

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16989

研究課題名（和文）立体培養法を用いた膵がん間質線維化における細胞とECMの異常配向獲得の機序解析

研究課題名（英文）The use of 3D cell culture to study the mechanisms underlying aberrant ECM remodeling in pancreatic cancer stroma

研究代表者

田中 啓祥（TANAKA, Hiroyoshi Y.）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：20781941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：難治である膵がんの特徴である「線維化」は、薬物送達に対する障壁となる。本研究は、膵がん線維化組織における線維芽細胞ならびに細胞外基質（ECM）線維の「異常配向」に着目し、そのメカニズム解明を通じ、新規標的化戦略を開発することを目的とした。本研究を通じ、従来の実験系では困難・不十分であった線維化の再現を可能とする立体培養モデルの構築に成功した。また、これら立体培養モデルの解析により、異常配向獲得に関わるシグナル伝達経路を同定した。さらに、こうしたシグナルの阻害が、線維化組織を介した薬物送達効率の改善につながることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんの5年生存率は約10%前後であり、他の悪性腫瘍と比べても予後が極めて悪い。早期発見が困難なのも一因であるが、膵がんは各モダリティの治療法に対し高い抵抗性を示す。膵がんの治療抵抗性獲得に、線維化が密接に関わるが、その治療的制御法は未確立である。本研究はこうした状況を打開すべく、線維化の特徴である「異常配向」に着目した解析を立体培養モデルにおいて実施し、異常配向獲得を司る分子メカニズムを解析し、さらにその標的化による薬物送達効率改善の可能性を示した。今後の動物モデル等における治療効果の検証実験を通じ、線維化制御を通じた膵がんの新規治療戦略の確立に資する知見を得た点に本研究の意義がある。

研究成果の概要（英文）：Fibrosis, a histopathological hallmark of pancreatic cancer, constitutes a barrier to drug delivery. The present research project was aimed at elucidating the mechanisms governing the generation of fibrotic barriers in pancreatic cancer to better inform the development of therapeutic strategies to overcome these barriers. The project focused on the abnormal orientation of fibroblasts and extracellular matrix (ECM) components in the fibrotic stroma of pancreatic cancer. In the project, a novel 3D in vitro model of the fibrotic pancreatic cancer stroma was successfully established. Through analyses of these models, the molecular mechanisms responsible for the abnormal orientation of fibroblasts/ECM were dissected. Furthermore, these pathways were found to be promising targets in augmenting drug delivery through fibrotic barriers.

研究分野：病態生理学

キーワード：膵がん 細胞外基質 線維化 立体培養法 線維芽細胞 薬物送達 間質 細胞外基質リモデリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵がんは、治療抵抗性が極めて高く、難治である。その理由として、膵がん微小環境における顕著な線維化組織の存在が挙げられる。線維化は、活性化し異常な形質を獲得した線維芽細胞と、これら細胞が産生分泌する多量の細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) 成分等によって構成される。こうした線維化組織が、腫瘍組織中への薬物送達の障壁となり、治療効果を減弱させることを代表者は報告してきた (J Control Release 2016;230:109-115, Adv Healthc Mater 2017;6:1700057, Cancer Sci 2018;109:2085-2092)。さらに、線維化組織中の異常 ECM 構築は、膵がん細胞の増殖・遊走や化学療法抵抗性の獲得を促進し、病態の進展に寄与するほか、抗腫瘍免疫に対する障壁となること等も近年判明している。ゆえに、生存期間中央値が未だ9カ月弱に留まる膵がん治療成績の改善には、間質線維化の治療的制御が必要であり、膵がん間質において線維化組織が形成・維持される機序の理解が欠かせない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵がん間質の線維化組織における ECM 線維の異常配向獲得の分子機序を解明し、治療的標的化法を探索することである。

