

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07099

研究課題名(和文)膵臓癌細胞の神経浸潤を再構築するオルガノイド培養法の確立に関する研究

研究課題名(英文) Establishment of organoid culture method to reconstruct neural invasion of pancreatic cancer cells

研究代表者

清水 一也 (Shimizu, Kazuya)

神戸大学・保健学研究科・保健学研究員

研究者番号：50335353

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)：全体構想は膵臓癌細胞の神経浸潤機構を明らかにして治療法を創出することである。膵臓がんは高率に神経浸潤を認めるが、手術では必ず遺残し局所再発が起こる。我々は抗がん剤耐性の膵臓癌患者からCD133陽性膵臓癌幹細胞株を樹立した。また、マウス膵臓組織幹細胞にがん遺伝子を導入してマウス人工膵臓癌細胞(親株)を作成した。本研究では、我々が樹立したヒト膵臓癌幹細胞株やマウス人工膵臓癌幹細胞株とマウス後根神経節とのオルガノイド培養モデルで神経浸潤を再構築することを目的とする。まず、神経マーカーを探索した。さらに、perineural invasionとintraneural invasionの存在を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんは臓器別死亡数の第4位にあり、早期診断が困難で予後不良の疾患である。神経に浸潤することがその特徴の一つとも言われ、手術では神経浸潤したがん細胞は必ず遺残する。予後を改善するためには神経浸潤の分子機構を明らかにして治療法を開発することが重要である。本研究では、我々が樹立したヒトやマウスの膵臓がん細胞由来を用いて、神経浸潤モデルを供出することを目的としている。そして、傍神経浸潤と神経内浸潤の存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The overall concept is to clarify the mechanism of neural invasion of pancreatic cancer cells and to create a therapeutic approach. Pancreatic cancer has a high rate of nerve invasion, which is invariably left behind by surgery and results in local recurrence. We have established a CD133-positive pancreatic cancer stem cell line from an anticancer drug-resistant pancreatic cancer patient. We also generated mouse artificial pancreatic cancer cells (parental line) by introducing oncogenes into mouse pancreatic tissue stem cells. In this study, we aim to reconstruct neural invasion in an organoid culture model between our established (1) human pancreatic cancer stem cell line and (2) mouse artificial pancreatic cancer stem cell line and mouse dorsal root ganglia. First, we searched for neural markers. Furthermore, we identified the presence of perineural and intraneural invasion.

研究分野：がんの細胞生物学

キーワード：膵臓がん 神経浸潤 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究の全体構想は膵癌細胞の神経浸潤の分子機構を明らかにして予後改善のための新規治療法を創出することである。膵癌は5年生存率が10%以下と予後不良の疾患である。膵癌は切除標本において高率に神経浸潤を認めることが特徴の一つでもあるが、術後のQOLを保持するために完全切除は不可能である。つまり、唯一の根治治療である手術では必ず膵癌細胞が遺残し、局所再発が起こる。このことが、膵癌の予後を改善できない壁となっている。膵癌の神経浸潤に焦点を絞った研究はほとんど見当たらない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに正常膵幹細胞と高悪性度のヒト膵癌細胞が幹細胞マーカー(CD133)を発現することを明らかにした(*Stem Cells* 2008; *Pancreas* 2009; *Pathobiology* 2011)。また、既存の抗がん剤 Gemcitabine(GEM)に耐性の膵癌患者から10種類のCD133陽性膵癌幹細胞株を樹立した(*PLoS One*, 2013)。一方、マウス膵臓組織幹細胞に Green Fluorescent Protein、変異型 KRAS^{G12D}、変異型 p53、cyclin dependent kinase 4 を遺伝子導入してマウス人工膵癌細胞(親株)を作成し、in vivo で親株由来腫瘍に GEM を長期投与することにより、耐性を獲得した腫瘍から GEM 耐性株を樹立した(投稿中)。本研究では、我々が樹立したヒト膵癌幹細胞株やマウス人工膵癌幹細胞株とマウス後根神経節とのオルガノイド培養モデルで神経浸潤を再構築し、新規治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵臓がんの神経浸潤の解析

