

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07450

研究課題名(和文) 癌抑制性CAFに対する膵癌細胞の生存戦略の解明

研究課題名(英文) Mechanism for pancreatic cancer cell survival against restraining CAFs

研究代表者

加藤 琢哉 (Kato, Takuya)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00551970

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)：本研究では抑制性CAF存在下で効率よく増殖する癌細胞を選別し遺伝子発現変化を検討して抑制性CAFの影響を回避する機構の解明を目的とした。

膵癌細胞株Panc-1、Capan-2、MIAPaCa-2と、PSCおよび癌細胞増殖を抑制するMeflinを発現させたPSCとの三次元共培養系にて、それぞれの膵癌細胞の増殖PSCまたはPSC-Meflinに異なる反応を観察したことから、抑制性CAFの腫瘍増殖抑制能に対する感受性が細胞株ごとに異なることを見出した。MIAPaCa-2とPSC-Meflinの繰り返し共培養ではMIAPaCa-2の亜群に抑制性CAFを自身の増殖に利用するものが存在することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質成分の豊富な膵癌の治療には間質を標的とした治療が効果的と考えられるが、現在まで大きな成果を上げていない。その原因の一つが間質の構成成分である癌関連線維芽細胞(CAF)の多様性にあると考えられている。癌促進的なCAFだけでなく抑制的なCAFも混在していることで、単純に間質を標的として阻害することで治療効果を得ることを困難としている。癌抑制的なCAFについて得られている知識は限られており、その拡大が今後の膵癌治療に重要な進展をもたらすものと考えている。今回我々が確立した抑制性CAFの機能を解析する実験系は現在までに他に報告のない系であることから、今後の抑制性CAF研究に資するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the mechanism that avoids the influence of inhibitory CAF by selecting cancer cells that proliferate efficiently in the presence of inhibitory CAF and examining gene expression changes in those cells.

Pancreatic cancer cell lines Panc-1, Capan-2, MIAPaCa-2, and PSCs and PSCs expressing Meflin, which suppresses cancer cell proliferation, were cultured in a three-dimensional co-culture system. By observing differential responses to growth inhibitory CAF, we found that cell lines differed in their sensitivity to the ability of inhibitory CAFs to suppress tumor growth. Repeated co-cultures of MIAPaCa-2 and PSC-Meflin revealed that some MIAPaCa-2 subgroups utilize inhibitory CAFs for their own proliferation.

研究分野：癌細胞生物学

キーワード：膵癌 CAF

1. 研究開始当初の背景

癌組織は癌細胞以外にも線維芽細胞や免疫細胞、血管内皮細胞等の様々な細胞成分によって構成され、これらの細胞の相互作用がその癌を特徴づけていると考えられている。難治性の癌である膵癌組織では豊富な線維成分が癌細胞を取り囲む一方で、血管成分が疎らなために抗癌薬の癌細胞へのアクセスが妨げられ、高い治療抵抗性を示すことが知られている。このことから、膵癌では組織内の癌関連線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblast: CAF) がその悪性化に大きな役割を担うものと考えられ、新たな治療法開発の標的として期待されていた。しかしながら、近年、間質の細胞を選択的に除去した膵癌マウスモデルにおいて野生型と比較してより膵癌が進行することが確認された (Rhim AD., et al. Cancer Cell 2014; Biffi G., et al. Cancer Discov. 2018)。また、進行期膵癌に対する臨床試験において、膵癌間質の形成に重要なソニックヘッジホッグの阻害薬の投与が却って膵癌の進行を促したという報告もなされており (Neesse A., et al. Gut 2019)、膵癌間質に癌促進的な CAF のみならず、癌抑制的な CAF の存在を想定しなければ説明がつかないと考えられていた。このことは、単純に全ての CAF を標的とした治療を施しても効果を発揮しない可能性があることを示唆していた。そのため、効果的な治療法開発のためには、膵癌細胞が周囲の癌抑制性 CAF とどの様に相互作用しているのか、その分子メカニズムを明らかにすることで、癌抑制性 CAF の機能を阻害せずに癌促進性の CAF の影響を排除する方策を考える必要があった。

