

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15434

研究課題名（和文）in vitro細胞共培養系によるヒト膵がん細胞-ヒト膵臓星細胞間相互作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of human pancreatic cancer cell-human pancreatic stellate cell interaction by in vitro cell co-culture system

研究代表者

米谷 達哉（KOMETANI, Tatsuya）

東京農業大学・応用生物科学部・研究員

研究者番号：40915196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はヒト膵がん細胞 - ヒト星細胞間相互作用の解明を目的に実施した。まず、当細胞間相互作用を高度にin vitroで解析可能な細胞共培養系の開発を試みた。そして、我々はin vitroで膵がん組織の組織学的特徴を複数有する細胞共培養体の作製に成功した。即ち、新規細胞共培養系の開発に成功した。加えて、本細胞共培養系はヒト膵がん細胞 - ヒト星細胞間相互作用を反映し、静止期ヒト星細胞はヒト膵がん細胞の増殖を、活性化ヒト星細胞は薬剤耐性を促進することも示唆された。しかし、膵がん臨床検体間で当細胞間相互作用メカニズムが異なることも示唆され、現在は多様性が発生する前の初期膵がんに焦点を当て研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vivoでは様々な細胞が相互作用し、その社会を形成している。しかし、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究で開発した細胞共培養系は、それらの膵がん以外の分野の細胞間相互作用研究に応用できる可能性を秘める。また、本細胞共培養系はヒト膵がん細胞の検体間の形質の違いを反映したことから、個別化医療への応用も期待できると考えている。一方で、本研究で見出した形態別にヒト星細胞がヒト膵がん細胞に与える影響は新規であり、それをin vitroで証明したことも踏まえ、本研究は大きな学術的意義を有する。本研究の技術や成果、更なる発展が膵がんの新規治療法の開発に寄与することを期待する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify a mechanism of interaction between human pancreatic duct cancer cells and human stellate cells. Firstly, we attempted to establish a co-culture system that allows to analyze the interaction in detail in vitro. Then, we successfully developed a novel co-culture system that mimics some histological features of pancreatic cancer tissue. In addition, we demonstrated that our co-culture system reflects the interaction, showing that human quiescent stellate cells or human activated stellate cells promote the growth or drug resistance of human pancreatic duct cells. On the other hand, it was suggested that the interaction mechanisms differ among pancreatic cancer clones. Therefore, we are currently focusing on early pancreatic cancer before the variations arises.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膵がん がん微小環境 細胞間相互作用 in vitro細胞共培養系 膵がんオルガノイド 膵臓星細胞

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において、膵臓がん(以下膵がん)はがんの中で死亡率が4番目に高く、5年相対生存率は9%であり、予後の非常に悪いがんである(国立がん研究センター)。その要因として、膵がんの「高い転移性」や「腫瘍微小環境に起因する化学療法への抵抗性」等が挙げられる。

膵がん腫瘍微小環境は膵がん細胞以外に間質細胞や、細胞外基質により構成される。膵臓星細胞(以下星細胞)は間質細胞の1種であり、膵がんの予後不良の原因の1つである腫瘍微小環境の線維化には特にその星細胞の活性化が関与する。その活性化は、膵がん細胞の接触により促進され、一方で、星細胞は膵がん細胞に接触し、その細胞増殖を促進すると考えられている。即ち、膵がん細胞と星細胞の細胞間相互作用が膵がん組織の線維化や膵がん進行を促進すると考えられている。従って、膵がんの治療法として、その細胞間相互作用を標的とすることが効果的であるとえられる。しかしながら、過去の研究は主にマウス実験により行われていたため、「マウス生体内の複雑さに起因し、結果の解釈が難しいこと」や「ヒトを対象にできないこと」等の課題があった。また、組織から単離した星細胞を用いた *in vitro* 解析では、「活性化型と非活性化型の星細胞が混在している」等の課題があった。それらのため、ヒト膵がん細胞-ヒト星細胞間相互作用やヒト膵がん進展の詳細メカニズムは不明であった。故に、ヒト膵がん治療への応用に至らないのが現状である。