膵臓癌の手術標本を用いて、免疫染色法で膵内神経節や腹腔神経節などの神経マーカーを探索した。

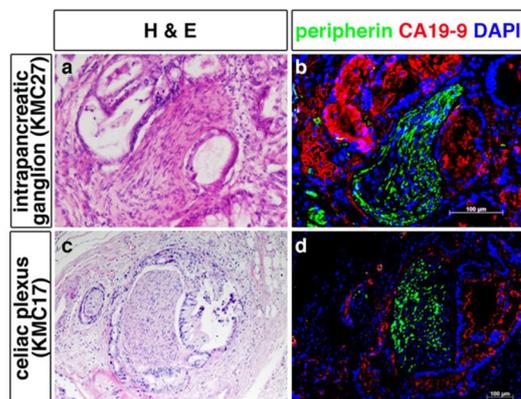
(2) ヒト膵癌幹細胞腫瘍片の同所性移植マウスモデルでの神経浸潤の検討

従来から多用される同所性膵癌細胞移植法に対して、より aggressive な表現型(高転移能・神経浸潤能)を再現する目的で、同所性膵癌腫瘍片移植法を開発する。

(3) in vitro での神経浸潤モデルの構築

膵内神経の代用として、マウスの後根神経節(dorsal root ganglion: DRG)を使用した。

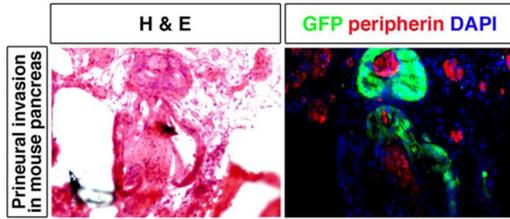
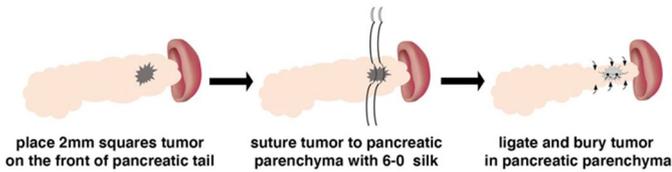
4. 研究成果



(1) ヒト膵臓がんの神経浸潤の解析

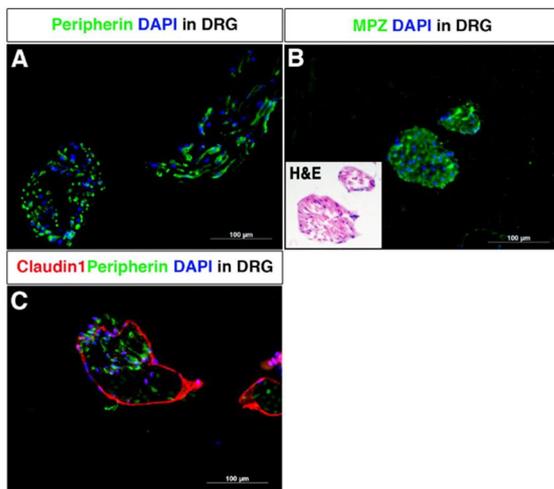
膵臓がんの神経浸潤患者の切除標本を使って膵臓がんの神経浸潤患者の切除標本を使って CA19-9 (膵癌細胞マーカー)との蛍光二重染色により、末梢神経に特徴的なマーカーを探索し、膵癌細胞浸潤を認める膵内神経節や腹腔神経節で peripherin と myelin protein zero が陽性となることを見出した。

(2) ヒト膵癌幹細胞腫瘍片の同所性移植マウスモデルでの神経浸潤の検討

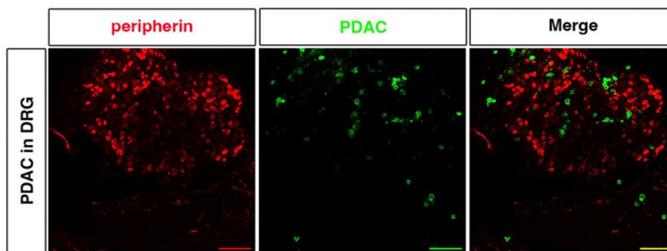


ヒト膵癌幹細胞株を使いヌードマウスに移植したこのモデルでは有意に転移能が亢進し、一部のマウスで膵内神経浸潤も認められた。さらに、この新規モデルでは膵癌などの腺癌に特徴的な凝固能亢進も認められたことから、臨床例に近いマウスモデルが確立されたと考えられる(投稿中)。

