



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14482
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96778
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Ohta.pdf



学 位 論 文

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)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

太 田 悠 介

学 位 論 文

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)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

太 田 悠 介

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
全体の緒言	7 頁
第一章:膵癌細胞における足場依存性多細胞凝集塊(Ad-MCA)はさらなる治療抵抗性を獲得する	
1. 緒言	10 頁
2. 実験方法	12 頁
3. 実験結果	17 頁
4. 考察	27 頁
第二章:細胞内細胞浸潤を介して自己組織化した膵微小腫瘍のダイナミクスの可視化	
1. 緒言	29 頁
2. 実験方法	31 頁
3. 実験結果	35 頁
4. 考察	46 頁
第三章:膵管腺癌細胞の上皮間葉転換の状態に依存する微小腫瘍のダイナミクス	
1. 緒言	49 頁
2. 実験方法	50 頁
3. 実験結果	56 頁
4. 考察	70 頁
結論	72 頁
謝辞	74 頁
利益相反	75 頁
引用文献	76 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Miyatake Y.*, Ohta Y.*, Ikeshita S., Kasahara M. (2018). Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces a quiescent stem-like intractable phenotype in pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, 9, 29845-29856.

*Contributed equally.

2. Miyatake Y., Shigetomi K.K., Ohta Y., Ikeshita S., Subagyo A., Sueoka K., Kakugo A., Amano M., Takahashi T., Okajima T., Kasahara M. (2018). Visualising the dynamics of live pancreatic microtumours self-organised through cell-in-cell invasion. *Scientific Reports*, 8, 14054.

3. Ohta Y., Miyatake Y., Shigetomi K.K., Ikeshita S., Kakugo A., Amano M., Hirata Y., Subagyo A., Sueoka K., Takahashi T., Okajima T., Kasahara M. (2021). Dynamics of live microtumors depend on the epithelial-mesenchymal transition states in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Research*, *in preparation*.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 太田悠介、宮武由甲子、笠原正典「膵管腺癌細胞の足場依存性多細胞凝集塊における遺伝子プロファイルの変化」、『第 77 回 日本癌学会学術総会』、2018 年 9 月 27 日-29 日、大阪

2. Yusuke Ohta, Yukiko Miyatake, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Shunji Ikeshita, Agus Subagyo, Kazuhisa Sueoka, Akira Kakugo, Maho Amano, Toshiyuki Takahashi, Takaharu Okajima, Masanori Kasahara: *The 38th Sapporo International Cancer Symposium*, 2019 年 7 月 11 日-12 日, Sapporo.

3. 太田悠介、宮武由甲子、笠原正典「膵管腺癌におけるマイクロ組織レベルの化学療法抵抗性ダイナミクス」、『第 79 回 日本癌学会学術総会』、2020 年 10 月 1 日-3 日、広島

要 旨

【背景と目的】

膵癌は約 90%が膵管上皮から発生、充実性腫瘍を形成して浸潤・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) を形成し、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

た計 220 人の膵癌患者の外科切除検体(正常部位と腫瘍部位)におけるトランスクリプトーム解析結果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 強陽性足場依存性多細胞凝集塊(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急速に変化し、ヒト膀胱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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

Ad-MCA	anchorage-dependent multicellular aggregate
BP	biological process
CC	cellular component
CCK-8	cell counting kit-8
CD44v	CD44variant
CFSE	5- (and 6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CSC	cancer stem cell
CXCR4	C-X-C chemokine receptor 4
DEG	differentially expressed gene
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EM-type	hybrid epithelial/mesenchymal-type
EMT	epithelial mesenchymal transition
EthD-1	Ethidium Homodimer-1
FBS	fetal bovine serum
GEO	gene expression omnibus
GM	gemcitabine
GO	gene ontology
H&E	Hematoxylin & Eosin
IC50	The half maximal inhibitory concentration
JST	Japan Science and Technology Agency
M-type	mesenchymal-type
MCA	multicellular aggregate
ME-type	hybrid mesenchymal/epithelial-type
MF	molecular function
MPC	2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
N.S.	not significant
NK	natural killer
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PI	propidium iodide

PR	positive photoresist
PS	phosphatidylserine
PVDF	polyvinylidene fluoride
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SCID	severe combined immunodeficiency
SPF	Specific Pathogen Free
3D	three-dimensional
TGF- β	transforming growth factor- β
2D	two-dimensional
UV	ultraviolet
VIM	vimentin

全体の緒言

膵癌は約 90%が膵管上皮から発生、充実性腫瘍を形成して浸潤・転移が非常に起きやすい膵管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) である (Li D. et al., 2004 ; Hidalgo M., 2010 ; Vincent A. et al., 2011)。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 (Hezel A. et al., 2006 ; Morris 4th J.P. et al., 2010) 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る (Mani S.A. et al., 2008 ; Wang Z. et al., 2009 ; Arumugam T. et al., 2009 ; Acloque H., et al., 2009 ; Rhim A.D. et al., 2012 ; Craene B.D., 2013) 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 (Aiello N.M. et al., 2017 ; Zheng X. et al., 2015)、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) を形成し、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 (Miyatake Y. et al., 2013 ; Miyatake Y. et al., 2015)。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。

第一章では、HEK293T 直接共培養システムを用いて、EMT を起こす前の Ad-MCA 形成 PDAC 細胞が、さらなる難治性を獲得することを明らかにした。

第二章では、癌細胞のみで PDAC の Ad-MCA 様の微小腫瘍の形成を誘導可能なマイクロ・ナノ基板を開発し、PDAC のマイクロ組織レベルの難治性獲得の機序についてダイナミクス解析を行った。

第三章では、EMT の進行度が異なる複数の PDAC 細胞株の腫瘍ダイナミクス解析を行い、EMT 進行のマイクロ組織レベルにおける影響を可視化した。

本研究により、細胞単体ではなく、多細胞集団組織 (マイクロ組織) レベルの

EMT で実際に引き起こされている挙動を体外で可視化して理解することは、PDAC の病態を理解する上で非常に重要であることが考えられ、より効果的な抗癌剤の開発へと繋がることが期待される。

第一章

膵癌細胞における足場依存性多細胞凝集塊(Ad-MCA)は
さらなる治療抵抗性を獲得する

緒言

膵癌は、診断技術や治療法が向上しているにも関わらず、10 年生存率が 6%以下と他の癌と比較して極めて予後不良である (Li D. et al., 2004 ; Hidalgo M., 2010 ; Vincent A. et al., 2011)。進行性膵癌に対する標準的な化学療法として、ゲムシタビン (GM) が用いられることが多いが、あまり生存率が改善されていない (Burris H. et al., 1997)。膵癌が予後不良である要因として、早期発見が難しいこと、浸潤が強いことや早期から転移が起こること、GM などの有糸分裂を阻害する薬剤に対して強い治療抵抗性を示すことなどが挙げられる (Burris H.A. et al., 1997)。GM が PDAC 細胞に対して与える影響として、活性酸素 (ROS) 依存的な C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) の発現の亢進が PDAC 細胞の浸潤能を促進させることが報告されている (Arora S. et al., 2013)。膵癌でも、ごく少数の細胞集団、癌幹細胞 (cancer stem cell, CSC) が存在すると考えられている (Li C. et al., 2007)。CSC は、細胞周期が静止状態であるという特徴があり、これによって分裂期の細胞を標的として作用する GM などの多くの抗癌剤に対して抵抗性を獲得することが知られる (Li L. et al., 2011)。CSC の周囲微小環境はニッチと呼ばれる (Borovski T. et al., 2011) が、ニッチ構成細胞がどのように CSC を産出し、その維持に関与するのかといった詳細なメカニズムについては、*in vitro* において、ニッチを再現し、CSC を産生することが困難なこともあり、未だ不明な点が多い。

CD44 は、接着分子でありヒアルロン酸レセプターであるが、CSC のマーカーとしても知られており、結腸癌細胞へ幹細胞特性を直接的に誘導することが報告されている (Su Y.J. et al., 2011)。正常組織では CD44 スタンダードフォーム (CD44s) として存在するが、癌細胞においては、選択的スプライシングによって多くのバリエーション (CD44v) が形成され、それぞれが異なった機能を有しているとされる (Brown R.L. et al., 2011)。EMT の段階において、CD44v から CD44s へのアイソフォームスイッチングが起こり (Mani S.A. et al., 2008)、中でも、CD44v8-10 は、CSC における細胞ストレス耐性に関与することが明らかとなっている (Ishimoto T. et al., 2011)。

これまでに当教室では、上皮系フィーダー細胞とリンパ腫細胞を直接共培養すると、足場依存性多細胞凝集塊 (anchorage-dependent multicellular aggregate, Ad-MCA) を形成し、その一部が細胞周期静止状態で、CD44 を強発現した CSC 様フェノタイプを獲得したことを報告してきた。この結果より、組織浸潤リンパ腫細胞の難治性は、CSC 様のフェノタイプを獲得することが部分的な要因である可能性が示唆されている (Miyatake Y. et al., 2013 ; Miyatake Y. et al., 2015)。さらに、