### 2. 研究の目的

以上の背景より、ヒト膵がんの治療標的を膵がん細胞-膵臓星細胞間相互作用とすることは有効であると考え、「ヒト膵がんにおけるヒト膵がん細胞-ヒト星細胞間相互作用メカニズムの解明」を本研究の大きな目的とした。

その詳細メカニズム解明には、前述にある動物実験の課題を解決する必要があった。そこで、ヒト膵がん細胞-ヒト星細胞間のみ相互作用を、*in vitro* において高度に解析可能な細胞共培養系を新規に開発し、上記メカニズム解析に応用することとした。故に、本研究の第一目的を「ヒト膵がん腫瘍微小環境を模倣するヒト膵がん細胞-ヒト星細胞共培養系の開発」とした。

以上を目的に本研究を実施した。

### 3. 研究の方法

本研究はまず、「ヒト膵がん腫瘍微小環境を模倣するヒト膵がん細胞-ヒト星細胞共培養系を開発」し、次に「本細胞共培養系の薬剤試験への応用性を検証」を行った。その後、「ヒト膵がん細胞-ヒト星細胞種間の相互作用メカニズムの解析」を行なった。

#### 3.- ヒト膵がん腫瘍微小環境を模倣するヒト膵がん細胞-ヒト星細胞共培養系の開発

過去の研究において、細胞間相互作用を研究する場合、主に *in vivo* 動物実験、特にマウス実験が用いられてきた。しかし、*in vivo* 環境では個体レベルを対象とできる反面、その環境のファクターの多さに起因する複雑さのため、研究結果の解釈が難しくなり、詳細なメカニズム解明が困難である。一方で、より単純に細胞間相互作用メカニズムを解明するため、*in vitro* スフェロイド共培養等がしばしば行われるが、こちらでは *in vivo* 環境からかけ離れた条件となり、正確な同メカニズムの解析ができない課題がある。

これらを踏まえ、本研究では *in vitro* で高度に細胞間相互作用を解析可能な細胞共培養系を開発することとし、研究材料には臨床検体由来ヒト膵がんオルガノイドとヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)由来ヒト星細胞を選択した。前者を使用するメリットは、「従来のがん細胞株を使用するよりも由来組織の形質を維持した状態で検証できること」である。また後者のメリットついて、hiPSC からヒト星細胞を作製することで、非活性化型(静止期)と活性化型を別々に、かつ安定的に供給できる。そうすることで、組織から単離することと比較し、供給時に発生する不安定性を改善し、かつヒト星細胞を静止期と活性化の二つに分け、解析することを可能にした。これらの細胞を混合し、気液界面培養(*air-liquid interface culture*: ALI 培養)条件下で共培養を行った。以上の手法で、細胞共培養系の開発を試みた。細胞共培養系の精度評価は、膵がん組織特有の膵がん細胞が形成する管腔構造や豊富な間質等の組織学的特徴を再現するか、また、細胞間相互作用を反映するかを検証することにより行なった。

#### 3.- 新規細胞共培養系の薬剤試験への応用性の検証

本細胞共培養系の培養スケールを 96well-plate スケールに縮小し、効率的な薬剤試験が可能か、その応用性を検証した。同時に共培養条件下におけるヒト膵がん細胞の抗がん剤耐性試験も同時に行なった。

#### 3.- ヒト膵がん細胞-ヒト星細胞間相互作用メカニズムの解明

当細胞間相互作用メカニズム解明のため、本共培養系で作製した共培養体から核抽出を行い、シングル核シーケンス解析を行なった。また、開発した細胞共培養系を用い、複数検体由来ヒト膵管オルガノイドにおけるヒト星細胞共培養条件下の細胞増殖試験を行うことにより、ヒト星細胞依存的なヒト膵がん細胞の増殖能の変化、つまり細胞間相互作用の一般性の検証を行なった。

