



Title	膵管腺癌におけるマイクロ組織レベルの治療抵抗性ダイナミクス [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	太田, 悠介
Description	配架番号 : 2598
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14482号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81891
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Ohta_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 太田 悠介

学 位 論 文 題 名

膵管腺癌におけるマイクロ組織レベルの治療抵抗性ダイナミクス
(Chemoresistance dynamics at the microtissue-level in
pancreatic ductal adenocarcinoma)

【背景と目的】膵癌は約 90%が膵管上皮から発生、充実性腫瘤を形成して浸潤・転移が非常に起きやすい膵管腺癌（pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC）である。治療には、外科手術、化学療法、放射線療法等の集学的治療が不可欠であるが、治療成績の飛躍的な向上には至っていない。膵癌の発生極早期の段階において既に顕微鏡的マイクロレベルの潜在的な浸潤・播種・転移が起こっていると考えられているが、そのアグレッシブな癌生物学的腫瘍ダイナミクスについては、ほとんどわかっていない。上皮間葉転換（EMT）は癌の浸潤や転移に不可欠であるとされ、癌の悪性度の進行に必須であることが知られているが、最近、PDAC の腫瘍細胞の浸潤・転移には完全な EMT が必要ではないことが証明され、現在、PDAC の病態理解への根本的な変革が要求されている。当教室ではこれまでに、上皮系フィーダーとの共培養システムを用いて、癌細胞はフィーダーに接着して足場依存性多細胞凝集塊（anchorage-dependent multicellular aggregate, Ad-MCA）となり、癌幹細胞様の治療抵抗性を容易に獲得することを報告してきた。同様の現象は、EMT が誘導される前の上皮系形質を保った PDAC 細胞においても確認されている。そこで本研究では、EMT が誘導される前の適応度の低い癌細胞は、集団組織化することで、単独では達成し得ない強力な生存アドバンテージを獲得するとの仮説を立て、共培養システムや新規に開発した 3D 細胞組織培養デバイスであるマイクロ・ナノ基板を用いて、足場を獲得して細胞が集団組織化した膵癌微小腫瘍組織を対象に PDAC の治療抵抗性の本質に迫った。

【材料と方法】（第一章）単層培養した HEK293T 細胞に CFSE で標識した 7 種の CD44 陽性 PDAC 細胞株を一晩直接共培養することにより Ad-MCA の形成を誘導し、膵癌標準化学療法薬のゲムシタビン（GM）に対する治療抵抗性を検討した。アポトーシス細胞はフローサイトメトリー法を用いて測定した。共培養した細胞は、抗 CD44 抗体、抗 CD44v9 抗体（CD44v8-10 を認識）、抗 Ki-67 抗体を用いて免疫蛍光二重染色を行った。共培養による CD44v アイソフォーム、トランスクリプトームの変化は、FACS ソーティングにより PDAC 細胞を分離後、RT-PCR 法、マイクロアレイ解析により検討した。*in vivo*での Ad-MCA 形成の評価は、SCID マウスを用いた腹膜播種モデルを作製して検討した。Ad-MCA 形成 PDAC 細胞から得られた遺伝子プロファイルの臨床的関連性は、NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) から得られた膵癌患者のデータセットを使用して検討した。（第二章）半導体技術を応用した微細加工技術により、生きている微小な癌腫瘍組織（微小腫瘍）の生態をライブイメージング可能なマイクロ・ナノ基板を開発し、PDAC の Ad-MCA 様の微

小腫瘍の形成を誘導、マイクロ組織レベルの PDAC のダイナミクスを可視化した。本基板上で培養した癌細胞が微小腫瘍を自己組織化する様子をライブイメージング解析した。また、*in vivo* での病態評価は、SCID マウスに PDAC 細胞を腹腔内投与して作製した腹膜播種モデルマウス及び、ヒト PDAC 病理検体を用いた。(第三章) EMT 進行度の違いによるマイクロ組織レベルのダイナミクスへの影響を検討するために、EMT 進行度が異なる 5 種の PDAC 細胞からマイクロ・ナノ基板上に自己組織化させた PDAC 微小腫瘍について、ライブイメージングや 3D 画像解析による腫瘍ダイナミクス解析を行った。

【結果】(第一章) GM 感受性を示す CD44v3-10^{high}/CD44s^{low} PDAC 細胞は、HEK293T 細胞との直接共培養によって、CD44 強陽性 Ad-MCA を形成し、GM 抵抗性、細胞周期静止状態の CD44v8-10^{high} 癌幹細胞様のさらなる難治性を獲得することを明らかにした。NCBI GEO を利用した膵癌患者 220 人分のトランスクリプトーム解析と比較した結果、共培養によって発現量が大きく低下した 24 遺伝子は、ヒト膵癌患者腫瘍部位で発現が有意に上昇している遺伝子群であった。(第二章) 独自に開発したマイクロ・ナノ基板は、スライドカバーガラスに MPC ポリマーをコートした細胞非接着面に細胞接着可能なナノスケールの粗さのあるマイクロスケールのパターンを持つ。播種した PDAC 細胞は、パターンを跨いで足場を形成して微小腫瘍を自己組織化した。PDAC 細胞は細胞内細胞浸潤を介して PDAC 微小腫瘍を形成し、組織運動極性を獲得、管腔へと分化成熟することを可視化した。PDAC 微小腫瘍に観察された構造は、PDAC 外科検体の腫瘍部位の構造と類似していた。PDAC 微小腫瘍は、伸長しながら、細胞集合体によって形成された葉状仮足で死細胞デブリ由来の核酸を直接腫瘍体内へ取り込み、死細胞由来フォスファチジルセリン (PS) を腫瘍の体表面に大量に蓄積させた。(第三章) PDAC 微小腫瘍は、EMT の進行により、マイクロスケールパターンへの足場依存性や伸張性が低下することがわかった。さらに、EMT の進行は、微小腫瘍の大きさ、管腔構造の形成率、有糸分裂期細胞の位置といった腫瘍ダイナミクスに影響を与えた。

【考察】(第一章) HEK293T 細胞との直接共培養によって、CD44v3-10^{high}/CD44s^{low} PDAC 細胞は、治療抵抗性を獲得した Ad-MCA を形成することを明らかにした。PDAC 細胞は、Ad-MCA を形成することで遺伝子プロファイルを大きく変化し、ヒト膵癌腫瘍部位で高発現の遺伝子群を低下させ、一時的に正常組織のプロファイルに戻った。したがって、PDAC 細胞は、Ad-MCA を形成することで、まるで正常組織であるように遺伝子発現を変化させ、分子標的薬等の抗癌剤の標的にはならない可能性が示唆された。本共培養システムでは、Ad-MCA 形成 PDAC 細胞のみを解析することが困難であるため、第二章以降では Ad-MCA を癌細胞のみで形成可能な新規細胞培養デバイスを開発した。(第二章) 本基板上で自己組織化された成熟微小腫瘍は、体表面に PS を蓄積させることを明らかにした。PS を細胞膜に発現させることは、癌の免疫回避の要因であることが報告されていることから、免疫細胞から死んだ組織として認識され、攻撃を回避した可能性が示唆された。(第三章) EMT の進行は、PDAC 微小腫瘍のダイナミクスに大きく影響を与えた。この結果から、細胞ではなくマイクロ組織レベルで EMT の進行を理解することは、PDAC を克服する上で重要であることが示唆された。

【結論】 これまでにない生きている PDAC 微小腫瘍を対象としたダイナミクス解析によるマイクロ組織レベルの PDAC 治療抵抗性の理解は、より効果的な抗癌剤の開発へと繋がると考える。