最近、多細胞凝集体 (MCA) の形成は、濾胞性リンパ腫の遺伝子発現、増殖、薬剤耐性、及び免疫回避に関与することが報告されている (Gravelle P. et al., 2013)。以上のことから、Ad-MCA 形成は、腫瘍の悪性度に寄与している可能性が考えられた。しかしながら、脾癌の MCA や Ad-MCA のような集団細胞形成の根底にあるメカニズムについては未知な部分が多い。そこで本研究では、細胞工学分野に広く用いられる HEK293T 細胞を上皮系フィーダー細胞として用いた実験系を確立し、周囲微小環境による脾癌の細胞集団としての悪性形質獲得の機序について検討した。

実験方法

細胞

ヒト PDAC 細胞株として PCI-55、PCI-24、PCI-43、PCI-6、PCI-35、MIA PaCa-2、PANC-1 の 7 種の細胞株を使用した。このうち、PCI-55、PCI-24、PCI-43、PCI-6、PCI-35 細胞は、北海道大学病院にて外科切除された膵癌原発巣組織より、細胞株として当研究室にて樹立されたものである (Kishimoto T. et al., 1996)。MIA PaCa-2、PANC-1 細胞は理研バイオリソースセンター (Tsukuba, Japan) より入手した。ヒト腎上皮様細胞株である HEK293T 細胞はフィーダー細胞として使用した。これらの細胞株は 10% fetal bovine serum (FBS)、penicillin/streptomycin を含む Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) 培地で継代培養した。正常ヒト皮膚線維芽細胞株である NHDF 細胞は、タカラバイオメディカル (Shiga, Japan) より入手し、15% FBS、penicillin/streptomycin を含む DMEM 培地で継代培養した。

抗体、試薬

免疫蛍光染色に抗ヒト/マウス CD44 抗体 (clone IM7; eBioscience Inc., San Diego, CA)、ラット抗ヒト CD44v9 抗体 (clone RV3; CosmoBio, Tokyo, Japan)、マウス抗ヒト Ki-67 抗体 (clone MIB-1; DAKO, Glostrup, Denmark) を使用した。抗癌剤は GM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を使用した。生細胞ラベルには 5- (and 6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan)、PKH26 (Sigma-Aldrich) を使用した。

共培養

PDAC 細胞株は HEK293T 細胞または NHDF 細胞と直接共培養を行った。あらかじめ 1×10^6 個/mL に調製した HEK293T 細胞または NHDF 細胞を $1 \mu\text{mol/L}$ の CFSE で 37°C 、15 分標識し、PBS で 3 回洗浄したものを 24 ウェルプレートに 24 時間培養した後、単層に増殖した HEK293T 細胞または NHDF 細胞上に PDAC 細胞 2×10^5 個を播種して、直接共培養を一晩行った。

アポトーシスアッセイ

Propidium iodide (PI) 染色によって PDAC 細胞の細胞周期をフローサイトメトリ

一法で解析し、CFSE ネガティブ細胞の内、sub-G0/G1 期の細胞をアポトーシス細胞として測定を行った (Miyatake Y. et al., 2013)。具体的には、まず単層に増殖した CFSE 標識 HEK293T/NHDF 細胞上に PDAC 細胞を直接共培養し、GM 0.8 μ M 48 時間暴露後に接着細胞を回収した。細胞は 70% エタノールによって -20°C で一晩固定した後、RNase 処理 (20 mg/mL) し、PI 20 mg/mL で染色した。細胞の測定には FACScant flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を使用し、CFSE 陰性細胞集団にゲートをかけて、PDAC 細胞 10,000 個を測定した。細胞解析には CellQuest Pro software version 6.0 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) を使用した。

細胞ソーティング

CFSE を標識させた HEK293T 細胞と共培養した PDAC 細胞を 18 時間後に回収、 5×10^6 /mL となるように 3% FBS を含む PBS に懸濁した。その後、FACS Aria III (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) によって CFSE 陰性細胞集団を PDAC 細胞として 6.5×10^5 個を分離し、Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) に使用した。

免疫蛍光染色

チャンバースライド上に培養した細胞を、4% パラホルムアルデヒドで室温、15 分固定し、0.1% Triton X-100 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含む PBS によって 4 分間の細胞透過処理を行った後、70% メタノールで 4 分間再度固定した。抗体の非特異反応を抑制するため、0.1% 正常ヤギ血清で 10 分間ブロッキングを行った。一次抗体を 4°C で一晩反応させ、二次抗体として Alexa Fluor 標識ポリクローナル抗体を室温で 60 分間反応させた。染色像の撮影には Olympus DP70 カメラ、Olympus DP controller software version 1.2.1.108 (Olympus, Tokyo, Japan)、共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000D; Olympus, Tokyo, Japan) を使用した。

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

PDAC 細胞株から RNeasy mini kit (QiaGen, Hilden, Germany) を用いて RNA 抽出を行った。得られた RNA のうち 1 μ g に DNase I (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 処理を行い、Go Script Transcriptase & Reverse Transcription System

(Promega, Mannheim, Germany) によって cDNA を合成した。PCR 反応は Go Taq Green Master Mix (Promega) を使用し、95℃ 15 分の変性後、95℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒の反応を 35 サイクル行ったのち、72℃ 7 分間の伸長反応を行った。用いたプライマーの塩基配列は表 1 の通りである。

表 1. RT-PCR 法に用いたプライマーの塩基配列

遺伝子名	配列方向	プライマー配列 (5' -3')
CD44v	Forward	TCCCAGACGAAGACAGTCCCTGGAT
	Reverse	CACTGGGGTGGAATGTGTCTTGGTC
E-Cadherin	Forward	AATCCCACCACGTACAAGGG
	Reverse	GGAGGTGGTGAGAGAGACCT
N-Cadherin	Forward	CCAGCGACCCAGTCAGGATTTA
	Reverse	TTCACATGGGGCGGCATCTA
Vimentin	Forward	GGCTCGTCACCTTCGTGAAT
	Reverse	GCAGAGAAATCCTGCTCTCCTC
TGF- β	Forward	AGGTGGTCTATGTTGGCGTCTGGAT
	Reverse	AGGATGAGGATGACTGTGGTCTTGA
DKK1	Forward	CCATTGACAACCTACCAGCCGT
	Reverse	CCGGCAAGACAGACCTTCTC
NT5E	Forward	CTCCTCTCAATCATGCCGCT
	Reverse	CCCAGGTAATTGTGCCATTGT
KRT6A	Forward	CGTCAAGAAGCAGTGCGCC
	Reverse	GAGCAATGGGTGCTCAGATGGTA
TMEM154	Forward	CCGTCGGCCGGGGTAAT
	Reverse	CCTCACACATCAAGACACTGC
TNFRSF10A	Forward	TTGTGTCCACCAGGATCTCAT
	Reverse	CTGAGCCGATGCAACAACAG
HENMT1	Forward	TTCCGGCTCGCGGTCT
	Reverse	TCCACAACGGAGCCATGATA
AREG	Forward	ACTCGGCTCAGGCCATTAT
	Reverse	CTTTTCCCCACACCGTTCAC
LAD1	Forward	ACGGCCATACGGAGATCAGA
	Reverse	TTCTCAAAGAGGTGGCGCTT
ZBED1	Forward	TCCTGGAGCCAGCAGGT
	Reverse	TGCTGCTTCTTGCTGTCGTA

MMP1	Forward	ACAGCTTCCCAGCGACTCTA
	Reverse	GAGAGTTGTCCCGATGATCTCC
IRS1	Forward	CTCAGTCCTAACCGCAACCA
	Reverse	AGGTCATTTAGGTCTTCATTCTGC
FERMT1	Forward	GGACAGCCTTTTGGAGGACAT
	Reverse	CCTTCGATGCCAACATGCAG
OCIAD2	Forward	AAACTGCACATCCACAGAGC
	Reverse	CAAGAGACCAGCAAGTGCAA
IFI44	Forward	ATTCCCCATCGCTGAAGGAC
	Reverse	CCTCCCTTAGATTCCCTATTTGC
SLFN13	Forward	CGGAGTGTCTGAGCTTGA
	Reverse	TCCATGTTGAACTTGCACCAATA
HS3ST1	Forward	GGGTACGCGACTCAGTAATTGG
	Reverse	CCTCAATGGGTGGATAGGGC
CLDN23	Forward	CCAAGGCCTACACCAACTCG
	Reverse	CAAGCGTCTAGAGGTCGGAG
DAPP1	Forward	CTCCAGGATTTGGGGTGGTAT
	Reverse	GCCCCTGAGCACACAAGT
NQO1	Forward	CAGTGGTTTGGAGTCCCTGC
	Reverse	ACTGCCTTCTTACTCCGGAAGG
SERPINB5	Forward	CACAGGCTTGGAGAAGATTGAAAA
	Reverse	CTGCCAACTACCCCGGACAAT
MST1R	Forward	CAGCAGAAGGAGTGTCCTGG
	Reverse	AAGCTGCCTCTCACACCTG
PLEK2	Forward	GTATGAAAACCGACCGCTCC
	Reverse	TTTCACCACCGTGCCACTTA
ITGA2	Forward	ACGGGACTTTCGCATCATCAA
	Reverse	ACTCCTGTTGGTACTTCGGC
LAMC2	Forward	GCGGATTCACTCTCAAGCCT
	Reverse	CTACACTGAGAGGCTGGTCCAT
GAPDH	Forward	AGCGAGATCCCTCCAAAATC
	Reverse	GGCAGAGATGATGACCCTTT

