

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09171

研究課題名(和文) 膵癌におけるケモカインを介したがん間質(CAF)との相互作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) The cellular senescence of cancer-associated fibroblast affect the malignant potential in pancreatic cancer

研究代表者

秋田 裕史 (Akita, Hirofumi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・消化器外科 副部長

研究者番号：70528463

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)：8種類のhPSCを用いて膵癌細胞株と共培養実験を行い、hPSCの違いにより、膵癌の増殖速度に違いがあることを見出した。これらの違いは患者年齢と関連したため、老化に伴うSASPが癌の増殖に関与していると考え、hPSCに対して、PCR arrayを行ったところ、SASP因子が悪性度と関連していることが判明した。さらに、hPSCにおける老化・SASP関連遺伝子の発現と、術前治療の腫瘍縮小率と有意に相関しており、さらにhPSCのp53 pathwayを阻害したところ、hPSCからのIL-6分泌が減少し、癌細胞の増殖は抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、膵癌における癌関連線維芽細胞(CAF)が、細胞老化に伴うSASP因子を分泌し、それが膵癌の悪性度に関与していることを見出した。さらに、SASP因子の一つである、p53 pathwayに注目し、p53を阻害することで、CAFからのIL-6分泌が抑制され、その結果膵癌の増殖能が抑制されることを見出した。膵癌におけるがん間質の関与は非常に重要とされており、そのメカニズムの一つに細胞老化に伴うSASPが関与していることを見出し、さらにそれを抑制することで癌の悪性度を抑制できるという本研究は、がん間質をtargetにした治療につながる可能性があり、有意義な研究であると思われる。

研究成果の概要(英文)：First, we primary cultured eight human pancreatic stellate cells (hPSCs) and co-cultured them with pancreatic cancer (PC) cell lines and confirmed that differences in hPSCs induce differences in the proliferation of PCC lines. Then, by performing PCR array on these eight CAFs and combining the data with that of co-culture experiments, we found that the expression of various genes related to cellular senescence and SASP such as TP53, CDKN1A/p21, NFKB1, and IL6 in hPSCs correlated with the proliferation of pancreatic cancer cell lines. Based on these results, we focused on the p53 pathway-mediated cellular senescence of CAFs and examined its effect on the proliferation of PCC lines. When CAFs treated with p53 inhibitors were co-cultured with PC cell lines, the concentration of IL-6, also known as the SASP factor, in the co-culture supernatant was significantly lower than when co-cultured with untreated CAFs, and the proliferation of the PC cell lines was also significantly suppressed.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 癌関連線維芽細胞 細胞老化 SASP 悪性度 p53 IL-6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は手術、化学療法、放射線療法などの集学的治療が発達した現代においても依然として予後不良な疾患であり、その5年生存率は10%未満と他癌種に比べても一際悪い。近年、その膵癌の強い悪性度に、膵癌最大の特徴である豊富な間質組織が関与するとの報告が増えている。特に、その間質組織の主な構成成分である線維芽細胞は『癌関連線維芽細胞(CAF)』と呼ばれ、癌細胞や免疫細胞とケモカイン、サイトカイン、成長因子などを介した相互作用により、膵癌の増殖、浸潤、薬剤抵抗性に関与することが分かってきた。さらに、最新の研究では、このCAFの中にも様々な機能的特徴を有した亜集団が存在し、その不均一性や個体差が膵癌の悪性度を左右する可能性が報告されている。このように、CAFが存在するというだけでなく、その『個性』に違いがあるということが膵癌の病態を把握する上で非常に重要であることが示唆されている。

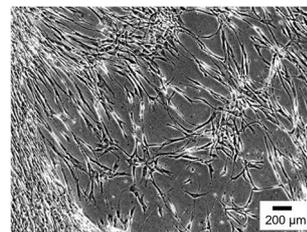
2. 研究の目的

本研究では、膵癌における悪性度が、CAFの個体差に起因するかどうかを検証し、その個体差の原因となる因子を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)hPSCの初代培養・共培養/増殖アッセイ

ヒト膵癌由来癌関連線維芽細胞(hPSC)は、倫理審査委員会の承認取得後、患者の同意を得た上で、大阪大学医学部附属病院で施行した膵癌切除標本から採取した。初代培養の方法は、当教室ですでに確立している方法を採用した(図1)。8症例の膵癌組織から初代培養したhPSCを樹立し、この個体差を調べるために、癌細胞株と共培養し、その増殖能の違いを検証した。共培養アッセイは0.4µmのporeのTranswell(Corning)を用いた非接触型の形式で行った。まず、上層にhPSCを(1.0×10^4 個/well)撒き、10%のFBSを含むDMEMで一晩培養した。hPSCがTranswellに定着したら、下層にPSNを



