

令和4年度 TR 事業研究奨励助成金

研究成果報告書

令和5年 4月24日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 堀田 知 光 殿

報告者氏名： 米谷 達哉

研究課題：ヒト iPS 細胞由来ヒト膵臓星細胞を応用した膵がんの抗がん剤耐性獲得
メカニズムの解明
(テーマ) 難治性がんに関する研究

研究期間： 自 令和4年 4月 1日
至 令和5年 3月31日

研究指導者：氏名 関根 圭輔

公益財団法人 がん研究振興財団

(1) TR 若手研究者育成事業期間中の研究について

1) 要旨

膵臓がん（膵がん）は高い抗がん剤耐性を示し、それは膵がん微小環境の豊富な間質に起因すると考えられている。本研究課題では間質細胞の1種である膵臓星細胞（星細胞）に着目し、ヒト膵がん細胞－ヒト星細胞間相互作用を介した膵がん細胞抗がん剤耐性獲得メカニズムの解明を目的とした。始めに、ヒト膵がん細胞とヒト星細胞を用いて、*in vivo* 組織を再現する本研究独自の *in vitro* 細胞共培養系を開発した。そして、細胞共培養系を応用した抗がん剤試験を行った結果、活性化型ヒト星細胞共培養条件下においてヒト膵がん細胞の抗がん剤耐性が上昇することが確認された。さらに、作製した細胞共培養体をシングル核 RNA シーケンスに供した結果、大きく2つのシグナル経路が活性化していることが明らかになった。その後の解析より、片方のシグナル伝達を特異的に阻害する薬剤を添加した検証ではヒト膵がん細胞の抗がん剤耐性に変化が観察されなかったことから、他方の経路が当該抗がん剤耐性に深く関与することが示唆された。

2) 序

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%である（国立がん研究センター）。即ち、予後が非常に悪く、根治的治療が困難な疾患である。その要因は早期発見が困難であることや膵がんが「高い抗がん剤耐性」を有することであり、有効な抗がん剤が無い。したがって、膵がんの有効な治療には早期発見による根治的治療を増やすことや、効果的な抗がん剤の開発が強く求められている。

膵がんの抗がん剤耐性獲得には膵がん微小環境の豊富な間質とその線維化が深く関わると考えられている。膵がん微小環境には膵がん細胞以外に膵臓星細胞（以下星細胞）やその他の間質細胞、細胞外基質により構成される。膵がん微小環境の線維化には特に星細胞の活性化が関与し、それは膵がん細胞により促進される。一方で、星細胞の膵がん細胞への接触は膵がん細胞の増殖を促進すると言われている。即ち、膵がん細胞－星細胞間相互作用が膵がん微小環境の線維化や膵がん進行を促進すると考えられている。したがって、膵がんの治療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考えられる。しかしながら、それらに関する研究には主に動物実験が用いられてきたため、単純な膵がん細胞と星細胞の関係性の解析が難しく、その細胞間相互作用、線維化の詳細なメカニズムには不明な点が多い。また、ヒトに関する知見が少ないのが現状である。

そこで、本研究ではヒト膵がん細胞－ヒト星細胞間相互作用に着目し、その細胞間相互作用とヒト膵がん抗がん剤耐性獲得の関係性とそのメカニズムの解明を目的とした。また、本研究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（以下 iPSC）由来星細胞を使用した。がんオルガノイドは *in vitro* 3次元培養体であり、従来のがん細胞株よりも由来組織の遺伝子発現が保持するため、本研究に適材である。また、ヒト iPSC 由来星細胞を使用することで、組織から星細胞を供給時に生じる不安定性を改善し、安定的なヒト星細胞の使用を可能にした。

本研究では、始めに独自の *in vivo* 膵がん微小環境を再現する *in vitro* 細胞共培養系を開発し、*in vitro* においてより生理学的条件に近い細胞間相互作用の解析も可能にした。そして、その細胞共培養系により作製した組織様共培養体をシングル核 RNA シーケンスに供することで、膵がん細胞における星細胞共培養依存的な変動を示す遺伝子やシグナル伝達経路の探索を行った。そして、変動の大きいシグナル伝達経路を阻害し、膵がん細胞の抗がん剤耐性を検証することで、それらの関係性の解明を試みた。