線維化組織において、収縮力を獲得した筋線維芽細胞の異常集積と、これらの細胞が多量に分泌する Collagen I や Fibronectin 等の ECM 構成成分の沈着が認められることが古くより知られている。さらに、これらの線維芽細胞ならびに ECM 線維の配向が揃っていることが線維化の特徴である。正常組織のように線維芽細胞や ECM 線維がランダムに存在するのではなく、膵がんの線維化組織においてはこれらが互いに平行に存在する。こうした線維芽細胞や ECM 線維の「異常配向」が、腫瘍組織の硬化を惹き起こし、上述したような膵がんの病態進展等に寄与することが、近年の研究より明らかとなってきた。しかし、筋線維芽細胞ならびに Collagen I や Fibronectin 等の異なる ECM 線維は、どのような時間的な発展を経て、最終的に互いに平行に構築されるに至るのか。以上の機序を明らかにし、その標的化により薬物送達効率を改善しうるか明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、膵がん患者由来線維芽細胞を用いた独自の膵がん線維化組織の立体培養モデルを基盤とした解析を実施した。

既に代表者らは膵がん線維化組織の立体培養モデルにおいて、ヒト膵がん線維化組織において病理組織学的に認められる異常 ECM 構築を再現しうることを報告している (Tanaka HY et al. Biomaterials 2019;192:355-367)。線維化組織の立体培養モデルの薬理的阻害ないし siRNA によるノックダウンを行い、ECM 成分に対する蛍光免疫染色を施した後に、共焦点顕微鏡により取得した染色画像を利用した ECM 線維の配向の定量的解析を行い、異常 ECM 構築の機序の解析を行った。

また、異常 ECM 構築に関わる分子機序の標的化による薬物送達効率への影響の評価も行った。上述の立体培養モデルがカルチャーインサート内に構築されていることを利用し、立体培養モデル上部に各種サイズの蛍光標識高分子 (各種分子量の高分子デキストラン、IgG 抗体、アルブミン) を負荷し、一定時間経過後の下部ウェル中の蛍光強度を測定することで立体培養組織を通過した高分子量を算出した。

さらに、異常 ECM 構築に関わる線維芽細胞の異常形質獲得機序、特に腫瘍細胞との相互作用による線維芽細胞の活性化機序を解析すべく、上述の立体培養モデル (膵がん患者由来線維芽細胞のみによって構成される) に腫瘍細胞を加えた立体共培養モデルの構築を行った。立体共培養モデルにおいても、薬理的阻害、siRNA によるノックダウンを行った後に、線維芽細胞の活性化マーカー (-smooth muscle actin: SMA) 等に対する蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡により取得した染色画像の定量的解析を通じ、腫瘍細胞との相互作用による線維芽細胞の異常形質獲得の分子機序の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 異常 ECM 構築の機序の解析: Collagen I ならびに Fibronectin の異常配向獲得のタイムコースの解析を通じ、Fibronectin のほうが早いタイミングで異常配向を獲得し、その後 Collagen I が異常配向を獲得することを見出した。すなわち ECM 線維の異常配向獲得には時間的な前後関係が存在する。異常配向獲得に関わる分子機序を明らかにすべく、とりわけ細胞形態や細胞収縮力に関わる細胞内シグナルの阻害剤群を用いた小規模な薬理的スクリーニングを行ったところ、複数の GTPase やキナーゼなどの異常配向獲得への寄与が明らかとなった。興味深いことに、Fibronectin の異常配向獲得を抑制する阻害剤は、そのいずれもが Collagen I の異常配向獲得も抑制したが、一部阻害剤は Collagen I の異常配向獲得を抑制した (配向がランダム化した) が、Fibronectin の異常配向獲得は抑制しなかった。すなわち、Fibronectin ならびに Collagen I の異常配向獲得には単に時間的な前後関係が存在するのではなく、因果的關係

が存在することが示唆された (manuscript in preparation)。今後、Fibronectin の異常配向獲得に着目し、それが Collagen I の異常配向獲得へと情報伝達される分子機序を明らかにしていくべく、それぞれの ECM 構成要素の受容体に着目した解析を行っていく予定である。