(図1)

1.0×10^5 個/well撒き、さらに培地を、FBSを0.5%含んだDMEMに変え、48時間の共培養をした時点でPSNの増殖程度をHoechst 33342(Thermo Fisher)を用いた蛍光染色法で評価した。

(2)RT-qPCR array

個体差の要因を調べるために、RT-qPCR arrayを実施した。PCR arrayは、QIAGEN®のRT² Profiler™ PCR Array『Human Cellular Senescence』、『Human Cancer Inflammation and Immunity Crosstalk』を用いた。さらにKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)とReactomeの二つのデータベースを使ってPathway Enrichment分析を行った。

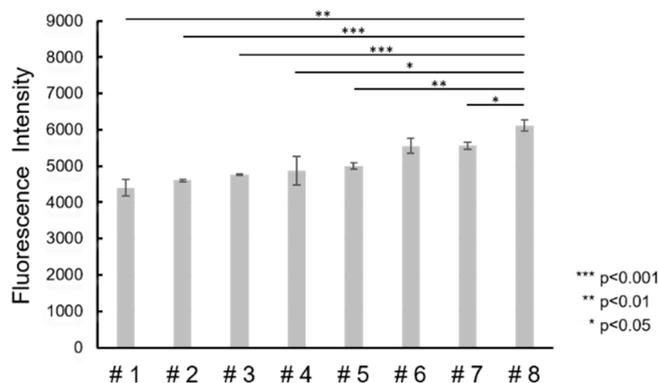
(3)p53 inhibition assay/IL-6定量

hPSCを培養する10%FBSを含んだDMEMにp53の阻害剤であるpifithrin-(Sigma-Aldrich)を添加した状態で5日間培養した。pifithrin-の濃度は過去の報告を参考に10µMとなるように調整した。5日間の培養の後、培地を十分wash outしてから前述の共培養実験と同様に膵癌細胞株と2日間共培養して、膵癌細胞株の増殖を評価した。コントロール群ではpifithrin-の代わりにDMSOを使用した。共培養上清中のIL-6濃度を、酵素結合免疫吸着法(ELISA)キットを用いて定量分析した。共培養上清は10倍希釈して解析した。

4. 研究成果

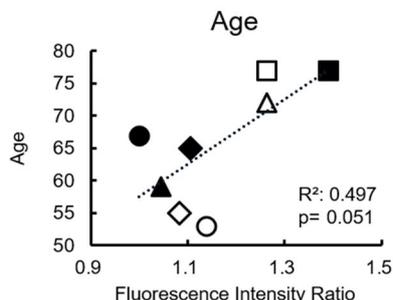
(1)CAFの個体差の同定

8種類のhPSCを用いた共培養実験の結果を図2に示す。共培養するhPSCの違いにより、膵癌細胞株のFluorescence Intensity(FI)も異なっており、特に、#8のFIは#1の約1.4倍と有意に高かった($P < 0.001$)。これらの結果から、CAFの違いが膵癌細胞の増殖に影響している可能性が示唆された。次に#1の蛍光強度を基準とし、Fluorescence Intensity rate(FIR)を、($FIR(\#X) = FI(\#X) / FI(\#1)$)と定義し、FIRとCAFを採取した症例の



(図2)

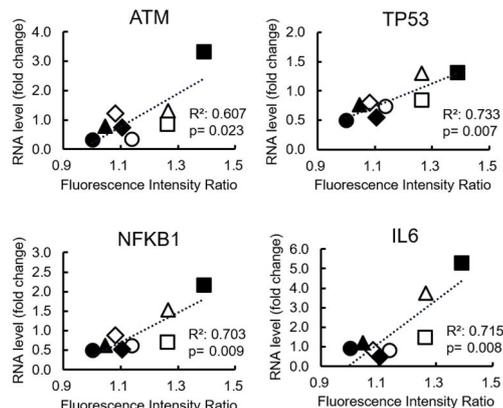
臨床データとの関連を調査したところ、術前治療に伴う腫瘍縮小率 (Tumor Regression Rate = Tumor size before treatment/Tumor size before surgery) は、FIR と有意に相関しており、hPSC の違いが、臨床上的治療効果にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに hPSC の個体差の決定因子を検討するため、様々な治療前臨床因子との相関を調べたが、腫瘍径や CA19-9 値、FDG-PET における SUV-max 値などは、いずれも有意な相関は認めず、唯一、患者年齢が、わずかに有意差を認めないものの、強い相関を認めた(図 3)。これより、癌に対する hPSC の増殖活性能力は、hPSC の老化に伴う、SASP(senescence associated secretory phenotype)が関与している可能性を考え、さらなる実験を行った。