進行した膵癌では高度の線維化が見られるが、前癌病変においても既に線維化が始まっていることが病理医により観察されている。この線維成分により包囲された環境下では増殖のためのスペースが限られているため、何らかの遺伝子発現やシグナル、あるいは微小環境の変化無しには癌細胞はうまく増殖できないことが予想される。前癌病変においては間葉系幹細胞マーカーである Meflin を発現している膵星細胞 (Pancreatic Stellate Cell: PSC、膵癌における CAF の由来となる細胞) が癌抑制的に機能 (Mizutani Y., et al. Cancer Res 2019) すること、癌細胞を包囲する線維成分は CAF が産生することなどから、癌抑制性 CAF による抑制機構の一つは線維成分で増殖スペースを奪うことにあるのではないかと考えられた。我々の予備的実験では Meflin を発現させた CAF と膵癌細胞株との細胞外基質 (ECM) ゲル内での共培養にて、癌細胞の増殖性の低下が見られた。このことは線維成分による囲い込み以外にも癌抑制性 CAF による増殖抑制効果が存在することを示唆している。そのため、膵癌が進展する際には線維成分や癌抑制性 CAF によって囲まれた環境下で、膵癌細胞が抑制性 CAF の増殖抑制効果から逃れる機構が必要になると考えられる。この膵癌細胞が癌抑制性の CAF の影響から逃れる機構としては、抑制性 CAF を促進性に転換する、癌抑制性 CAF の影響を受けない様に膵癌細胞自身の性質が変化する、などの可能性が考えられる。そのうち、については TGF- などの液性因子の関与が明らかにされてきている。一方で、の可能性については現在のところ癌細胞のどのような変化が影響しているのか、我々の知る限りほとんど報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究では膵癌細胞 (あるいは膵癌前駆細胞) が抑制性 CAF の影響から逃れるために癌細胞自身に起きる変化を遺伝子発現を指標に検討し、その変化が癌の進展をもたらす分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

ECM ゲルを用いた 3 次元培養下で膵癌細胞と Meflin 陽性の癌抑制性 CAF (本研究では膵星細胞:PSC あるいは Meflin を発現させた PSC-Meflin+) の共培養を繰り返し、抑制性 CAF 存在下で増殖の促進される細胞を回収し、cDNA マイクロアレイで遺伝子発現変化やパスウェイの解析を行い、抑制性 CAF 存在下での効率的な増殖に必要な遺伝子やシグナル伝達経路を明らかにし、その作用機序の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) 膵癌細胞株と PSC あるいは PSC-Meflin+ の三次元共培養

ECM ゲル内における三次元共培養系にて種々の膵癌細胞株 (Capan-2, Panc-1 および MIA PaCa-2) と PSC あるいは PSC-Meflin+ を共培養し、膵癌細胞の増殖を検討した。その結果、Capan-2 は Meflin の多寡に関わらず PSC により、Panc-1 は Meflin を発現していない PSC によってのみ、MIA PaCa-2 は Meflin を発現させた PSC によってのみそれぞれ増殖が抑制されることを見出した (図 1)。このことから、PSC による癌細胞の抑制には Meflin に依存したものと、Meflin とは関係なく機能するものの複数が存在することが示唆され、癌細胞株によって、あるいは個々のがん患者によってそれらに対する抵抗のメカニズムが異なることも考えられる。

現在までのところ、マルチウェルプレートとチャンバーを用いた二次元培養系での膵癌細胞株と PSC, PSC-Meflin+ の共培養による膵癌細胞の増殖抑制は確認されていない。このことから、PSC, PSC-Meflin+ による癌細胞増殖抑制には ECM に囲まれた環境が必要なものと考えられる。