3) 実験方法

I. 臨床検体由来ヒト膵がんオルガノイドの樹立

ヒト膵がんオルガノイド（以下ヒト膵がん細胞）は、国立がん研究センター中央病院（中央区、東京都）でインフォームドコンセントを受けた患者から切除された臨床検体から、既報（Cell Stem Cell 22 454-467.e6, 2018）に従い樹立、培養した。

II. ヒト iPSC 由来ヒト星細胞の作製

静止型及び活性化型ヒト星細胞は、TkDN4-M iPSC line から既報 (Stem Cell Rep. 16 3050-3063, 2021) に従い、分化誘導、作製した。

III. ヒト膵がん細胞ーヒト星細胞共培養

臨床検体由来ヒト膵がん細胞と iPSC 由来ヒト星細胞の共培養はそれぞれの細胞を混合し、気液界面培養条件下で行った。組織構造解析は共培養組織を 10%ホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切りし、作製した組織切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、PicroSirius Red 染色および免疫染色に供することで実施した。比較対象として、膵がんオルガノイドの作製元である臨床検体組織切片を使用した。抗がん剤試験は細胞共培養の規模を 96 well-plate スケールへ縮小することで効率的に行い、抗がん剤には膵がん治療に広く用いられる Gemcitabine を使用した。

IV. 細胞共培養体のシングル核 RNA シーケンス解析

ヒト膵がん細胞とヒト星細胞の共培養により作製した共培養体から核抽出を行い、10x Genomics chromium controller を用いて単一核由来の cDNA ライブラリーを作製した。シーケンス解析は Illumina に委託した。

V. データ解析

シーケンス解析から得られた fastq ファイルおよび Cell Ranger を用い、アライメントを行った。その後、統計解析プログラミング言語 R および Seurat によるシングル核遺伝子発現解析、NicheNet・Cellchat による活性化細胞間シグナル伝達経路の推測を行った。

4) 結果

① *in vivo* 膵がん組織を再現する *in vitro* 細胞共培養系の開発

過去の膵がん微小環境および細胞間相互作用に関する研究には、動物実験や単純なスフェロイド培養等の細胞共培養法が用いられていた。これらの実験系において、前者では *in vivo* 環境の複雑さにより結果の解釈が難しくなること、後者では *in vivo* 環境とはかけ離れてしまうことなどの課題点があった。そこで、本研究では始めに *in vivo* 膵がん組織をより再現する *in vitro* 細胞共培養系の開発を試みた。その方法には、過去の報告 (Front. Cell. Infect. Microbiol. 10 228, 2020) において肺や皮膚の組織を *in vitro* で再構成・模倣することに成功している気液界面培養法 (Air-liquid interface culture : 以下 ALI 培養) を選択した。細胞共培養系の開発するにあたりその評価基準として、第 1 に細胞共培養下においてヒト星細胞共培養依存的なヒト膵がん細胞の細胞増殖の変化、即ち「ヒト膵がん細胞ーヒト星細胞間相互作用」が示されるか。第 2 に細胞共培養体が膵がん組織構造の特徴である「膵がん細胞の管腔構造」、「膵がん微小環境のコラーゲン蓄積」、そして「 α smooth muscle actin (以下 α SMA : がん関連線維芽細胞マーカー) 陽性間質細胞の分布」を再現するかを検証した (図 1、2)。

静止型または活性化型ヒト星細胞共培養条件下における、ヒト膵がん細胞の増殖を観察した結果、膵がん細胞単独培養時と比較し、活性化型ヒト星細胞共培養下ではわずかに、静止型ヒト星細胞共培養下では有意に細胞増殖率が上昇した (図 1)。即ち、本細胞共培養系はヒト膵がん細胞ーヒト星細胞間相互作用を反映することが示された。