マウス

本実験に使用したマウスは、C.B-17 / Icr-scid/scidJcl マウスであり、CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan)から入手した。このマウスは、重症複合免疫不全マウスであり、SPF (Specific Pathogen Free) の施設内で繁殖及び飼育されたものである。なお、本実験における全ての動物実験は、「北海道大学動物実験に関する規程」に従って行ったものである。

マウス腹腔への PDAC 細胞の投与

雄 SCID マウス(6-8 週齢)に対して CFSE 及び PKH26 標識を行った PCI-55 細胞 (5×10^6 個)の混合物を 200 μ L PBS で懸濁させて腹腔内投与した。投与後、1-3 日で腹膜を回収し、凍結組織切片作製用包埋剤 Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)を用いて凍結切片を作製した。

マイクロアレイ解析

Total RNA は単独で培養又は HEK293T 細胞と共培養した全 PDAC 細胞から分離したものを使用し、そのうち 0.1 μ g のみ、Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)によって、Cyanine-3 (Cy3)標識し、cRNA を合成した。その後、標識された cRNA をマイクロアレイにハイブリダイズさせた。洗浄後、Agilent SureScan Microarray Scanner (G2600D)にてアレイを撮影し、Feature Extraction Software 11.5.1.1 (Agilent)で解析を行った。

統計解析

統計解析手法は、Student's *t*-test と反復測の定分散分析を用い、*P*値が 0.05 未満を有意差とした。

実験結果

HEK293T 細胞との直接共培養によって上皮系 CD44v^{high} / CD44s^{low} PDAC 細胞は足場依存性多細胞凝集塊 (Ad-MCA) を形成し、GM 抵抗性を獲得する

EMT の過程において、CD44v から CD44s へのアイソフォームスイッチングが起ることが報告されており、CD44 のスプライシングアイソフォームの分類が EMT の進行度の指標になり得ることが示唆された (Mani S.A. et al., 2008)。そこで、7 種の CD44 陽性 PDAC 細胞株、PCI-55、PCI-24、PCI-43、PCI-6、PCI-35、MIA PaCa-2、PANC-1 に関して、CD44 variant (CD44v) アイソフォームの発現パターンを検討した。PCI-55、PCI-24、PCI-43、PCI-6、PCI-35 細胞では CD44v mRNA の高発現が見られ CD44s mRNA の発現はほとんど見られず CD44v^{high} / CD44s^{low} の発現パターン、上皮系形質を示した。PCI-55、PCI-24、PCI-43 細胞は、CD44v のうち CD44v3-10 mRNA の高発現が認められ CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} の発現パターンを示し、GM 感受性を示した。一方、PCI-6、PCI-35 細胞では、CD44v8-10 の高発現が認められ、CD44v8-10^{high} / CD44s^{low} の発現パターンを示し、GM 抵抗性を示した。MIA PaCa-2、PANC-1 細胞では CD44s mRNA の高発現が認められ CD44v^{low} / CD44s^{high} の発現パターン、間葉系形質を示し、強い GM 抵抗性を示した (図 1A、B)。

次に、HEK293T 細胞との共培養における PDAC 細胞の接着パターンの違いについて検討した。上皮系形質を保った CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} である PCI-55、PCI-24 細胞及び、CD44v8-10^{high} / CD44s^{low} である PCI-6 細胞では、HEK293T 細胞上に接着して Ad-MCA を形成した。一方、間葉系形質を獲得した CD44v^{low} / CD44s^{high} である MIA PaCa-2、PANC-1 細胞では、そのような凝集塊は認められず、細胞が散在して接着していた (図 1C)。

GM 感受性である CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} 細胞が、HEK293T 細胞との共培養によって、GM 抵抗性を獲得するかどうか検討したところ、CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} である PCI-55、PCI-24 細胞は、単独培養時に比べて共培養時に、顕著に GM 抵抗性が亢進した (図 1D)。GM 暴露下において、Ad-MCA 形成に変化は観察されなかった (図 1E)。以上の結果より、CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} PDAC 細胞は HEK293T 細胞上で Ad-MCA を形成すると、GM 抵抗性を誘導することが示された。

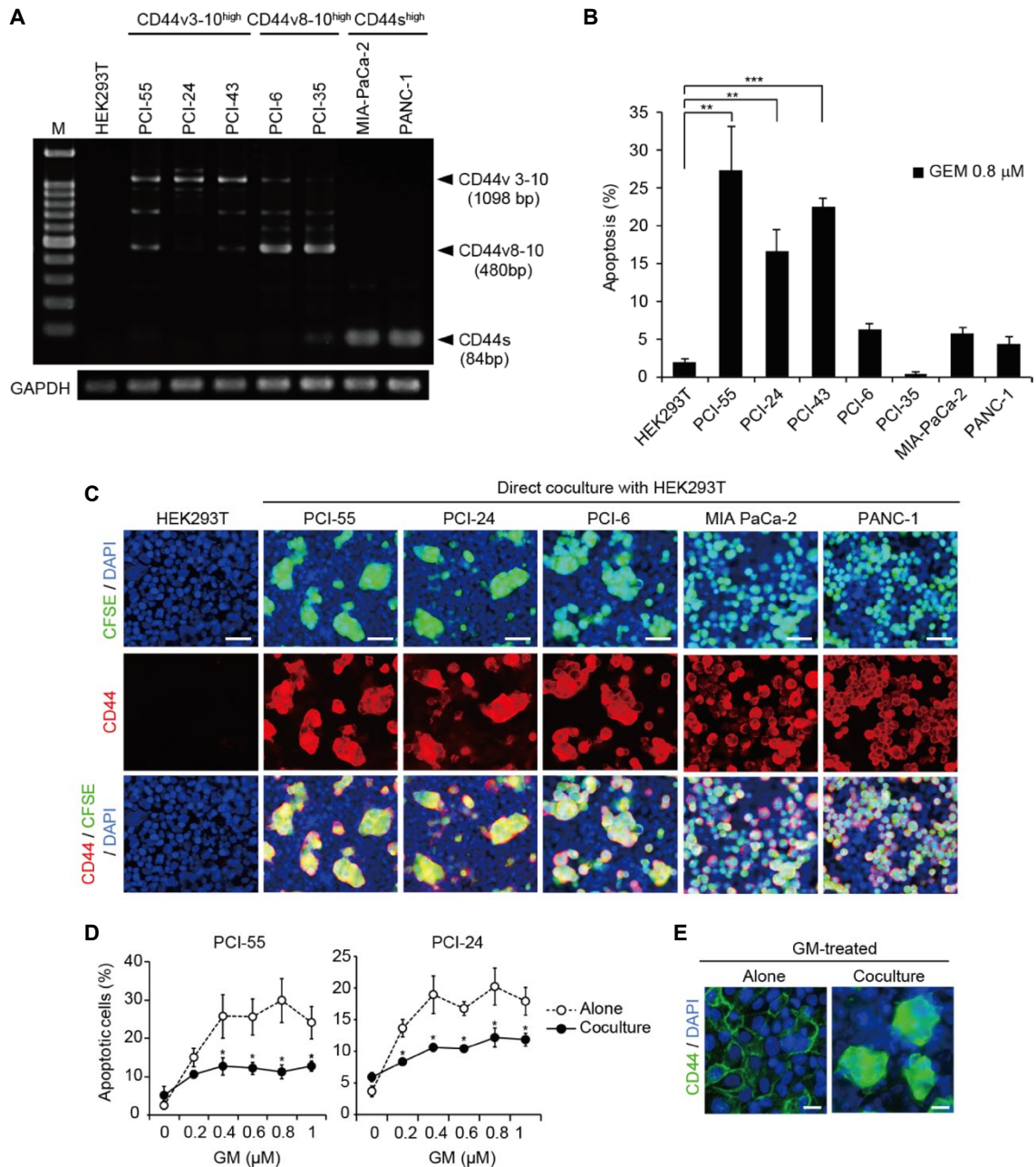


図 1. CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} 上皮系 PDAC 細胞は、HEK293T 細胞との直接共培養によって、足場依存性多細胞凝集塊 (Ad-MCA) を形成する