(2) 異常 ECM 構築に関わる分子機序の標的化による薬物送達効率への影響の評価：異常 ECM 構築に関わる Rho-associated kinase (ROCK) の阻害による薬物送達効率への影響の評価を行った。ROCK の薬理的阻害は、各種高分子に対する線維化組織の透過性を改善した。さらに、ROCK には 2 つのアイソフォーム (ROCK1 と ROCK2) が存在するため、アイソフォーム特異的な siRNA を利用した相対的寄与度の解析も行った。その結果、両アイソフォームは少なくとも一部は non-overlapping な機能を有していることが見出された (manuscript in preparation)。ROCK に対しては、既に臨床的に用いられる阻害剤 (fasudil) が存在し、膵がんにおける薬物送達効率を改善する actionable な分子標的としての今後更なる評価を行う予定である。

さらに、上記 (1) より得られた、ECM 異常配向獲得に関わる細胞内シグナルについての知見を基に、これらエフェクター分子の阻害を通じた薬物送達効率改善の可能性の検証を進めた。一連の評価を通じ、異常 ECM 構築の標的化は薬物送達効率改善の有効な戦略でありうるということが示唆された。この可能性について、総説において論じた (Tanaka HY et al. Cancers 2023;15:724)。

(3) 異常 ECM 構築に関わる線維芽細胞の異常形質獲得機序の解析：膵がん微小環境において、線維芽細胞が膵がん細胞と相互作用することを通じ異常形質を獲得する (活性化する) 機序を解析すべく、線維芽細胞のみによって構成された従来の立体培養モデルに膵がん細胞を加えることを試みた。ヒト膵がんの病理組織学的解析を通じ、線維化組織が占める割合がおよそ 4-8 割であることから、この範囲で線維化組織の占有割合を制御可能とすべく、膵がん細胞を線維芽細胞に対して異なる比率で混合した立体共培養モデルを構築した。以上を通じ、線維化組織の占有割合を自在に制御可能な新規立体共培養モデルの確立に至った。

