

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09057

研究課題名（和文）KPC confettiマウスがもたらす膵癌微小環境制御の新たな理解

研究課題名（英文）Exploring a new regulation system of pancreatic cancer microenvironment using KPC confetti mice

研究代表者

安井 隆晴（YASUI, Takaharu）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：60611283

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）：膵癌の予後不良の原因として肝転移がある。膵癌肝転移は悪性度が極めて高く、切除適応外で有効な治療法はない。膵癌細胞がランダムに蛍光発色するKPC Confettiマウスを用い極早期の転移機序を明らかにする。原発巣ではmulticolor癌細胞を同定したが転移巣では同定には至らなかった。そのため肝転移形成に関わる活性化肝星細胞に着目した転移解明を行った。先行研究にて同定した膵星細胞不活性化誘導候補薬剤を用いてスクリーニングを行った。複数の薬剤で肝星細胞における SMAの発現低下や脂肪滴蓄積が見られ、肝星細胞の活性化抑制が確認できた。肝星細胞を不活性化することで肝転移形成を抑制す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

微小転移モデルには細胞株の同所移植モデルが用いられてきたが、ヒト膵癌と相同性が低い問題があった。KPC Confettiマウスを用いることでヒト膵癌と病理学的類似性が高い腫瘍の極早期の微小転移を単細胞レベルで解析でき、微小転移に関わる細胞集団が同定できれば、癌細胞集団の特徴的や間質・免疫細胞の役割など今まで解明されていない分野への貢献も期待される。本研究により膵癌の微小転移のメカニズムが解明され新たな治療法の開発に至れば、難治性である膵癌の予後改善のみならず、他癌腫の転移メカニズム解析にも応用でき、学術的・社会的にも広範な波及効果が期待される為、癌研究分野において非常に意義が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In pancreatic cancer, liver metastasis is cause of poor prognosis. Liver metastases of pancreatic cancer are highly malignant and there is no effective treatment for them. We will clarify the mechanism of metastasis at very early stage using KPC Confetti mice, in which pancreatic cancer cells randomly fluoresce. We identified multicolor cancer cells in primary tumors, but not in metastases. Therefore, we focused on activated hepatic stellate cells, which are involved in the formation of hepatic metastasis, to elucidate the metastatic mechanism. We screened for candidate drugs that induce pancreatic stellate cells inactivation, which we had identified in a previous study. Several drugs showed decreased expression of SMA, the accumulation of lipid droplets in the hepatic stellate cells, and inhibited the activation of hepatic stellate cells. It was suggested that inactivation of hepatic stellate cells inhibits hepatic metastasis formation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌自然発生マウス 4色発現マウス 膵癌 微小環境 微小転移

1. 研究開始当初の背景

膵癌は5年生存率が8%と未だ非常に予後不良な最難治癌である。その原因は、転移を有した状態で初めて診断されることが多く、手術や放射線療法などの局所療法による根治が望めないことによる。更に全身療法である化学療法の効果も不十分である。膵癌の予後改善のためには、その死因の大部分を占める転移を早期に制御することが重要である。

癌の転移は、原発巣から癌細胞が遊離し周囲組織へ浸潤し血管内へ侵入、循環癌細胞となり体内を循環、遠隔臓器へ到達し、血管外へ遊出、遠隔臓器で定着し再増殖する、という過程を経て転移巣が形成されるといった複数の段階を経るとされるが、その機序は十分には解明されておらず、転移形成の各ステップに応じた更なる病態の理解が求められている。また、癌細胞が遠隔臓器へ到達し血管外へ遊出・生着していく段階で、シングルセルもしくはクラスター依存的に転移が成立するのか、また臓器特異的な微小環境のち外や微小転移関連因子の違いがあるのか、原発巣に存在する癌細胞が転移能を獲得していく過程としての clonal evolution のメカニズムなど不明な点が多い。

2. 研究の目的

原発巣の膵癌細胞や間質細胞を多色色素でラベリングし、その挙動を追跡することで、膵癌の発生から転移の各段階における微小環境の変化を明らかにする。さらに転移形成能の差による細胞集団の個別化を行い、高転移能を有する細胞集団に得的なマーカー同定を行い、細胞特異的な治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

ヒト膵癌と同様な病理学的特徴を有する膵癌自然発生マウス(KPC マウス)と multicolor に蛍光発色するマウス(Confetti マウス)とを交配し、KPC Confetti マウスを作製する。癌細胞が血管外へ遊出し標的臓器において定着・増殖、さらに微小転移から肉眼的転移に至るまでの転移形成過程を、単細胞レベルで蛍光発色する癌細胞を追跡評価することでシングルセルもしくはクラスター依存的な転移形成機序の違いや、臓器特異的な微小環境の違いなどに着目して検討する。