(A) RT-PCR 法を使用して、CD44 陽性 PDAC 細胞株 (PCI-55、PCI-24、PCI-43、PCI-6、PCI-35、MIA PaCa-2、PANC-1 細胞)、HEK293T 細胞において CD44v の発現パターンの確認。(B) CD44 陽性 PDAC 細胞株及び、HEK293T 細胞に対する GM 暴露によって誘導されたアポトーシス細胞の割合。(C) HEK293T 細胞との直接共培養による PDAC 細胞の形態変化。CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} PDAC 細胞及び、CD44v8-10^{high} / CD44s^{low} PDAC 細胞は Ad-MCA を形成した。(D) PCI-55 細胞 (左図)、PCI-24 細胞 (右図) における GM 48 時間暴露によるアポトーシス細胞の割合。(E) PCI-55 細胞は GM 0.8 μ M を暴露しても HEK293T 細胞上に Ad-MCA を形成した (右図)。これらの実験結果は独立した 3 回の結果の平均値を示す。Bars: 50 μ m (C), 25 μ m (D, F)、* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001

Ad-MCA を形成した CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} PDAC 細胞は CD44v8-10 の発現を亢進する

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Ad-MCA 形成 PDAC 細胞を観察したところ、表面に顕著な CD44 の高発現が観察された(図 2A)。抗 CD44 抗体を用いた免疫蛍光染色を行ったところ、Ad-MCA の体表面に糸状仮足が観察された(図 2B)。

次に、Ad-MCA 形成 PDAC 細胞の CD44v アイソフォームの発現を解析するため、HEK293T 細胞との共培養後、細胞ソーティングを使用して、PDAC 細胞を分離し、RT-PCR 法で検討を行った。HEK293T 細胞では CD44 の mRNA 発現がなく、単独で培養した間葉系である NHDF 細胞は CD44s のみ発現していることを確認した(図 2C)。CD44v3-10^{high}/CD44s^{low} である PCI-55、PCI-24 細胞は、HEK293T 細胞と共培養することによって、単独培養時に比べて CD44v8-10 mRNA の発現が亢進していた(図 2D)。さらに、CD44v8-10 を検出可能な抗 CD44v9 抗体を用いた免疫蛍光染色によって、Ad-MCA を形成した PCI-55 細胞では、CD44v9 の高発現が観察された(図 2E; 右図)。一方、PCI-55 細胞の単独培養では分裂細胞のみで CD44v9 の発現が認められた(図 2E; 左図、矢頭)。Ad-MCA を形成した PCI-55 細胞は、E-cadherin の発現の亢進が認められた。一方、Vimentin、transforming growth factor- β (TGF- β)の発現は認められなかった。この結果より、PCI-55 細胞は、Ad-MCA を形成しても、上皮系形質を保持することが示唆された(図 2F)。NHDF 細胞についても同様に共培養を行ったが、Ad-MCA の形成は認められず(図 2G)、CD44v8-10 mRNA 及び CD44v9 の発現の亢進も認められなかった(図 2D, H)。さらに、GM 抵抗性も獲得していなかった(図 2I)。

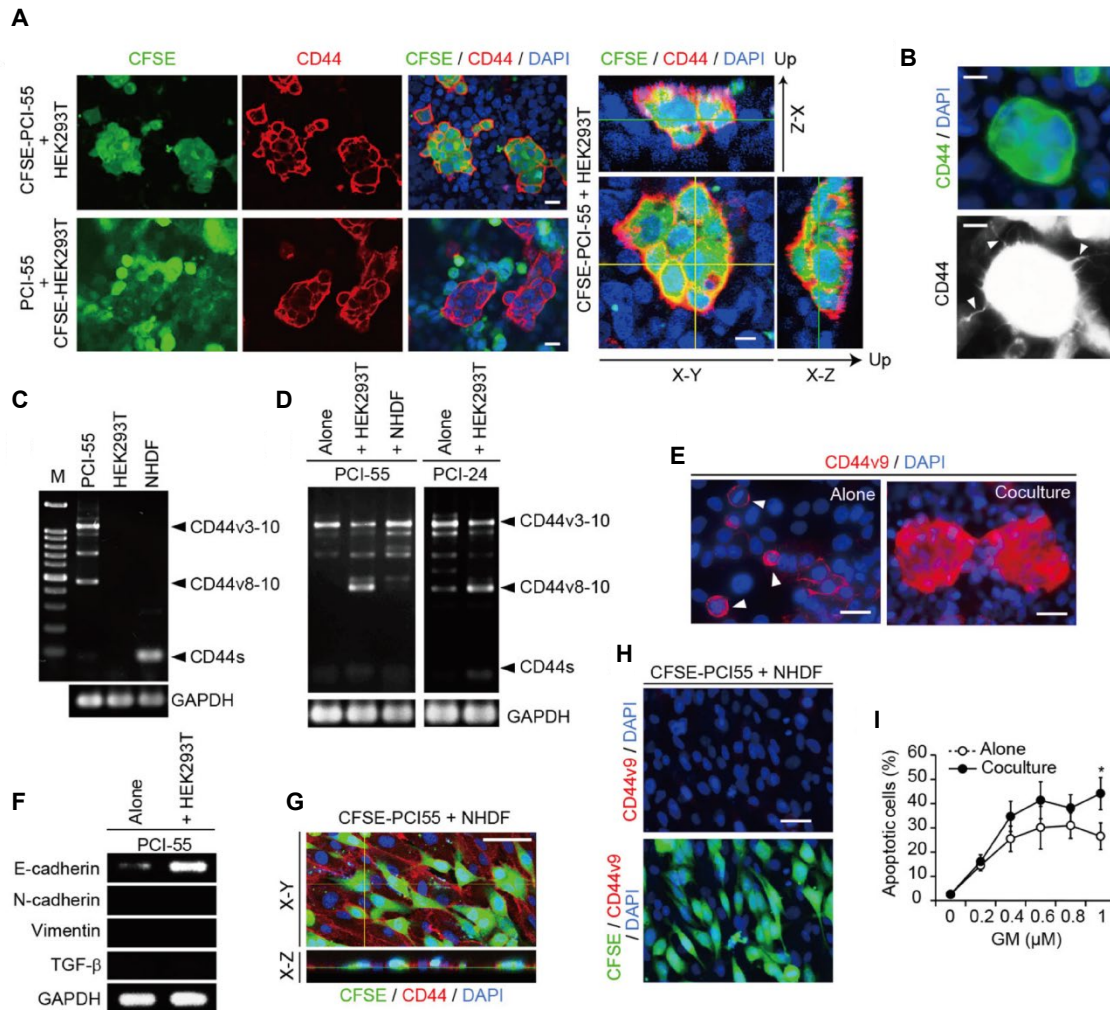


図 2. Ad-MCA を形成した $CD44v3-10^{high} / CD44s^{low}$ PDAC 細胞は $CD44v8-10$ の発現を亢進させる

(A) HEK293T 細胞上に Ad-MCA を形成した PCI-55 細胞の表面で顕著な CD44 の高発現が認められた。(B) Ad-MCA の表面において糸状仮足が観察された。(C, D) RT-PCR 法による、直接共培養後の PCI-55 細胞、PCI-24 細胞における $CD44v$ mRNA の発現パターンの変化。共培養後の PDAC 細胞は細胞ソーティングを使用して、HEK293T 細胞と分離した後に解析を行った。(E) PCI-55 細胞及び HEK293T 細胞との共培養における $CD44v9$ の発現。(F) RT-PCR 法による、共培養後の PCI-55 細胞における E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、及び $TGF-\beta$ mRNA の発現の変化。(G) PCI-55 細胞は NHDF 細胞と共培養しても Ad-MCA の形成が認められず、紡錘状の形態を示した。(H) NHDF 細胞と共培養した CFSE 標識 PCI-55 細胞は、 $CD44v9$ の発現が観察されなかった。(I) NHDF 細胞との共培養における GM 48 時間暴露によるアポトーシス細胞の割合(右図)。これらの実験結果は独立した 3 回の結果の平均値を示す。Bars: 25 μm 、* $P < 0.05$

Ad-MCA を形成した $CD44v8-10^{high} / CD44s^{low}$ PDAC 細胞は細胞周期静止状態に移行する

Ki-67 は、細胞周期のすべてのサイクル(G1 期、S 期、G2 期、M 期)で発現しているが、静止期である G0 期では発現しない蛋白として知られている(Licht T. et al., 1992)。これを用いて Ad-MCA を形成した PDAC 細胞の細胞周期を検討した。 $CD44v3-10^{high} / CD44s^{low}$ である PCI-55 細胞は、単独で培養すると多くの細胞において核に Ki-67 陽性像が認められた(図 3A)。細胞数計測の結果、PCI-55 細胞