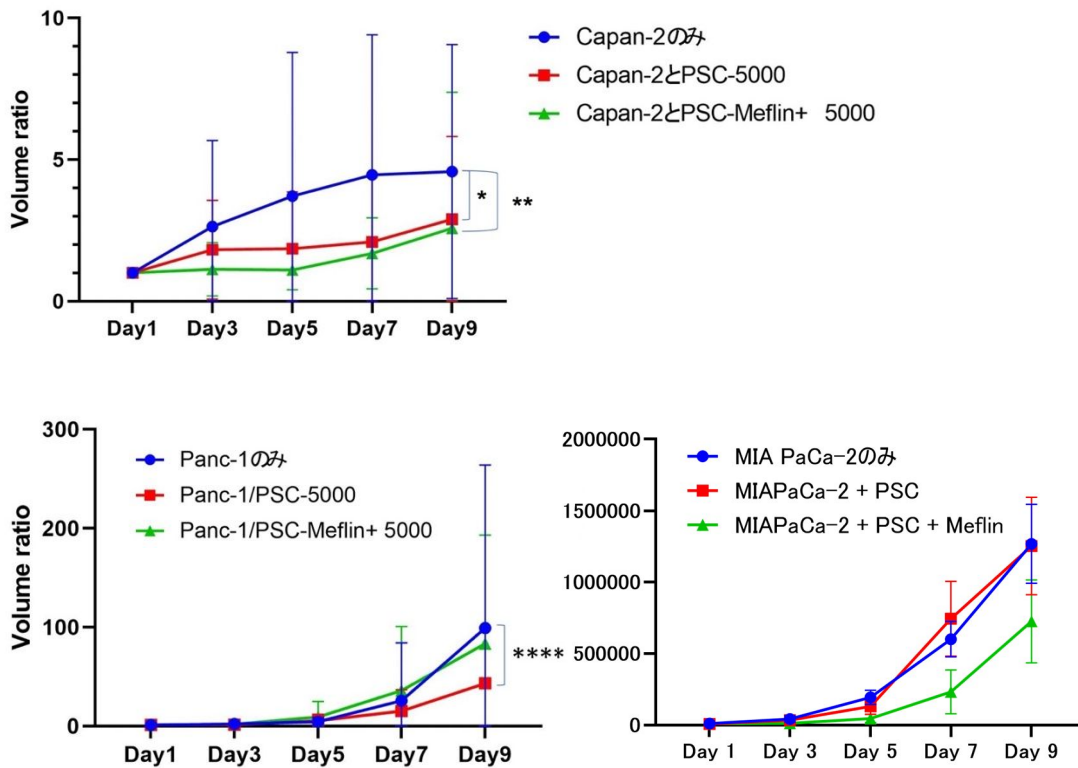


図1 Capan-2, Panc-1, MIA PaCa-2 と PSC, PSC-Meflin+の三次元共培養による増殖測定
Capan-2, Panc-1, MIA PaCa-2 (500細胞/ゲル)とPSC, PSC-Meflin+ (5000細胞/ゲル)をCollagen I/Matrigel 内にて9日間培養し、その体積をグラフ化した。

(2) 繰り返し三次元共培養による抑制性CAF抵抗性の膵癌細胞の獲得

PSC-Meflin+存在下で速い増殖を示すようなMIA PaCa-2は、抑制性CAFに抵抗性である可能性が高く、三次元共培養系で繰り返しPSC-Meflin+との共培養を繰り返すことで、そのような細胞の比率が高くなると考えられる。当初の目的に従って抑制性CAFに抵抗性を示して増殖する膵癌細胞を得るために、MIA PaCa-2とPSC-Meflin+の繰り返し共培養を行った。その結果、初回の共培養ではPSC-Meflin+により増殖の抑えられていたMIA PaCa-2が回を経るごとにMIA PaCa-2単独で培養したものより速い増殖を示すようになった(図2)。このことから、今回の実験で得たMIA PaCa-2の亜集団は抑制性CAFに抵抗性であるだけでなく、むしろ抑制性CAFを自らの増殖に利用可能な集団と捉えることができる。

今後は今回得られた亜集団と親株およびMIA PaCa-2単独で繰り返し培養を行なった細胞からRNAを抽出し、RNAシーケンシングにて網羅的な遺伝子発現解析を行う予定である。