確立した立体共培養モデルを用い、線維芽細胞の異常形質獲得機序の解析も行った。これまでに YAP が、がんにおける線維芽細胞の異常形質獲得に重要であることが既報であった (Calvo F et al. Nat Cell Biol 2013;15:637-646)。実際、YAP の標的化により、本研究で確立した立体共培養モデルでも、線維芽細胞の異常形質 (SMA 発現) 獲得が抑制され、立体共培養モデルにおいて既知の病的シグナル伝達が再現されていることが明らかとなった。しかし、本研究ではさらに、正常線維芽細胞単独での立体培養モデル中 (腫瘍細胞非存在下) でも、膵がん細胞との立体共培養モデル中と同程度の YAP の核内局在が起こるものの、SMA の発現獲得には至らないことを見出した。すなわち、YAP の活性化は線維芽細胞の異常形質獲得に必要なが十分ではなかった。これに対し、SMAD2/3 は膵がん細胞との立体共培養モデル中においてのみ選択的に活性化すること、また YAP 阻害・ノックダウン時には SMAD2/3 の活性化に関わらず SMA 発現獲得が抑制された。以上を通じ、膵がん細胞との相互作用による線維芽細胞の転写調節因子 YAP ならびに転写因子 SMAD2/3 の協調的活性化が、膵がん線維芽細胞の異常形質獲得 (とりわけ SMA 発現に特徴づけられる異常収縮性の獲得) に必要であることを明らかにし、報告した (Tanaka HY et al. Biomaterials 2020;251:120077)。また上記研究を実例に、立体培養モデルを利用した疾患微小環境研究の可能性についての総説を発表した (Tanaka HY. Yakugaku Zasshi 2021;141:647-53)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tanaka Hiroyoshi Y.	4. 巻 141
2. 論文標題 Modeling and Analysis of Disease Microenvironments with 3D Cell Culture Technology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 647 ~ 653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.20-00219-4	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 Tanaka Hiroyoshi Y., Kano Mitsunobu R.	4. 巻 36
2. 論文標題 Fibrotic elements within the tumor microenvironment and its implications for nano-drug delivery systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 232 ~ 240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dd.36.232	査読の有無 無
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 Tanaka Hiroyoshi Y., Kurihara Tsuyoshi, Nakazawa Takuya, Matsusaki Michiya, Masamune Atsushi, Kano Mitsunobu R.	4. 巻 251
2. 論文標題 Heterotypic 3D pancreatic cancer model with tunable proportion of fibrotic elements	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120077 ~ 120077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2020.120077	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 Takashima Hiroki, Koga Yoshikatsu, Tsumura Ryo, Fuchigami Hirobumi, Matsumura Yasuhiro, Yasunaga Masahiro, Tanaka Hiroyoshi Y., Kurihara Tsuyoshi, Kano Mitsunobu R.	4. 巻 35
2. 論文標題 Selection of Tumor Models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 443 ~ 447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dd.35.443	査読の有無 無
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 Tanaka Hiroyoshi Y., Nakazawa Takuya, Enomoto Atsushi, Masamune Atsushi, Kano Mitsunobu R.	4. 巻 15
2. 論文標題 Therapeutic Strategies to Overcome Fibrotic Barriers to Nanomedicine in the Pancreatic Tumor Microenvironment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 724 ~ 724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15030724	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10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田中啓祥、狩野光伸
2. 発表標題 線維化量を制御可能なヒト膵がん微小環境の三次元培養モデルの確立・解析とナノDDS研究への応用
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyoshi Y. Tanaka, Mitsunobu R. Kano
2. 発表標題 Heterotypic 3D Cell Culture Model Of The Pancreatic Cancer Tumor Microenvironment With A Tunable Proportion Of Fibrotic Elements
3. 学会等名 EACR Goodbye Flat Biology: Next Generation Cancer Models (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中啓祥、狩野光伸
2. 発表標題 がん微小環境とイメージング
3. 学会等名 MRIコラボ・ワークショップ2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中澤拓也、田中啓祥、狩野光伸
2. 発表標題 三次元培養法による膵がん線維化組織のモデル化および筋線維芽細胞分化機序の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中啓祥，狩野光伸
2. 発表標題 膵臓がん線維化組織の3D培養モデルを利用したナノ薬剤送達効率の解析
3. 学会等名 第36回日本DDS学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中啓祥，正宗 淳，狩野光伸
2. 発表標題 Heterotypic 3D Culture Model of the Pancreatic Cancer Microenvironment with a Tunable Proportion of Fibrotic Elements
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 狩野光伸，田中啓祥
2. 発表標題 『三次元培養技術』を活用した線維化量調整可能な3D膵臓がんモデルの開発
3. 学会等名 BioJapan 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中啓祥、瀬野尾祐、狩野光伸
2. 発表標題 細胞外基質シグナリングの標的化により膵がん線維化障壁を克服するナノ薬剤送達戦略の開発
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中澤拓也、田中啓祥、狩野光伸
2. 発表標題 膵がん線維化障壁をマクロピノサイトーシス経路阻害により克服するナノ薬剤送達戦略の開発
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中啓祥
2. 発表標題 積層培養技術による膵がん微小環境研究への挑戦
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル研究会2022年度学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>EurekaAlert! Press Release https://www.eurekaalert.org/pub_releases/2020-07/ou-mam072220.php 膵臓がんで「線維化」が発生するメカニズムを解明 難治性がんの新たな治療戦略開発へつながる成果 https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id727.html OU-MRU vol. 80 https://www.okayama-u.ac.jp/up_load_files/ebulletin-RUs/pdf/vol80.pdf</p>
--

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