におけるKi-67 陽性率は約 93%であった(図 3D)。一方、Ad-MCAを形成したPCI-55 細胞では、Ki-67 の発現が劇的に低下していることがわかった(図 3A; 下図, 3D)。一方、PCI-55 細胞を NHDF 細胞と共培養を行うと、多くの細胞で Ki-67 陽性像が認められ、単独培養時は約 93%、共培養時は約 94%といずれも高い陽性率であった(図 3C, D)。また、HEK293T 細胞との共培養では Ki-67 陰性の PCI-55 細胞に CD44v9 発現が観察されたが、単独培養時では Ki-67 陽性の分裂期の細胞のみ、CD44v9 発現が認められた(図 3B; 上図)。同様の結果が PCI-24 細胞を用いた染色でも確認された(図 3B; 下図)。これとは対照的に、ほとんどの MIA PaCa-2 細胞では、HEK293T 細胞との共培養に関係なく Ki-67 陽性像が観察された(図 3E, F)。同様の結果が PANC-1 細胞でも確認された(データ未表示)。これらの結果より、Ad-MCA を形成した $CD44v3-10^{high}/CD44s^{low}$ PDAC 細胞は、 $CD44v8-10^{high}/CD44s^{low}$ PDAC 細胞へとフェノタイプ変換し、細胞周期静止状態になることが示された。

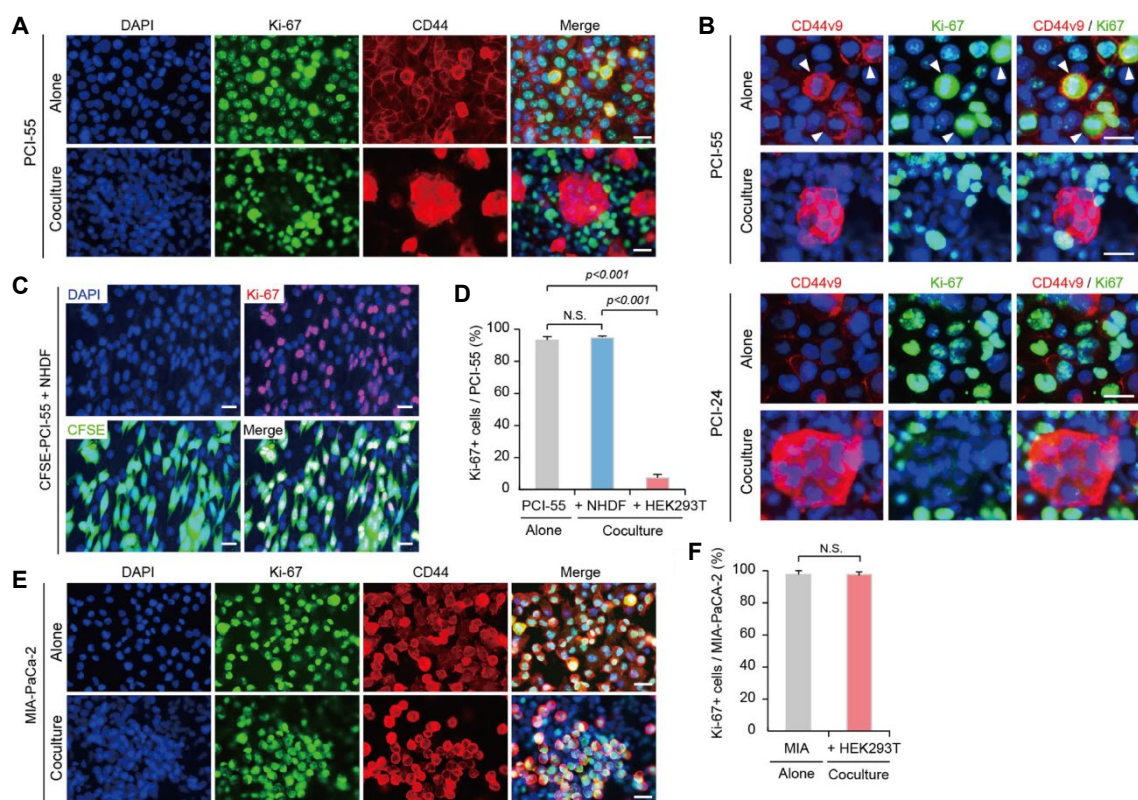


図 3. Ad-MCA を形成した $CD44v8-10^{high} / CD44s^{low}$ PDAC 細胞は細胞静止状態に移行する

(A) HEK293T 細胞上に一晚直接共培養を行った PCI-55 細胞における Ki-67、CD44 の発現。(B) PCI-55 細胞、PCI-24 細胞における Ki-67、CD44v9 の発現。(C) CFSE 標識した NHDF 細胞上に一晚共培養を行った PCI-55 細胞における Ki-67 の発現。(D) PCI-55 細胞単独培養時、HEK293T 細胞及び、NHDF 細胞と共培養した PCI-55 細胞のそれぞれにおける Ki-67 陽性細胞数の割合。(E) MIA PaCa-2 細胞における Ki-67、CD44 の発現。(F) MIA PaCa-2 細胞単独培養時、HEK293T 細胞と共培養した MIA PaCa-2 細胞のそれぞれにおける Ki-67 陽性細胞数の割合。陽性細胞数は強拡大($\times 200$)で 20 視野を無作為に抽出し計測した。Bars: 25 μ m、N.S.: not significant

SCID マウス腹腔に CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} PDAC 細胞を投与すると、PDAC 細胞は腹膜上に Ad-MCA を形成して CD44v9 を発現する

in vivo において CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} PDAC 細胞が Ad-MCA を形成するかどうか検討するため、SCID マウスに CFSE(緑)及び PKH(赤)で標識した PCI-55 細胞を腹腔内投与した(図 4A)。投与して 3 日後、緑及び赤色の蛍光を有する球状の微小な腫瘍が腹膜上に多数観察された(図 4B; 矢頭)。この結果より、二色の細胞で形成された微小腫瘍は PCI-55 細胞が凝集して形成したものであることが示唆された。さらに、SCID マウスに CFSE を標識させた PCI-55 細胞を腹腔内投与し、1 日後に腹膜を採取した。蛍光免疫染色法で CD44v9 の発現を観察したところ、腹膜上の微小腫瘍の体表面において CD44v9 の陽性像が観察された(図 4C; 矢頭)。これらの結果より、腹腔に投与した PCI-55 細胞は、HEK293T 細胞と共培養した場合と同様な形態を示すことがわかった。

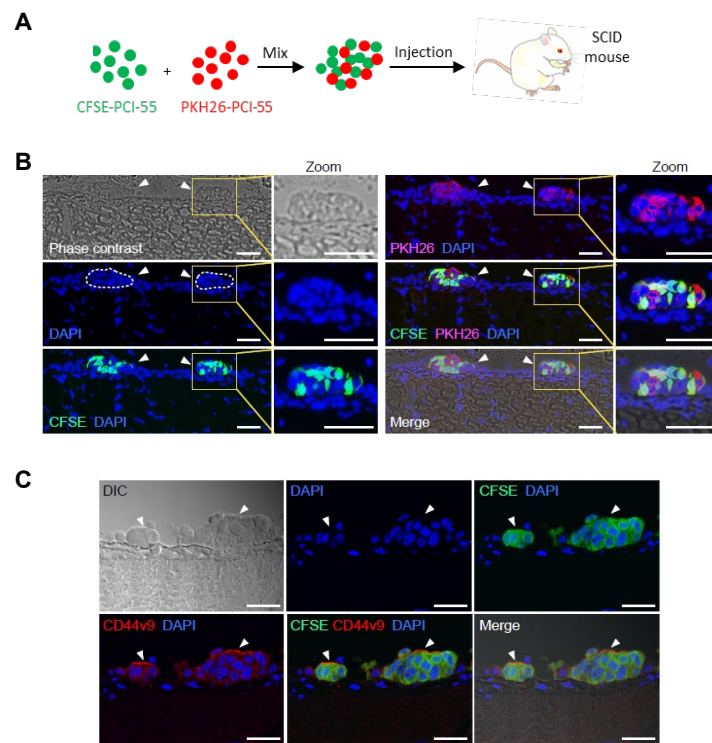


図 4. SCID マウスの腹腔に CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} PDAC 細胞を投与すると、PDAC 細胞は腹膜上に Ad-MCA を形成して CD44v9 を発現する

(A) CFSE または PKH26 で標識した PCI-55 細胞の混合細胞浮遊液 (5×10^6 細胞)を SCID マウスに腹腔内投与し、3 日後に腹膜を回収した。(B) 腹膜上に緑及び赤色の蛍光を有する球状の微小な腫瘍が多数観察された(矢頭)。(C) CFSE を標識させた PCI-55 細胞を投与 1 日後、腹膜を採取し、蛍光免疫染色法により、CD44v9 の発現を検討した。矢頭で示したように微小腫瘍塊の表面において陽性像が観察された。Bars: 200 μ m (B), 100 μ m (C)