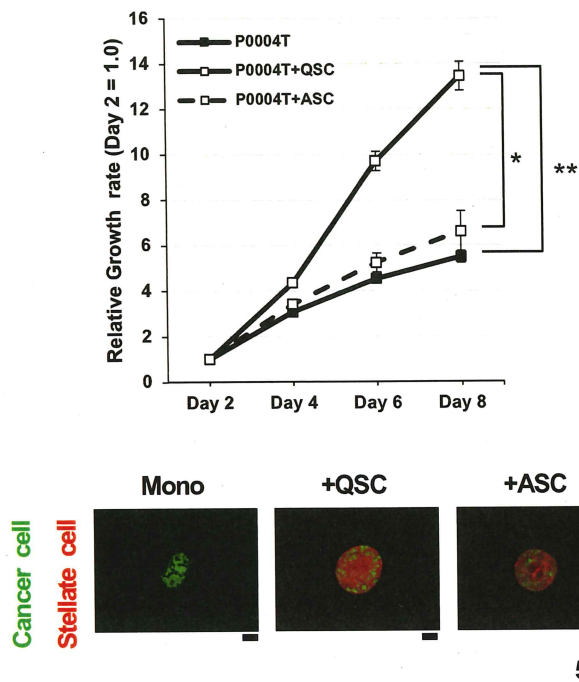


図1 ヒト膵がん細胞-ヒト星細胞共培養下におけるヒト膵がん細胞の増殖と様子

上：共培養条件下における膵がん細胞の増殖率
共培養開始後2日に1回ヒト膵がん細胞の細胞量を測定した。(Growth rate; Day 2 = 1.0)

(P0004T：ヒト膵がん細胞単独培養、P0004T+QSC：ヒト膵がん細胞-静止型ヒト星細胞共培養、P0004T+ASC：ヒト膵がん細胞-活性化型ヒト星細胞共培養)

下：共培養時の細胞の様子
共培養開始7日後の細胞を蛍光顕微鏡で撮影した。

(Mono：ヒト膵がん細胞(緑)単独培養、+QSC：ヒト膵がん細胞-静止型ヒト星細胞(赤)共培養、+ASC：ヒト膵がん細胞-活性化型ヒト星細胞(赤)共培養)

** 0.005 < p < 0.01, * 0.01 < p < 0.05

次に、細胞共培養系を組織切片が作製可能な規模に拡大し、作製した組織切片を用いて、各組織染色を行なった(図2)。1つ目にHE染色の結果、活性化型ヒト星細胞共培養条件下において、膵がん組織に類似した膵がん細胞の管腔構造が観察されたが、静止型ヒト星細胞共培養条件下では観察されなかった。2つ目にPicroSirius Red染色(コラーゲン染色)の結果、膵がん組織では高度なコラーゲン蓄積(赤色)が確認され、細胞共培養体では活性化型ヒト星細胞共培養条件下において、静止型ヒト星細胞共培養条件下と比較し有意に高いコラーゲン蓄積が観察された。3つ目に免疫染色の結果、αSMA陽性間質細胞の分布は膵がん組織では広範囲な分布が確認されたが、細胞共培養体において活性化型ヒト星細胞共培養条件下ではごく僅かだが確認され、静止型ヒト星細胞共培養条件下では観察されなかった。また、別のがん関連線維芽細胞マーカーであるcollagen 1 A lpha 1 (以下 Col1A1) も同様に観察したところ、膵がん組織と活性化型ヒト星細胞共培養条件下で低頻度に観察され、静止型ヒト星細胞共培養条件下では観察されなかった。これらのことから、ヒト膵がん細胞-活性化型ヒト星細胞共培養体が膵がん組織の膵がん管腔構造、コラーゲン蓄積、そして低頻度ではあるがαSMA および Col1A1 陽性細胞の分布を再現することが示唆された。

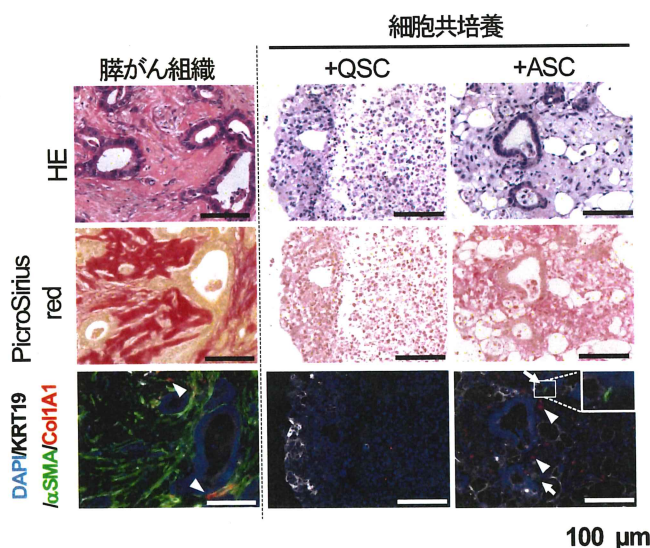


図2 各組織間における組織学的特徴の比較解析

臨床検体膵がん組織または共培養組織において、染色による組織学的特徴を観察した。

膵がん組織：臨床検体組織切片

+QSC：ヒト静止型星細胞共培養条件、+ASC：ヒト活性化型星細胞共培養条件

DAPI：核(青)、KRT19：cytokeratin 19 (白：上皮マーカー、膵がん細胞)