#### 4. 研究成果

##### 4.-1 ヒト膵がん腫瘍微小環境を模倣するヒト膵がん細胞-ヒト星細胞共培養系の開発

所属研究室において、ヒト膵がんオルガノイドの樹立は既に完了していたため、hiPSC から静止期および活性化ヒト星細胞の作製を試みた。当分化誘導は、過去の報告に従い実施、各星細胞特異的な遺伝子発現が観察された。即ち、2種ヒト星細胞の作製に成功、安定供給を実現した。ヒト膵がんオルガノイド由来ヒト膵がん細胞と hiPSC 由来静止期ヒト星細胞、または活性化ヒト星細胞を混合、ALI 培養を行うことで、細胞共培養体の作製に成功した。その共培養体において、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色やPicroSirius Red 染色(コラーゲン染色)、免疫染色による組織学的解析を行なった。まず HE 染色の結果、活性化ヒト星細胞共培養条件において、膵がん組織に類似した膵がん細胞が形成する管腔構造、そして豊富な間質が観察され、静止期ヒト星細胞共培養条件下では観察されなかった。次に PicroSirius Red 染色の結果、活性化型ヒト星細胞共培養条件下において、静止期ヒト星細胞共培養条件と比較し、有意に高いコラーゲン蓄積が観察された。そして、免疫染色によりがん関連線維芽細胞マーカーである alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)や collagen 1 alpha 1 (Col1A1)の陽性細胞の分布を調べた結果、活性化ヒト星細胞共培養条件下において低頻度ではあるが観察され、静止期ヒト星細胞共培養条件下では観察されなかった。以上より、活性化ヒト星細胞共培養条件下において、膵がん組織の上記組織学的特徴を再現することが示唆された(図1A)。

一方で、本共培養系がヒト膵がん細胞-ヒト星細胞間相互作用を反映しているかを確認するため、共培養条件下におけるヒト膵がん細胞の細胞増殖検定を行なった。細胞増殖検定は、ヒト膵がん細胞に分泌型 NanoLuc を安定導入し、その培養上清中の NanoLuc を検出することで、間接的にヒト膵がん細胞数を定量した。その結果、ヒト膵がん細胞単独培養条件と比較し、活性化ヒト星細胞共培養条件ではわずかに、静止期ヒト星細胞共培養条件下では有意に細胞増殖率が上昇した。このことから、活性化ヒト星細胞よりも、静止期星細胞がより強くヒト膵がん細胞の細胞増殖を促進することが新規に示された(図1B)。また同時に、本共培養系はヒト膵がん細胞-ヒト星細胞間相互作用を反映することが示唆された。

##### 4.-2 新規細胞共培養系の薬剤試験への応用性の検証

次に、本細胞共培養系の薬剤試験への応用性を検証した。薬剤には、膵がん治療に広く使われる Gemcitabine を用いた。その検証結果、活性化星細胞共培養条件において、ヒト膵がん細胞の薬剤耐性が上昇していることが観察された(図1C)。つまり、活性化ヒト星細胞はヒト膵がん細胞の抗がん剤耐性を上昇させることが示唆された。以上より、本共培養系が薬剤試験へ応用可能であることが示された。