PDAC 細胞のトランスクリプトームは、HEK293T 細胞との共培養で大きく変化する

Ad-MCA を形成した PDAC 細胞におけるトランスクリプトームを解析するため、CD44v3-10^{high} / CD44s^{low} PDAC 細胞である PCI-55、PCI-24 細胞と HEK293T 細胞との共培養後、全ての細胞溶解物の RNA 抽出を行った。細胞ソーティングによる遺伝子プロファイルの変化を防ぐため、HEK293T 細胞を含んだ全ての細胞溶解物を使用した(図 5A)。PDAC 細胞と HEK293T 細胞の割合を検討するため、マイクロアレイを施行する前に HEK293T 細胞と一晩共培養した CFSE 標識 PDAC 細胞を使用してフローサイトメトリー解析を行った。PCI-55 細胞は、33.8%、PCI-24 細胞は 24.4%といずれも、細胞を播種した時と同等な割合であった(図 5B)。単独で培養した PDAC 細胞と HEK293T 細胞との共培養を行った PDAC 細胞のトランスクリプトームを比較検討した。共培養によって、2,307 遺伝子の発現が有意に低下した。一方、957 遺伝子の発現が亢進していた(図 5C)。HEK293T 細胞のトランスクリプトームの影響を最小限に抑えるため、共培養によって発現が 10 分の 1 以下に低下(≤ 0.1 fold-change)した遺伝子群に焦点を当てた(図 5D)。共培養によって発現が 10 分の 1 以下に低下かつ $P < 0.05$ の遺伝子群における生物学的プロセス (Biological process; BP)、分子機能 (Molecular function; MF) 及び、細胞の構成要素 (Cellular component; CC) を検討するため、遺伝子オントロジー (GO) 解析を行った。共培養で発現が大きく低下した遺伝子群は、BP の GO 解析によって外胚葉の形成に関与していることがわかった(図 5E; 上図)。MF 及び CC の GO 解析からは、細胞外領域の細胞膜部分に局在することがわかった(図 5E; 下図)。共培養で発現が大きく低下した遺伝子群は、24 遺伝子群であることがわかった (dickkopf-related protein 1 (*DKK1*), 5'-nucleotidase(*NT5E*), keratin 6A (*KRT6A*), transmembrane protein 154(*TMEM154*), tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A (*TNFRSF10A*), HEN methyltransferase 1(*HENMT1*), amphiregulin (*AREG*), laminin-1 (*LADI*), zinc finger BED domain-containing protein 1 (*ZBED1*), matrix metalloproteinase-1 (*MMP1*), insulin receptor substrate 1 (*IRS1*), fermitin family member 1 (*FERMT1*), ovarian carcinoma immunoreactive antigen-like protein (*OCIAD2*), interferon-induced protein 44 (*IFI44*), schlafen family member 13 (*SLFN13*), heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 1 (*HS3ST1*), claudin 23 (*CLDN23*), dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides 1 (*DAPPI*), NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (*NQO1*), serpin family B member 5 (*SERPINB5*), macrophage stimulating 1 receptor (*MST1R*), pleckstrin-2 (*PLEK2*), integrin alpha-2 (*ITGA2*), and laminin subunit gamma 2 (*LAMC2*)) (図 4F)。RT-PCR 法で、共培養によって 24 遺伝子群の mRNA の発現が低下することを確認した(図 4G)。

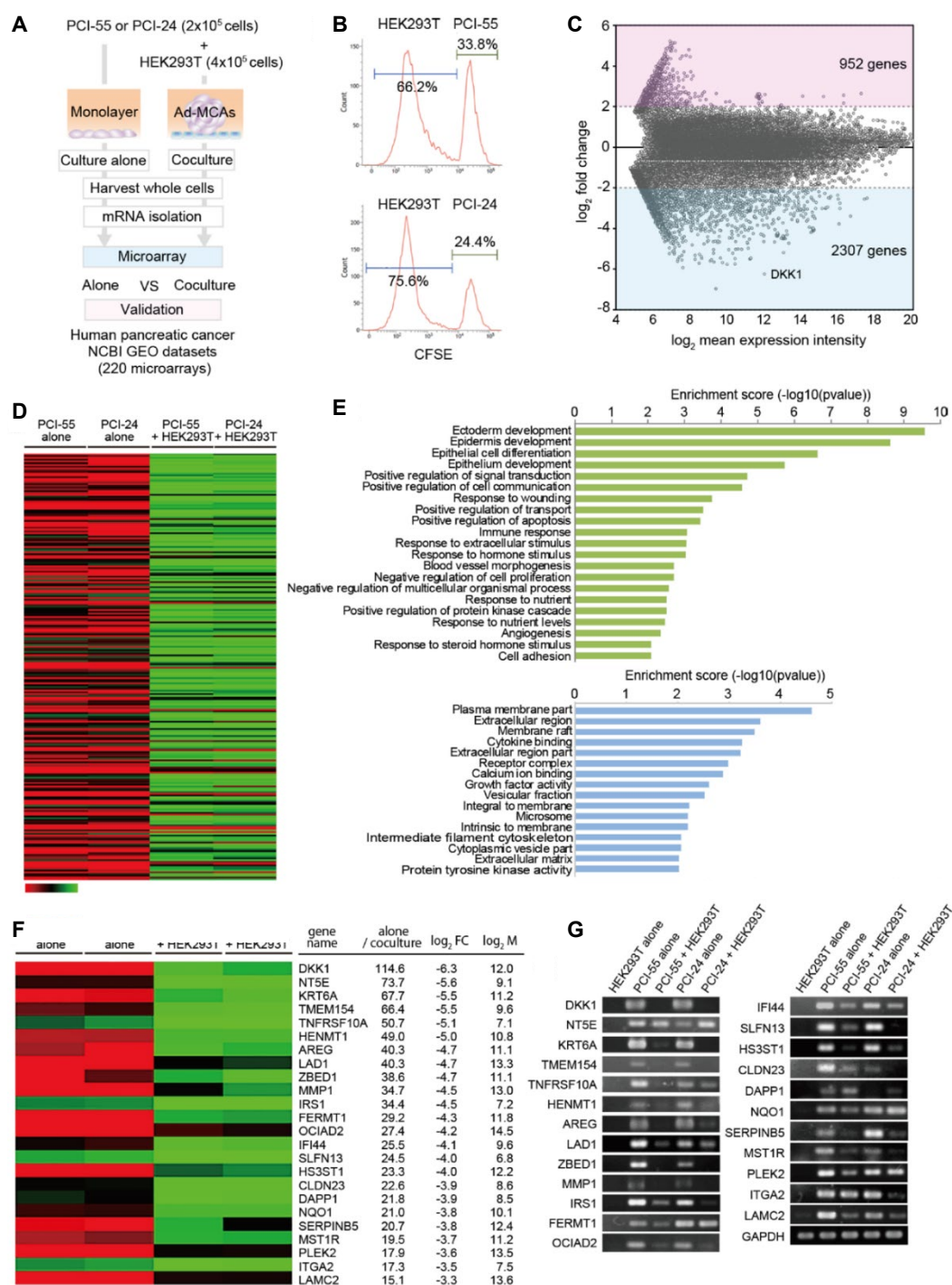


図 5. HEK293T 細胞との共培養によって 24 遺伝子群の発現量が大きく低下した

(A) マイクロアレイ法におけるプロトコル。(B) 共培養中の CFSE 標識 PDAC 細胞と HEK293T 細胞の割合をフローサイトメトリー解析した。(C) HEK293T 細胞との共培養によって生じた遺伝子ごとの発現量の変動について概観可能な MA プロットを作成した。(D) 共培養によって発現が 10 分の 1 以下に低下したトランスクリプトームについてヒートマップを作成した。(E) 共培養後に発現が大きく低下した遺伝子群において、遺伝子オントロジー (GO) 解析を行った。生物学的プロセス (BP) に属する GO は緑色で示す。分子機能 (MF) 及び細胞の構成要素 (CC) は青色で示す。(F) 共培養によって 10 分の 1 以下に低下かつ、 $P < 0.05$ の 24 遺伝子群 (differentially expressed gene; DEG) についてヒートマップを作成した。(G) RT-PCR 法による、DEG の発現パターンの確認。

Ad-MCA 形成によって発現が大きく低下した 24 遺伝子群は、ヒト膵癌腫瘍部位で有意に発現が亢進する

最後に、HEK293T 細胞との共培養によって発現が大きく低下した 24 遺伝子群 (differentially expressed gene, DEG) について、臨床的関連性を評価した。評価方法は、NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) から得られた計 220 人の膵癌患者の外科切除検体 (正常部位と腫瘍部位) におけるトランスクリプトーム解析結果のデータセット (GDS4103; 腫瘍部位 n = 32, 正常部位 n = 32, 左図、GDS4102; 腫瘍部位 n = 32, 正常部位 n = 16, 中央図、GDS4336; 腫瘍部位 n = 45, 正常部位 n = 45, 右図) を使用して検討した。Ad-MCA 形成 PDAC 細胞において発現が大きく低下した 24 遺伝子群は、膵癌患者から外科的に切除された検体の正常部位と比較して、腫瘍部位において有意な発現の亢進が認められる遺伝子群であった (図 6)。