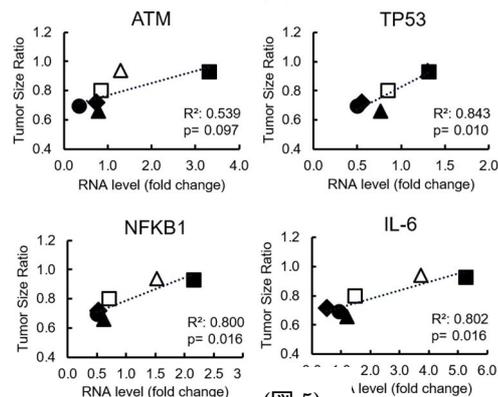
(図 3)

(2)hPSC における老化・SASP 関連遺伝子発現の検討

8 症例の hPSC に対して、SASP 因子に関連した PCR array を行った。実験は hPSC に対して血清刺激を加えた場合と加えない場合の 2 つの条件下で行い、結果は血清刺激なしのサンプルを基準とし、解析した。全 162 種の遺伝子のうち FIR と有意な相関を示したものは 38 個あり、TP53、NFKB1、CDKN2A(p16)、CDKN1A(p21)、ATM といった細胞老化経路に関わる遺伝子や IL1、IL6、CXCL12 などの SASP 因子として知られるサイトカイン、ケモカインが含まれていた(図 4)。次に上位 30 位までの遺伝子群から、細胞老化や SASP の関連を疑うことが客観的にも妥当であるかを検証するために、KEGG と Reactome のデータベースを用いて pathway 解析を行った。Cellular Senescence pathway は KEGG、Reactome いずれの database を用いた pathway enrichment analysis でも有意に濃縮され、Cellular Senescence pathway は KEGG の pathway analysis で第 3 位、Reactome の pathway analysis で第 5 位にランクインした。さらに、Reactome の pathway enrichment 解析では、"SASP" pathway も 6 位にランクインした。さらに、hPSC における老化・SASP 関連遺伝子の発現と、術前化学療法による腫瘍縮小率との関連を検討した(図 5)。TP53、NFKB1、IL-6 の RNA level は TTR と有意に相関しており、また ATM も相関傾向があった。



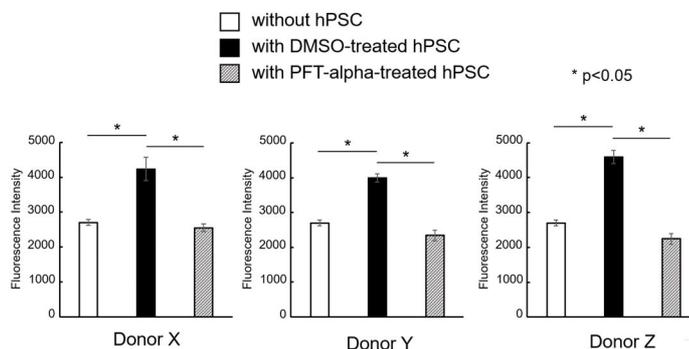
(図 4) pathway 解析を行った。



(図 5)