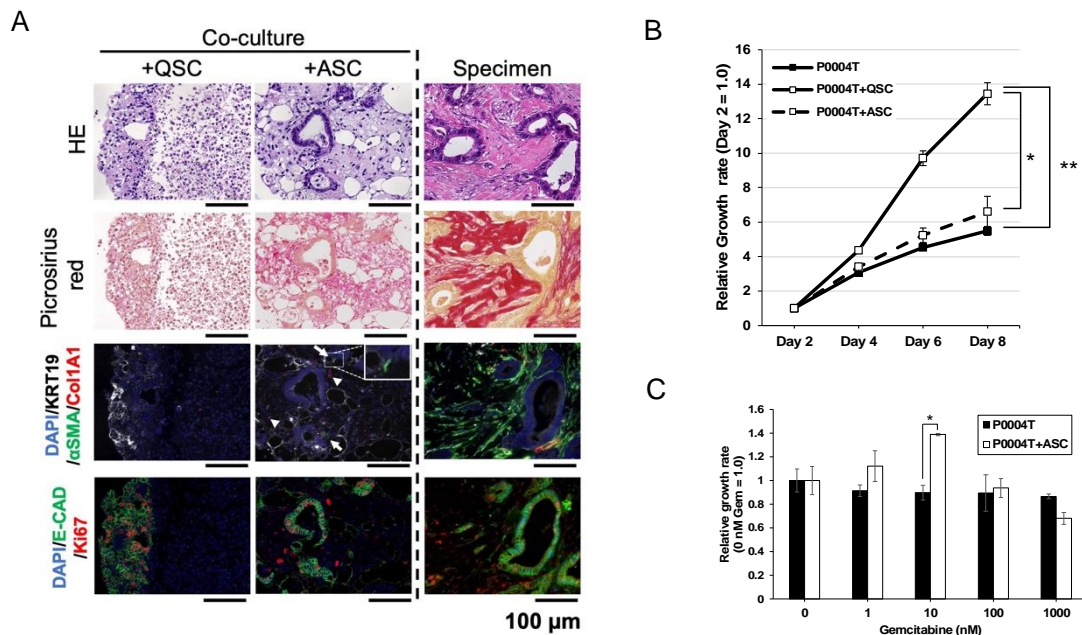


図1 新規細胞共培養系の開発

A: 細胞共培養体 (Co-culture) または臨床検体 (specimen) の組織的解析

+QSC: ヒト膵がん細胞と静止期ヒト星細胞、+ASC: ヒト膵がん細胞と活性化ヒト星細胞

B: 細胞共培養条件下におけるヒト膵がん細胞の細胞増殖試験

P0004T: ヒト膵がん臨床検体 No. 4

矢印:  $\alpha$ SMA 陽性細胞、矢頭: Col1A1 陽性細胞

C: 細胞共培養条件下におけるヒト膵がん細胞の薬剤試験

#### 4.- ヒト膵がん細胞-ヒト星細胞間相互作用メカニズムの解明

以上より、ヒト膵がん細胞に対し細胞間相互作用を介して、静止期星細胞は細胞増殖を、活性化ヒト星細胞は薬剤耐性を促進することが示唆された。この細胞間相互作用の詳細メカニズムを解明するため、細胞共培養体のシングル核シーケンス解析を実施した。そのデータを基に網羅的遺伝子発現解析、NitchNet 解析による活性化細胞間シグナル伝達経路の予測を行なった。その結果、シグナル伝達経路 A と B が活性化していることが予測され、遺伝子発現解析からその2シグナル伝達経路の下流遺伝子の発現上昇も確認された。そこで、シグナル伝達経路 A の阻害剤処理実験を行なった結果、活性化ヒト星細胞共培養条件下で阻害剤依存的に、ヒト膵がん細胞の増殖低下が観察されたが、その一方で、薬剤耐性に変化は観察されなかった。即ち、活性化ヒト星細胞はシグナル伝達経路 A を介して、ヒト膵がん細胞の増殖を促進していることが示唆された。シグナル伝達経路 B については未検証であるが、これまでの結果から薬剤耐性に寄与すると推測される。

また、以上の結果が広い膵がん患者で共通するのか解析するため、追加4臨床検体由来ヒト膵がんオルガノイドと1膵がん細胞株を用いて、臨床検体間の一般性について検証した。実際には、細胞共培養条件におけるヒト膵がん細胞の増殖を検証した。その結果、ヒト膵がん細胞のヒト星細胞依存的な細胞増殖の変化は臨床検体間で異なることが観察された(図2)。即ち、ヒト膵がん細胞-星細胞間相互作用は臨床検体間で大きく異なることが示唆され、それはヒト膵がん細胞に蓄積される遺伝子変異が異なることが原因であると推測された。