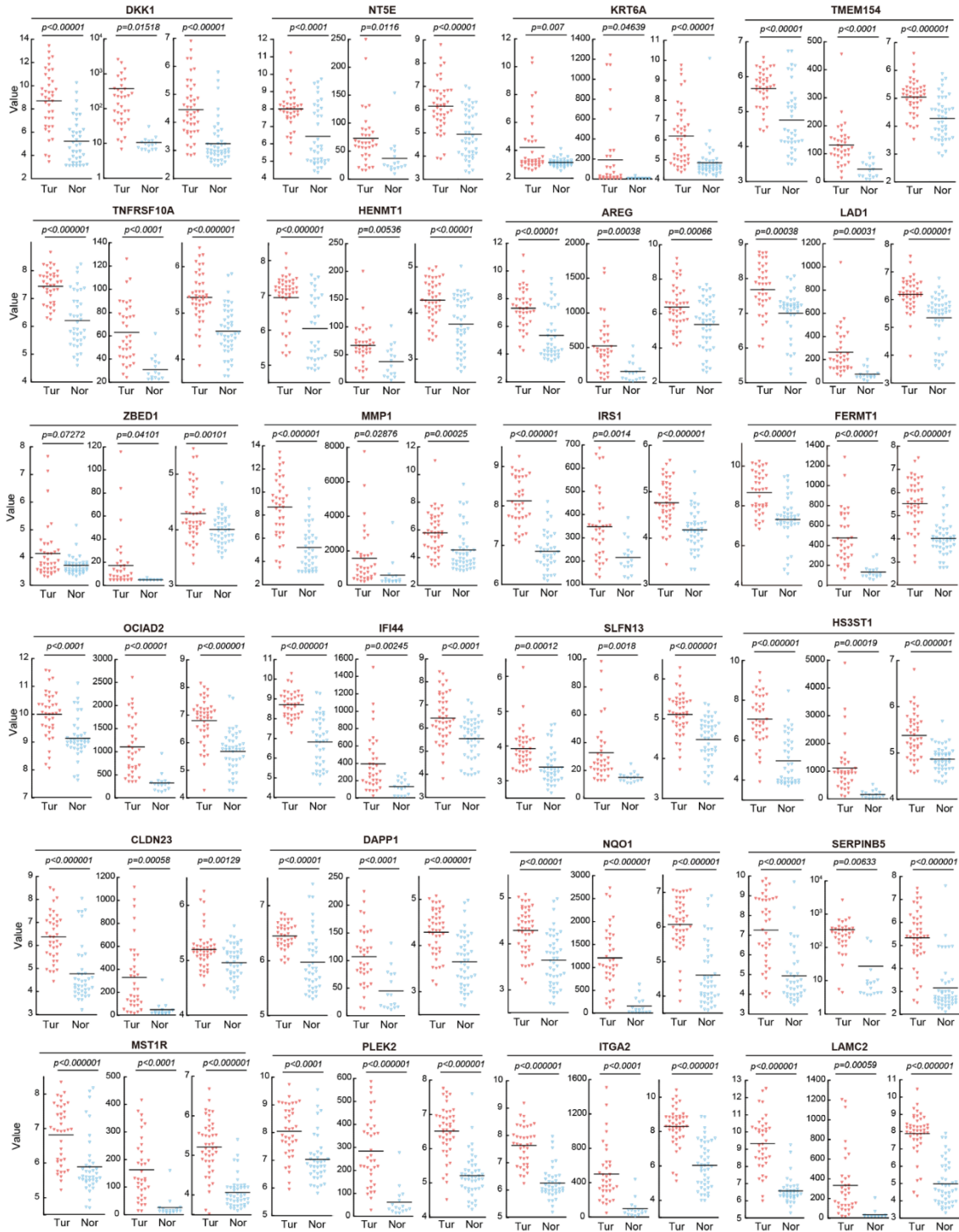


図 6. Ad-MCA 形成によって発現が大きく低下した 24 遺伝子群は、ヒト膵癌患者腫瘍部位で発現が有意に亢進している遺伝子群であった

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た (GDS4103 (左図)、GDS4102 (中央図)、及び GDS4336 (右図))。GDS4103: PDAC 腫瘍部位、正常部位による解析、合計 72 サンプル (腫瘍部位 $n = 32$ 、正常部位 $n = 32$)。GDS4102: 膵癌腫瘍部位、正常部位による解析、合計 52 サンプル (腫瘍部位 $n = 32$ 、正常部位 $n = 16$)。GDS4336: PDAC 腫瘍、隣接する正常部位による解析、合計 90 サンプル (腫瘍部位 $n = 45$ 、正常部位 $n = 45$)。Tur: 腫瘍部位; Nor: 正常部位

考察

本研究では、HEK293T 細胞と一晚の直接共培養によって、GM 感受性 CD44v3-10^{high}/CD44s^{low} PDAC 細胞が Ad-MCA を形成することを明らかにした。また、Ad-MCA を形成した PDAC 細胞では CD44v8-10 の発現が亢進し、細胞周期静止状態に移行、さらに GM 抵抗性を獲得することがわかった(図1, 2, 4)。PCI-55 細胞をマウスの腹腔内に投与したところ、HEK293T 細胞との共培養と同様に Ad-MCA を形成し、CD44v9 の発現を確認した(図 4)。したがって、HEK293T 細胞との共培養による Ad-MCA 形成 PDAC 細胞の癌幹細胞様細胞へのフェノタイプ変化は *in vivo* でも起こり得る現象であることが示唆された。

HEK293T 細胞との共培養により Ad-MCA 形成によって癌幹細胞様のフェノタイプを獲得した PDAC 細胞は、CD44v3-10^{high}/CD44s^{low} である PCI-55、PCI-24 細胞のみであった(図 1-3)。今回の検討により、CD44v3-10^{high}/CD44s^{low} PDAC 細胞では HEK293T 細胞との共培養時に CD44v8-10 の発現及び細胞周期静止状態に誘導させたが、CD44s への変換を明確に確認することができなかった(図 1-3)。したがって、HEK293T 細胞との共培養だけでは CD44v3-10^{high}/CD44s^{low} PDAC 細胞における間葉系形質への変換はすぐに起こらないことが示唆された。

CD44v3-10^{high}/CD44s^{low} PDAC 細胞のトランスクリプトームは、Ad-MCA を形成することによって一晚で変化し、一時的に一部の遺伝子群が正常組織のプロファイルに戻ることがわかった(図 5, 6)。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に対する治療抵抗性を獲得している可能性が考えられた。

なお、共培養システムでは、PDAC 細胞と HEK293T 細胞を分離する必要性があり 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、癌細胞のみで PDAC の Ad-MCA 様の微小腫瘍の形成を誘導可能な 3D 細胞組織培養デバイスの開発を行い、ダイナミクス解析を施行した。

第二章

細胞内細胞浸潤を介して自己組織化した

膵微小腫瘍のダイナミクスの可視化

緒言

これまでの *in vitro* 研究では、単一細胞や単層培養が主流であり、生きたままで癌腫瘍組織の動態や挙動(ダイナミクス)をライブイメージング観察する技術は、非常に乏しい。このことから、現在、*in vivo* での病態生理学的な検討として、マウス等の腫瘍モデル動物の組織病変部位を固定したものを病理組織学的に観察する手法や腫瘍の大きさ、位置を特定する画像診断を用いているのが現状である。現在の癌研究における手法では、細胞レベルの *in vitro* 解析と組織レベルの *in vivo* 解析には大きな隔たりが存在するが、その解析技術の不在によって、あまり意識されていない。それゆえ、生きている癌腫瘍組織のダイナミクスについては未知な部分が多い。実際、分子標的薬を用いた臨床試験において、*in vitro* と *in vivo* の間で異なる結果が得られる等の予期しない困難がかなり多く生じているのが現状である (Rocha Lima C.M. et al., 2004 ; Wendt D. et al., 2009 ; Caliarì S.R. et al., 2016 ; Gjorevski N. et al., 2016)。このような臨床試験時の困難性を軽減させるため、近年、癌研究の分野において、細胞を集団組織として捉える、三次元 (3D) 細胞培養技術の重要性が非常に高まっている。その理由は、3D 培養技術が、従来の 2D 培養技術と比較して、生理学的に *in vivo* により近い環境を模倣しているからである (Pampaloni F. et al., 2007 ; Ranga A. et al., 2014 ; Thoma C.R. et al., 2014 ; Weligelt B. et al., 2014)。