(3) in vitro での神経浸潤モデルの構築



野生型マウスより分離した DRG の免疫染色の結果、膵内神経同様に、peripherin と myelin protein zero が陽性であることが判明した。また、神経周膜が claudin1 陽性であることも明らかにした。この DRG とヒト膵癌細胞株をさまざまな方法で共培養する系を検討したところ、ヒト膵癌症例で観察される perineural invasion に近いモデルの確立にも成功している。しかし、これまでのところ、神経周膜を超えて神経内への浸潤(intraneural invasion)に関しては観察されていない。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Kimoto Ai, Kadoi Yusuke, Tsuruda Taisei, Kim Yong-Sik, Miyoshi Makoto, Nomoto Yuna, Nakata Yuna, Miyake Mutsumi, Miyashita Kumiko, Shimizu Kazuya, Ajiki Tetsuo, Hori Yuichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Exosomes in ascites from patients with human pancreatic cancer enhance remote metastasis partially through endothelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pancreatology	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） 10.1016/j.pan.2023.04.002	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 Nakayama F, Miyoshi M, Kimoto A, Kawano A, Miyashita K, Kamoshida S, Shimizu K, Hori Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Pancreatic cancer cell-derived exosomes induce epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells themselves partially via transforming growth factor 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	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） 10.1007/s00795-022-00321-0	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 Miyoshi M, Kadoguchi H, Usami M, Hori Y	4. 巻 67
2. 論文標題 Synbiotics Improved Stool Form via Changes in the Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Hemodialysis Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kobe Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 E112-E118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Miyashita K, Miyoshi M, Kimoto A, Ohnaga T, Shimizu K, Hori Y
2. 発表標題 Monoamine oxidase B inhibitor has anti-tumor effect on gemcitabine-resistant human pancreatic cancer
3. 学会等名 International Association of Pancreatology（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyoshi M, Kimoto A, Ohnaga T, Miyashita K, Shimizu K, Hori Y
2. 発表標題 Pancreatic cancer cell-derived exosomes induce epithelial mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells themselves
3. 学会等名 International Association of Pancreatology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木本愛、三好真琴、宮下久美子、大永智貴、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは膵癌細胞自身の上皮間葉転換を誘導する
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木本愛、三好真琴、大永智貴、宮下久美子、後藤百香、三宅睦、中田裕菜、野元優奈、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 膵臓がん細胞由来のエクソソームはヒト膵臓がん細胞自身の上皮間葉転換を誘導する
3. 学会等名 第54回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大永智貴、三好真琴、木本愛、宮下久美子、三宅睦、中田裕菜、野元優奈、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌患者由来腫瘍片の同所性異種移植モデルは遠隔転移とがん関連凝固異常を再現できる
3. 学会等名 第54回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大永智貴、渡邊ありさ、三好真琴、宮下久美子、後藤百香、中山郁也、河野朱莉、前谷織江、木本愛、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌患者由来腫瘍片の同所性異種移植は遠隔転移とがん関連凝固異常を再現できる
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木本愛、中山郁也、三好真琴、宮下久美子、後藤百香、河野朱莉、前谷織江、渡邊ありさ、大永智貴、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 膵臓がん細胞由来のエクソソームは自身の上皮間葉転換を誘発する
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyashita K, Miyoshi M, Shimizu K, Kawano A, Hori Y
2. 発表標題 Patient-derived orthotopic pancreatic cancer tissue xenografts recapitulate remote metastasis and cancer-associated hypercoagulation
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyashita K, Miyoshi M, Kimoto A, Ohnaga T, Shimizu K, Hori Y
2. 発表標題 Patient-derived orthotopic pancreatic cancer tissue xenografts recapitulate remote metastasis and cancer-associated hypercoagulation
3. 学会等名 American pancreatic Association
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyoshi M, Miyashita K, Kimoto A, Ohnaga T, Shimizu K, Hori Y
2. 発表標題 Pancreatic cancer cell-derived exosomes induce their own epithelial-mesenchymal transition
3. 学会等名 American pancreatic Association
4. 発表年 2021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	三好 真琴 (Miyoshi Makoto) (50433389)	神戸大学・保健学研究科・講師 (14501)	
研究分担者	堀 裕一 (Hori Yuichi) (80248004)	神戸大学・保健学研究科・教授 (14501)	
研究分担者	味木 徹夫 (Ajiki Tetsuo) (80379403)	神戸大学・医学部附属病院国際がん医療・研究センター・教授 (14501)	

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