矢印、矢頭はαSMA、Col1A1を示す。(αSMA：緑、Col1A1：赤)

② *in vitro* 細胞共培養系を用いたヒト膵がん細胞の抗がん剤試験

さらに、当細胞共培養系の抗がん剤耐性試験への応用性の検証を行なった。ヒト膵がん細胞単独培養および活性化型ヒト膵がん細胞共培養条件に、抗がん剤 **Gemcitabine** を添加し、ヒト膵がん細胞の増殖を観察した（図3）。その結果、抗がん剤存在下におけるヒト膵がん細胞の増殖率は、単独培養時と比較し活性化型星細胞共培養時が有意に高いことが確認された。したがって、本細胞共培養系の抗がん剤試験への応用性が示され、さらに活性化型ヒト星細胞がヒト膵がん細胞の抗がん剤耐性を促進させることが示唆された。

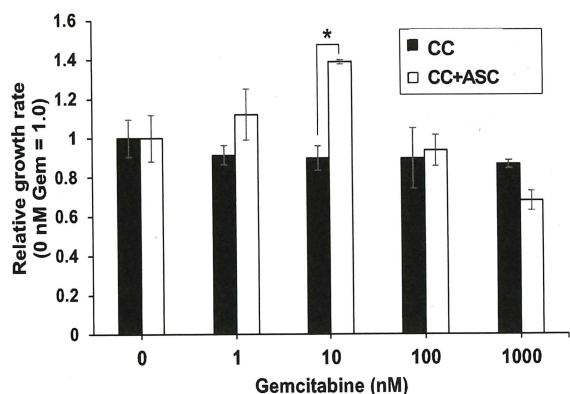


図3 共培養系における抗がん剤試験

ヒト膵がん細胞単独培養条件または活性化型ヒト星細胞共培養条件において、**Gemcitabine** 処理下のヒト膵がん細胞の増殖を測定した。

それぞれの増殖率は各条件の 0 nM **Gemcitabine** 条件の増殖率を 1.0 として算出。

CC：ヒト膵がん細胞単独培養

CC+ASC：ヒト活性化型星細胞共培養

* $0.01 < p < 0.05$

③ シングル核 RNA シーケンス解析による抗がん剤耐性関連遺伝子の探索

次に、活性化型ヒト星細胞共培養条件下におけるヒト膵がん細胞の特異的に発現上昇する遺伝子が、ヒト膵がん細胞の抗がん剤耐性に寄与すると予測した。そこで、作製した共培養体をシングル核 RNA シーケンス解析に供し、網羅的な遺伝子発現解析および NicheNet 解析による活性化細胞間シグナル伝達経路の予測を行った（図4）。