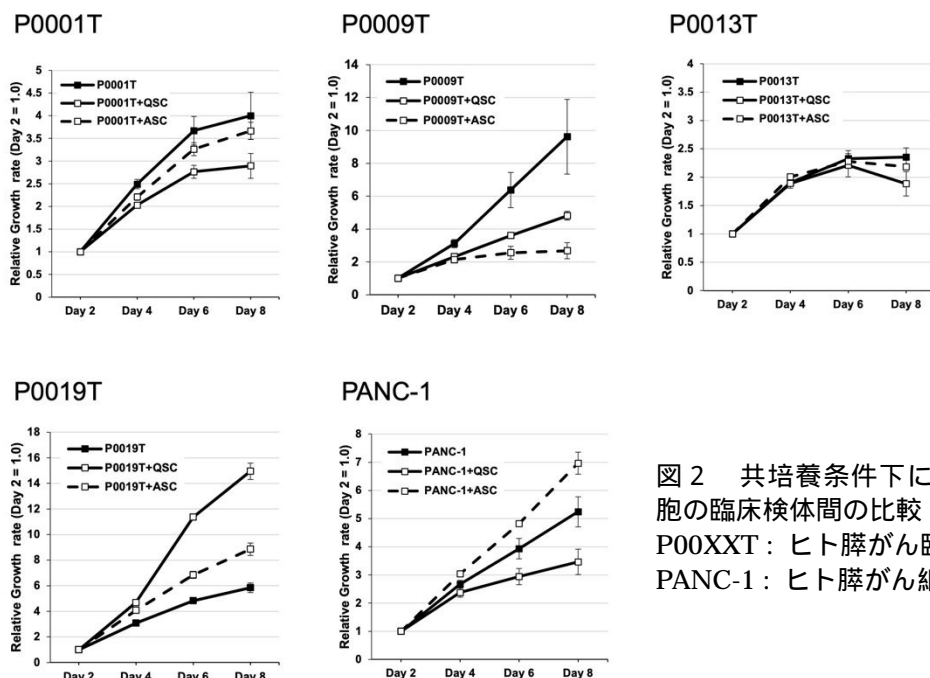


図2 共培養条件下におけるヒト膵細胞の臨床検体間の比較  
P00XXT: ヒト膵がん臨床検体 No. XX  
PANC-1: ヒト膵がん細胞株

#### 4.- ヒト初期膵がんオルガノイドモデルの作製

前述の結果から、臨床検体由来ヒト膵がん細胞(オルガノイド)を用いた研究は、個体別に膵がんの研究することを意味すると考えられた。そこで本研究では、より多くの患者に共通する知見を得るため、研究対象を臨床検体由来ヒト膵がん細胞から、遺伝子変異が蓄積する前のヒト初期膵がん細胞にシフトした。初期ヒト膵がん細胞は、正常ヒト膵管オルガノイドに遺伝子編集を施し、作製することとした。そのため、まず正常ヒト膵管オルガノイドの作製を試み、成功した。その後、正常ヒト膵管オルガノイドにおいて、遺伝子導入法の確立し、現在ヒト初期膵がんオルガノイドモデルを作製中である。

今後は作製したヒト初期膵がんオルガノイドと本細胞培養系を組み合わせることで、一般的に共通するヒト膵がん細胞-ヒト星細胞間相互作用メカニズム解明に努める。

以上を含めた研究成果を、国際雑誌1報、国内著書1件で報告し、また国内学会1件(ポスター発表+口頭発表)で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kometani Tatsuya, Kamo Koki, Kido Taketomo, Hiraoka Nobuyoshi, Chibazakura Taku, Unno Kenji, Sekine Keisuke	4. 巻 658
2. 論文標題 Development of a novel co-culture system using human pancreatic cancer cells and human iPSC-derived stellate cells to mimic the characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma in vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.03.061	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米谷 達哉, 加茂 皓基, 関根圭輔
2. 発表標題 膵がん組織を模倣する新規invitro細胞共培養系の開発
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 米谷 達哉	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 100
3. 書名 BIO Clinica 2023年 10月号 iPSC細胞を用いた疾患治療法の研究開発	

〔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
---------	---------