4. 研究成果

KPC マウス維持過程の産仔である Pdx-Cre マウスと Confetti マウスを交配し、Cre-Confetti マウスを作製した。次に、p53 ホモ欠損かつ Kras 変異をヘテロで有する KP マウスと Cre-Confetti マウスを交配し、KPC Confetti マウスを作製した。この KPC Confetti マウスはヒトに近い膵癌を自然発生する KPC マウスの特徴を持つとともに、膵癌細胞に random に multicolor に蛍光発色する特徴を持つ。実際に、マウスの膵原発腫瘍において、multicolor に蛍光発色する癌細胞を同定した(図 1)。しかしながら、微小転移巣における multicolor 膵癌細胞の同定には至らなかった。そのため、前肝転移ニッチ形成に関わる活性化肝星細胞に着目した遠隔転移解明を行うこととした。肝微小環境内の活性化肝星細胞を枯渇させると膵癌の肝転移巣が減少するとの報告もあることから、活性化肝星細胞を正常の線維芽細胞へリプログラミングすると肝微小環境が改変され肝転移の制御が可能になると考えられる。我々は、先行研究にて肝星細胞の活性化の抑制を脂肪滴の発現で表現できることに着目し、脂肪細胞蛍光染色キットである BODIPY を用いて、脂肪滴発現を数値化し、蛍光強度を指標とした化合物スクリーニングシステムを構築した。肝星細胞において同スクリーニングシステムで 4000 種類の薬剤化合物のスクリーニングを行い、肝星細胞の不活性化を誘導する複数の候補薬物をすでに同定していることから、膵癌肝転移におけるドライバー細胞である活性化肝星細胞においても同様に肝星細胞を不活性化する薬剤スクリーニングを行った(図 2)。肝星細胞の活性化を抑制すると脂肪滴が発現することから、スクリーニングシステムにより、脂肪滴発現を数値化し、HIT 薬剤を絞り込んだ。HIT 薬剤により肝星細胞の活性化が抑制されるかを in

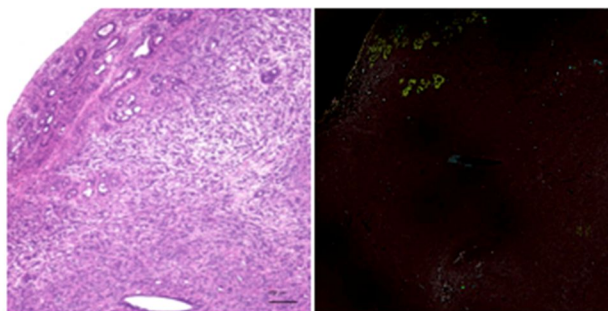


図1 KPC Confetti マウス膵原発腫瘍

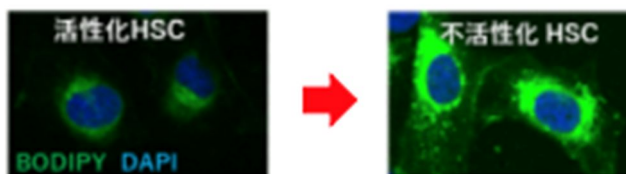


図2 膵癌細胞内の脂肪滴蓄積

vitro で評価したところ、 SMA やコラーゲンの発現低下や脂肪滴蓄積が見られ、肝星細胞の活性化抑制が確認できた。膵癌の肝転移において、前転移ニッチ形成に関わる活性化肝星細胞を不活性化することで、肝転移形成を抑制することが示唆された。

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 Fei Shuang, Ohuchida Kenoki, Kibe Shin, Yan Zilong, Iwamoto Chika, Shinkawa Tomohiko, Zhang Bo, Kawata Jun, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Involvement of angiogenesis in cancer-associated acinar-to-ductal metaplasia lesion of pancreatic cancer invasive front	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-022-04554-5	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 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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 持田郁己、大内田研宙、寅田信博、堤親範、中村祥一、久野恭子、奥田翔、新川智彦、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 シングルセル解析を用いた膵臓癌の間質相互作用による化学療法抵抗性機序の検討
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、井手野昇、水内祐介、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 異なる薬物治療反応性を示す微小環境因子依存性に基づいた新たな膵癌サブタイプ分類
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池永直樹、仲田興平、阿部俊也、井手野昇、水内祐介、大内田研宙、中村雅史
2. 発表標題 術前化学療法時代の膵がん術後早期再発因子の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsumoto S, Nakata K, Ikenaga N, Date S, Guan W, Sagara A, Ohuchida K, Ohtsuka T, Nakamura M
2. 発表標題 Efficient Targeted Therapy for Pancreatic Cancer Using Nanosystem and Focusing on the Suppression of Pancreatic Stellate Cell Activation
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 Iwamoto C, Ohuchida K, Shinkawa T, Otsubo Y, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Ohtsuka T, Nakamura M
2. 発表標題 Human macrophages-derived CAF-like cells lead the invasion of pancreatic cancer
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 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

〔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	木庭 遼 (Koba Ryo) (10866776)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	藤田 逸人 (FUJITA Hayato) (40611281)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	坂井 寛 (SAKAI Hiroshi) (80611665)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	富永 洋平 (Tominaga Yohei) (90304823)	宮崎大学・医学部・講師 (17601)	
研究分担者	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・医学研究院・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
---------	---------