NicheNet 解析の結果、シグナル伝達 A と B が活性化していることが予測され、遺伝子発現解析の結果からその 2つの下流の遺伝子の発現上昇も確認された。

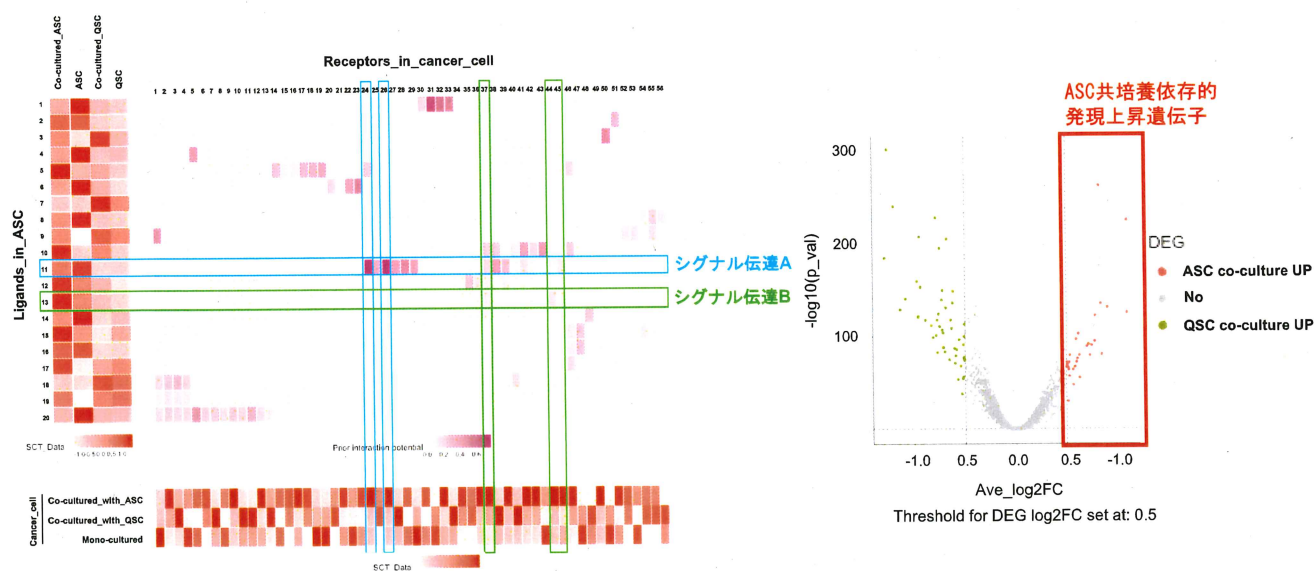


図4 共培養組織のシングル核シーケンス解析による活性化細胞間シグナル伝達系の予測と遺伝子発現解析

左：シングル核シーケンス解析のデータを基にした NicheNet 解析によるリガンド-受容体解析を行った。

右：同解析データを基にした共培養条件下におけるヒト膵がん細胞の遺伝子発現解析（Volcano plot）。

これらの結果を基に、シグナル伝達 A を阻害することで活性化型ヒト星細胞共培養条件下における、ヒト膵がん細胞の抗がん剤耐性が低下するか検証を行った。その結果、シグナル伝達 A の阻害依存的に活性化型ヒト星細胞共培養下のヒト膵がん細胞の有意な増殖率の低下は観察されたが、抗がん剤耐性に変化は観察されなかった。即ち、シグナル伝達 A は活性化型ヒト星細胞依存的なヒト膵がん細胞の増殖を促進するが、抗がん剤耐性には関与しないことが示唆された。

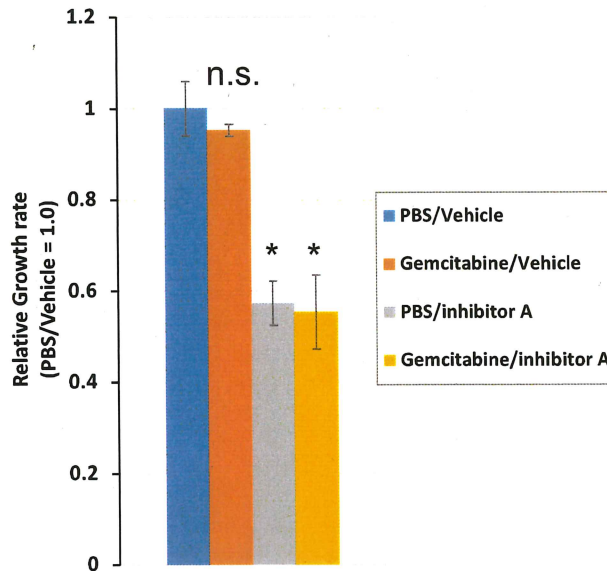


図4 活性化型ヒト星細胞共培養条件下におけるヒト膵がん細胞の抗がん剤試験

活性化型ヒト星細胞共培養条件下における、Gemcitabine およびシグナル経路 A 阻害剤 (inhibitor A) 処理下のヒト膵がん細胞の増殖を測定した。それぞれの増殖率は各条件の PBS/Vehicle 条件の増殖率を 1.0 として算出。