(3)p53 抑制による、膵癌細胞株増殖抑制効果

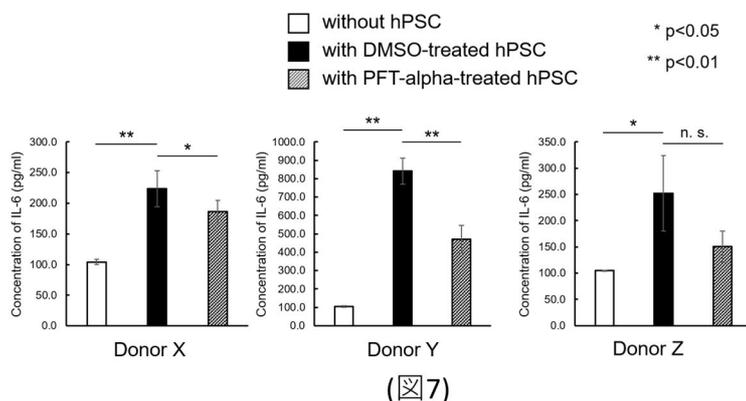
前項までの結果から、特に hPSC の p53 を介した細胞老化に着目し、p53 の阻害剤である pifithrin- で hPSC を処理することで、共培養時の膵癌細胞株の増殖がどのように変化するかを検証した。この実験では、hPSC を 10uM の濃度の pifithrin- ないし Control である DMSO に 5 日間暴露してから、共培養実験と同様に、それらと膵癌細胞株を共培養し、2 日後に Hoechst33342 で膵癌細胞株を染色し、EnSpire を用いてその蛍光強度を測定した。実験



(図 6)

は 3 症例の hPSC を使って検討した。まず、それぞれの hPSC は pifithrin に暴露して 5 日が経過しても、spindle like の形状を保っており、その Viability はいずれも 90%以上であることを確認した。その上で、Control である、DMSO 処理した hPSC を膵癌細胞株と共培養すると、膵癌細胞株を単独で培養した場合より、有意な蛍光強度の上昇が観察された。このことから、hPSC は 5 日間の DMSO 処理後においても、膵癌細胞株の増殖を増強させていることが示された。一方、

pifithrin- 処理した hPSC を共培養に用いると、膵癌細胞株の蛍光強度は、DMSO 処理した hPSC と共培養した場合に比べて有意に低下した。これらの現象は、3 種の hPSC 全てで同様に観察された(図 6)。さらに、この 2 日間の共培養後の培養上清中に含まれる IL-6 濃度を測定すると、DMSO 処理した hPSC を膵癌細胞株と共培養すると、膵癌細胞株を単独で培養した場合より、有意な IL-6 濃度の上昇が観察されたが、Pifithrin- 処理した hPSC を共培養に用いると、3 例中 2 例でその上昇幅が有意に減少した。1 例は、有意差は出なかったものの、Pifithrin- 処理により共培養上清中の IL-6 濃度低下を認めた(図 7)。これらの結果により pifithrin- 処理によって、hPSC の p53 を介した細胞老化が制御され、SASP 因子である IL-6 の分泌量が変化することで、膵癌細胞株の増殖が抑えられた可能性が示唆された。



