukiko, Iwamoto Chika, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Mizuuchi Yusuke, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Subtypes in pancreatic ductal adenocarcinoma based on niche factor dependency show distinct drug treatment responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-022-02301-9	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 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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、小山虹輝、林昌孝、松本奏吉、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 分化型膵癌は癌関連線維芽細胞由来の微小環境因子に依存して分化度を保持している
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 膵癌における癌関連線維芽細胞由来の微小環境因子が腫瘍分化度に与える影響についての検討
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、中村祥一、持田郁己、久野恭子、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、永井俊太郎、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 膵癌における微小環境因子が腫瘍分化度に与える影響およびその分化度に応じた薬物治療反応性についての検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、中村祥一、久野恭子、奥田翔、大坪慶志輝、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、永井俊太郎、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞が膵癌分化度に与える影響についての検討
3. 学会等名 第57回九州外科学会
4. 発表年 2021年

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 Hepeto-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 Iwamoto C, Ohuchida K, Ando Y, Shinkawa T, Ohtsubo Y, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyawaki K, Ohtsuka T, Akashi K, Eto M, Nakamura M
2. 発表標題 BM-Derived Cells Destruct Basement Membrane and Induce Local Invasion of Pancreatic Cancer
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 Ando K, 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 Neeroptosis 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

〔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	井上 重隆 (INOUE Shigetaka) (00529802)	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	森山 大樹 (MORIYAMA Taiki) (70586859)	九州大学・大学病院・准教授 (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)	
研究分担者	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・大学病院・講師 (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