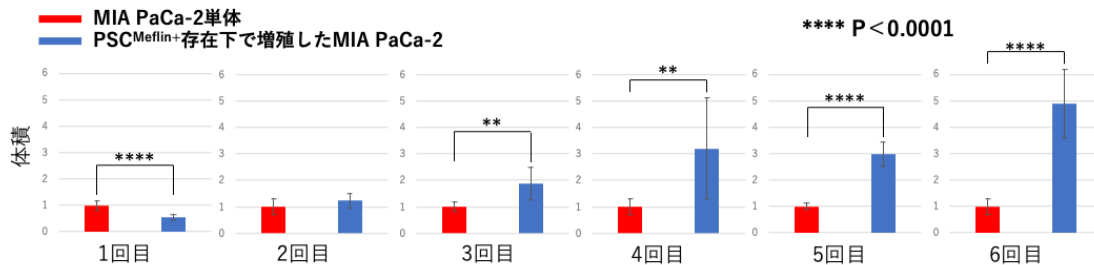


図1 MIA PaCa-2 と PSC-Meflin+の三次元共培養による増殖測定

MIA PaCa-2 (500細胞/ゲル)とPSC-Meflin+ (5000細胞/ゲル)をCollagen I/Matrigel 内にて9日間培養した後に癌細胞をゲルから回収し、新しいゲルにPSC-Meflin+ (5000細胞/ゲル)と移植して培養を繰り返した。各回の最終日の体積をグラフ化した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hoshino Akiyoshi, Nakayama Chika, Jiang Shi Xu, Sakurai Yasutaka, Kato Takuya, Numata Yoshiko, Umezawa Atsuko, Ichinoe Masaaki, Murakumo Yoshiki	4. 巻 72
2. 論文標題 Upregulation of REV7 correlates with progression of malignant melanoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 14 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13174	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 Tadehara Masayoshi, Kato Takuya, Adachi Kai, Tamaki Akihiro, Kesen Yurika, Sakurai Yasutaka, Ichinoe Masaaki, Koizumi Wasaburo, Murakumo Yoshiki	4. 巻 51
2. 論文標題 Clinicopathological Significance of BRCAness in Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Association With Anticancer Drug Sensitivity in Pancreatic Cancer Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 183 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001975	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 Conti Sefora, Kato Takuya, Park Danielle, Sahai Erik, Trepas Xavier, Labernadie Anna	4. 巻 2179
2. 論文標題 CAFs and Cancer Cells Co-Migration in 3D Spheroid Invasion Assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 243 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0779-4_19	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 該当する
1. 著者名 Arwert Esther N., Milford Emma L., Rullan Antonio, Derzsi Stefanie, Hooper Steven, Kato Takuya, Mansfield David, Melcher Alan, Harrington Kevin J., Sahai Erik	4. 巻 22
2. 論文標題 STING and IRF3 in stromal fibroblasts enable sensing of genomic stress in cancer cells to undermine oncolytic viral therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 758 ~ 766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-020-0527-7	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 該当する

1. 著者名 Sanoyama Itaru, Sakurai Yasutaka, Ichinoe Masaaki, Hoshino Akiyoshi, Kesen Yurika, Kato Takuya, Numata Yoshiko, Umezawa Atsuko, Jiang Shi Xu, Murakumo Yoshiki	4. 巻 71
2. 論文標題 Increased expression of REV7 in small cell lung carcinomas and its association with tumor cell survival and proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 15 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13040	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 Murakumo Yoshiki, Sakurai Yasutaka, Kato Takuya, Hashimoto Hiroshi, Ichinoe Masaaki	4. 巻 15
2. 論文標題 REV7 in Cancer Biology and Management	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1721 ~ 1721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15061721	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 Kato Takuya, Jenkins Robert P, Derzsi Stefanie, Tozluoglu Melda, Rullan Antonio, Hooper Steven, Chaleil Rapha?l AG, Joyce Holly, Fu Xiao, Thavaraj Selvam, Bates Paul A, Sahai Erik	4. 巻 12
2. 論文標題 Interplay of adherens junctions and matrix proteolysis determines the invasive pattern and growth of squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	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) 10.7554/eLife.76520	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
---------------------------	-----------------------	----

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