考察

本研究では、膵癌において CAF の老化・SASP が膵癌の悪性度にどのように関与しているかについて検討した。まず、8 種類の初代培養した hPSC と膵癌細胞株を共培養し、hPSC の違いによって癌細胞の増殖速度に差があることを見出した。これは CAF の個体差が、膵癌そのものに影響を与えることを意味し、さらにチャンバーを用いての共培養であるため、CAF からの分泌物質が関与している可能性が高いと思われた。そこで、元々の患者の背景因子を調べ、CAF の悪性度と相関する因子を検討したところ、年齢との相関が認められたため、CAF の SASP が関与しているのではないかと考えた。実際 PCR array の結果では老化や SASP に関連する遺伝子の発現が、CAF の malignant potential と関係していることが分かった。本研究では、膵癌細胞株の増殖にとって重要だったのは、hPSC の遺伝子発現そのものではなく、血清刺激ありの時となしの変化の大きさであった。この結果については、近年注目を集めている p53 ダイナミクスのメカニズムの関与が考えられ、実際、p53 も SASP 因子として、今回の結果では有意差を認めており、p53 を阻害することで、IL-6 分泌が低下し、膵癌細胞株の増殖能が抑制されたことから、その関与が示唆された。今後、さらに CAF における p53 pathway がどのように癌の悪性度に関与しているかを in vitro で検証するとともに、臨床サンプルを用いてがん間質の細胞老化が与える影響について検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Mitsufuji Suguru, Iwagami Yoshifumi, Kobayashi Shogo, Sasaki Kazuki, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Akita Hirofumi, Asaoka Tadafumi, Noda Takehiro, Gotoh Kunihito, Takahashi Hidenori, Tanemura Masahiro, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Inhibition of Clusterin Represses Proliferation by Inducing Cellular Senescence in Pancreatic Cancer | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-022-11668-0 | 査読の有無 無 |
| 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 Yamada Daisaku, Kobayashi Shogo, Takahashi Hidenori, Yoshioka Teppei, Iwagami Yoshifumi, Tomimaru Yoshito, Shigekawa Minoru, Akita Hirofumi, Noda Takehiro, Asaoka Tadafumi, Gotoh Kunihito, Tanemura Masahiro, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Pancreatic CT density is an optimal imaging biomarker for earlier detection of malignancy in the pancreas with intraductal papillary mucinous neoplasm | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Pancreatology | 6. 最初と最後の頁 488 ~ 496 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pan.2022.03.016 | 査読の有無 無 |
| 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 Itoyama Saki, Noda Emika, Takamatsu Shinji, Kondo Jumpei, Kawaguchi Rui, Shimosaka Munefumi, Fukuoka Tomoya, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Tanemura Masahiro, Mitsufuji Suguru, Iwagami Yoshifumi, Akita Hirofumi, Tobe Toru, Kamada Yoshihiro, Eguchi Hidetoshi, Miyoshi Eiji | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Enterococcus spp. have higher fitness for survival, in a pH dependent manner, in pancreatic juice among duodenal bacterial flora | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 JGH Open | 6. 最初と最後の頁 85 ~ 90 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgh3.12703 | 査読の有無 無 |
| 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 Matsushita Katsunori, Kobayashi Shogo, Akita Hirofumi, Konno Masamitsu, Asai Ayumu, Noda Takehiro, Iwagami Yoshifumi, Asaoka Tadafumi, Gotoh Kunihiro, Mori Masaki, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi, Ishii Hideshi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Clinicopathological significance of MYL9 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cnr2.1582 | 査読の有無 無 |
| 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 Takada Ryoji, Ikezawa Kenji, Daiku Kazuma, Maeda Shingo, Abe Yutaro, Urabe Makiko, Kai Yugo, Yamai Takuo, Fukutake Nobuyasu, Nakabori Tasuku, Uehara Hiroyuki, Ashida Reiko, Akita Hirofumi, Takahashi Hidenori, Teshima Teruki, Ohkawa Kazuyoshi | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 The Survival Benefit of Chemoradiotherapy following Induction Chemotherapy with Gemcitabine Plus Nab-Paclitaxel for Unresectable Locally Advanced Pancreatic Cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 4733 ~ 4733 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13184733 | 査読の有無 無 |
| 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 Akita Hirofumi, Takahashi Hidenori, Eguchi Hidetoshi, Asukai Kei, Hasegawa Shinichiro, Wada Hiroshi, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Noda Takehiro, Gotoh Kunihiro, Kobayashi Shogo, Doki Yuichiro, Sakon Masato | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Difference between carbohydrate antigen 19 9 and fluorine 18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography in evaluating the treatment efficacy of neoadjuvant treatment in patients with resectable and borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma: Results of a dual center study | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery | 6. 最初と最後の頁 381 ~ 389 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12418 | 査読の有無 無 |
| 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 Tamura Takeshi, Kodama Takahiro, Sato Katsuhiko, Murai Kazuhiro, Yoshioka Teppei, Shigekawa Minoru, Yamada Ryoko, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Akita Hirofumi, Eguchi Hidetoshi, Johnson Randy L., Yokoi Hideki, Mukoyama Masashi, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo | 4. 巻 131 |
| 2. 論文標題 Dysregulation of PI3K and Hippo signaling pathways synergistically induces chronic pancreatitis via CTGF upregulation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI143414 | 査読の有無 無 |
| 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 Mori Soichiro, Akita Hirofumi, Kobayashi Shogo, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Noda Takehiro, Gotoh Kunihiro, Takeda Yutaka, Tanemura Masahiro, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi | 4. 巻 512 |
| 2. 論文標題 Inhibition of c-MET reverses radiation-induced malignant potential in pancreatic cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Letters | 6. 最初と最後の頁 51 ~ 59 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.04.029 | 査読の有無 無 |
| 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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 山本 拓也 (Yamamoto Takuya) (60752368) | 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 免疫老化プロジェクト・プロジェクトリーダー (84420) | |
| 研究分担者 | 東口 公哉 (Higashiguchi Masaya) (80804450) | 大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401) | |
| 研究分担者 | 江口 英利 (Eguchi Hidetoshi) (90542118) | 大阪大学・医学系研究科・教授 (14401) | |

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 |
|---------|---------|