* $0.01 < p < 0.05$

5) 考察

① *in vivo* 膵がん組織を再現する *in vitro* 細胞共培養系の開発

本研究課題では、従来の *in vitro* 細胞共培養系および *in vivo* 動物実験の課題点を克服する膵がん微小環境を模倣する *in vitro* 細胞培養系を開発した。その実験系では、ヒト膵がん細胞-ヒト星細胞間相互作用が反映されることが示され、さらに膵がん組織特有の膵がん細胞管腔構造やコラーゲン蓄積、 α SMA/CollA1 陽性間質細胞の分布等の再現に成功した。即ち、膵がん組織のいくつかの特徴を模倣する *in vitro* 細胞共培養系の開発に成功したことが示唆された。これらのことから、本 *in vitro* 細胞共培養系は細胞間相互作用に留まらず、膵がん微小環境、さらにはがん微小環境においてがん関連線維芽細胞存在するその他のがん研究にも応用されることが期待される。また、本研究の結果から、静止型ヒト星細胞が活性化型ヒト星細胞よりもヒト膵がん細胞の増殖を促進する機能が強いことが示された。これに関しては過去に報告はなく新規な発見である。一方で、活性化型ヒト星細胞共培養条件において、上記の膵がん組織の特徴を示したことから、膵がん組織の構築には静止型よりも活性化型ヒト星細胞の方が強く寄与することが示唆される。しかしながら、活性化型ヒト星細胞共培養条件においても膵がん組織の α SMA 陽性間質細胞の高頻度な分布は示されなかった。これは、膵がん微小環境の α SMA 陽性細胞の主要な起源が星細胞ではなく、他の線維芽細胞等の細胞であることを示している可能性がある。これに関しては、今後の更なる追及が必要である。

② *in vitro* 細胞共培養系を用いたヒト膵がん細胞の抗がん剤試験

上記より、本研究課題で開発した *in vitro* 細胞共培養系の抗がん剤試験への応用性は示された。即ち、本実験系はがん細胞およびがん間質をターゲットとした、抗がん剤・化合物スクリーニングに応用可能である示唆される。しかし、ヒト膵がん細胞単独培養条件において、Gemcitabine の効果が単純な 2 次元培養の程には示さなかった。これは、当抗がん剤試験かつ単独培養条件下においてヒト膵がん細胞が殆ど増殖しないことが原因であると考えられる。即ち、抗がん剤試験を対象とした本実験系にはまだ改善の余地がある。

③ シングル核 RNA シーケンス解析による抗がん剤耐性関連遺伝子の探索

本細胞共培養系により作製した共培養体からシングル核シーケンス解析を行った。その結果から、正確に遺伝子発現解析が実施できたことから、本実験系がシングル核シーケンス解析へ応用可能であることが示された。①と同様に、本実験系とシングル核シーケンス解析は他のがんにおいても応用が可能であることが予測される。

シングル核シーケンス解析の結果から、ヒト膵がん細胞－活性化型ヒト星細胞間では大きく分け、2種の細胞間シグナル伝達経路が活性化していることが予測され、さらにその下流の遺伝子発現の上昇も確認された。本研究課題ではその2種のシグナル伝達経路の内、1種（シグナル伝達 A）の阻害検証を行った。その結果、活性化型ヒト星細胞共培養下でシグナル伝達 A 阻害依存的なヒト膵がん細胞の増殖抑制が観察されたが、抗がん剤に対する応答には変化は観察されなかった。このことから、活性化型ヒト星細胞によるヒト膵がん細胞の抗がん剤耐性促進には、シグナル伝達 A ではなく、シグナル伝達 B が関与することが予測される。シグナル伝達 B の活性化が抗がん剤耐性に与える影響に関しては未解析であるため、今後の課題である。また、遺伝子発現解析から抗がん剤耐性に寄与する可能性がある遺伝子も見つかっており、今後、分子遺伝学的手法による検証を行う予定である。

(2) 今回の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

まず、本研究課題で開発した細胞共培養系の星細胞以外の間質細胞へ応用性の検証する予定である。実際には、中皮細胞等のがん関連線維芽細胞の起源として考えられる細胞や免疫細胞を単独や混合条件において検証する。また、本細胞共培養系の抗がん剤試験にさらに適した方法に改善することも課題である。これらを踏まえ、本細胞共培養系にさらに改良し、細胞間相互作用やがんに関する研究に幅広く応用可能なツールになることを期待する。

また、本研究で得られたシングル核シーケンス解析とその後の検証から、シグナル伝達経路 B が活性化型ヒト星細胞依存的なヒト膵がん細胞の抗がん剤耐性に寄与する可能性が考えられるため、その関係性の解析を行う。それらメカニズムの解明を目指し、最終的にはヒト膵がん細胞－ヒト星細胞間相互作用を標的とした抗がん剤の開発に繋がりたいと考える。