膵癌は、その 90% が PDAC であり、標準的な化学療法として、FOLFIRINOX や GM が用いられるが、あまり生存率が改善されていない (Vaccaro V. et al., 2011 ; Kamisawa T. et al., 2016)。KRAS 遺伝子変異は、PDAC の前癌病変である膵上皮内腫瘍性病変 (PanINs) の起因であるとされる (Waddell N. et al., 2015)。近年の報告では、わずか 14 か月で、ステージ 1 から 4 への急速な進行がおこり、その一端は膵癌細胞分裂時の DNA 複製の破局的崩壊によって引き起こされることが明らかとなってきた (Yu J. et al., 2015 ; Seifert L. et al., 2016 ; Notta F. et al., 2016)。このように、PDAC は、非常にアグレッシブな特性を有することは報告されているが、PDAC 腫瘍のダイナミクスについては十分に研究がなされていない。そこで本研究では、生きている PDAC の腫瘍ダイナミクスを体外で可視化するために、はじめに、半導体製作に用いられる微細加工技術を応用し、Ad-MCA 様の足場依存性の微小腫瘍組織の自己組織化を誘導できる新規 3D 培養デバイスである、「マイクロ・ナノ基板」を独自に開発した。本基板の開発によって、我々は、培養した癌細胞が微小な癌腫瘍組織 (微小癌、微小腫瘍) を自己形成する様子を生きた

ままで体外で観察することを世界で初めて可能にした。これにより、足場依存性 PDAC 微小腫瘍は、ライブイメージング解析によって、形態学的な極性を示し、細胞複合体から成る葉状仮足や糸状仮足を介して活発な運動性を有することを明らかにした。

実験方法

細胞

ヒト膀胱癌細胞株として PCI-55、PCI-24、PCI-43 の 3 種の細胞株を使用した。このうち、PCI-55、PCI-24、PCI-43 細胞は、北海道大学病院にて外科切除された膀胱癌原発巣組織より、細胞株として当研究室にて樹立されたものである (Kishimoto T. et al., 1996)。ヒト乳癌細胞株である HSC-3、SCC-9 細胞、肺癌細胞株である H1975、A549 細胞、大腸癌細胞株である DLD-1、WiDr 細胞は JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) 及び ATCC (Manassas, VA, USA) より入手した。これらの細胞株は 10% fetal bovine serum (FBS)、penicillin/streptomycin を含む Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) 培地で継代培養した。ヒトナチュラルキラー (NK) 細胞株である KHYG-1 細胞は JCRB より入手し、100U recombinant human IL-2、10% FBS、penicillin/streptomycin を含む RPMI-1640 培地で継代培養した。

抗体、試薬

ガラス板に対して 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer (PC modifier-C, Daiichi Kigyo, Japan) を使用し、マイクロ・ナノ基板作製時に、Parylene-C (Specialty Coating Systems, USA)、positive photoresist (PR; S1818 Shipley, USA) を使用した。免疫蛍光染色にマウス抗ヒト α -tubulin 抗体 (clone DM1A; eBioscience Inc., San Diego, CA)、マウス抗ヒト dynein intermediate chain 1 抗体 (Abcam, Cambridge, UK) を使用した。生細胞ラベルには 5- (and 6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan) を使用した。生/死細胞アッセイには、Annexin V Alexa Flour 488 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA)、Ethidium Homodimer-1 (EthD-1; Molecular Probes, Inc.) を使用した。リソソーム染色には、Cell Navigator Lysosome Staining Kit Red Fluorescence (AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA, USA) を使用した。細胞デブリスの流動性を捉えるために、FluoSpheres Carboxylate-Modified Microspheres (0.2 μ M, yellow-green fluorescent; Molecular Probes, Inc.) を使用した。ヌクレオシドを検出するために、Click-iT Plus EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, a nucleoside analogue of thymidine) Alexa Fluor 594 Imaging Kits (Molecular Probes, Inc.) を使用した。ホルマリン固定パラフィン包埋

組織の免疫組織化学染色は、LSAB2 Kit/HRP (Dako, Glostrup, Denmark)を使用した。

マイクロ・ナノ基板の作製

最初に、ガラス基板上に MPC ポリマー層を形成させた (Ishihara K. et al., 1990)。MPC 溶液を付着させた後、2,000 rpm で 30 秒間回転させ、クリーンベンチ内で室温 20 分間、基板を乾燥させ、ポリマー層を均一に形成させた。その後、基板を 70℃、4 時間、熱処理・脱水することで、MPC ポリマーを基板に共有結合させた。次に、厚さ 1 μm の poly(p-xylylene) (Parylene -C) dry film mask (パリレン) を MPC ポリマー層に付着させた。パリレンは、Parylene deposition machine (Labcoater PDS2010, Specialty Coating Systems, USA) を使用して化学蒸着により、透明な膜を形成させた。最後に、半導体製作に用いられる微細加工技術を応用して、基板を削るエッチングを行った (Kuribayashi K. et al., 2010)。MPC ポリマー・パリレン層上にエッチングを行わない部分のみ、photoresist (PR) を付着 (パターン化) させた。Glass mask (SUSS Micro Tes: MA-6, Germany) を通して紫外線を照射後、NMD-3 (2.38% Tetramethyl Ammonium Hydroxide) 現像液を使用して、PR のみ現像した。Inductively coupled plasma etching system (EIS-700, ELIONIX INC, Tokyo, Japan) を使用して、酸素 (O_2) plasma (50 W、4.5 分間) でエッチングを行い、パターン化した部分の MPC ポリマー・パリレン層を除去した。エッチングされた粗さは、共焦点レーザー顕微鏡 (VK-X250; Keyence Corporation, Osaka, Japan) を使用して解析した。

マイクロ・ナノ基板を用いた細胞培養

今回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直径 30 μm のマイクロスケールのパターンを持つ。実際に細胞を播種する前に、1×PBS(+) 下に一晚浸けて置き、パリレン層を穏やかに剥がした。その後、MilliQ 水で 1 回洗浄、70% エタノールで 10 分間滅菌して、クリーンベンチ内で完全に乾燥させた。その後、ペトリデッシュの四隅に少量のワセリンを塗布して、マイクロ・ナノ基板を固定した。マイクロ・ナノ基板を培地で 3 回洗浄して、乾燥を避けるために細胞培養まで 1 mL の培地に浸した。1-3×10⁶ 癌細胞を 3 mL の 10% FBS DMEM に懸濁して、細胞懸濁液をマイクロ・ナノ基板上に穏やかに播種後、37℃、CO₂ インキュベーター内で一晚培養し、足場依存性の微小腫瘍を形成させた。

マウス

本実験に使用したマウスは、C.B-17 / Icr-scid/scidJcl マウスであり、CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan) から入手した。このマウス(重症複合免疫不全マウス; severe combined immunodeficiency, SCID)は、SPF (Specific Pathogen Free) の施設内で繁殖及び飼育されたものである。なお、本実験における全ての動物実験は、「北海道大学動物実験に関する規程」に従って行った。

マウス腹腔への PDAC 細胞の投与

雄 SCID マウス(6-8 週齢)に対して CFSE 標識を行った PCI-55 細胞と標識を行っていない PCI-55 細胞(5×10^6 個)の混合物を 200 μ L PBS で懸濁させて腹腔内投与した。投与後、3 日で腹膜を回収し、凍結組織切片作製用包埋剤 Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) を用いて凍結切片を作製した。

免疫蛍光染色

マイクロ・ナノ基板上に形成させた足場依存性の微小腫瘍を、4% パラホルムアルデヒドで室温、20 分固定した。0.5% Triton X-100 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含む PBS によって 20 分間の細胞透過処理を行った後、70% メタノールで 5 分間再度固定した。抗体の非特異反応を抑制するため、0.1% 正常ヤギ血清を含む PBST (0.05% Tween-20 in PBS) で 10 分間ブロッキングを行った。一次抗体を 4°C で 2 時間反応させ、二次抗体として Alexa Fluor 標識ポリクローナル抗体を室温で 60 分間反応させた。タイムラプス撮影及び高解像度二次元 (two-dimensional, 2D) 撮影は、倒立型蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-X700 and BZ-9000; Keyence Corporation) を使用した。三次元 (three-dimensional, 3D) 解析は、スペクトルイメージング共焦点顕微鏡 (Nikon-A1R; Nikon Instech Co., Ltd., Tokyo, Japan)、NIS-Elements AR Ver 4.60.00 software (Nikon) を使用して画像再構築を行った。

免疫組織化学染色

本研究では、組織学的に PDAC であると認められ、北海道消化器科病院 (Sapporo, Japan) にて外科的に切除された 10 症例を使用した。患者より採取した臨床検体を使用する実験は、本学医学部における倫理委員会の承認を得て行っ

た。ヒト PDAC 病理検体のホルマリン固定パラフィン包埋組織を 3 μm に薄切し、脱パラフィンした後、オートクレーブにて 121°C、20 分間抗原賦活化を行った。非特異反応を抑制するため、3% 正常ヤギ血清で 30 分間ブロッキングを行った。内因性ペルオキシダーゼの不活化のため、3% 過酸化水素水で 10 分間反応後、一次抗体を室温で 60 分間反応させた。最後に、ビオチン化二次抗体及びストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (LSAB2 kit; Dako) を反応させ、diaminobenzidine (Dako) にて検出を行った。核染色には、マイヤーのヘマトキシレンを使用した。

生/死細胞アッセイ

マイクロ・ナノ基板上に形成させた PDAC 微小腫瘍が入っているペトリデッシュ内の 3 mL DMEM に対して Annexin V Alexa Fluor 488 (25 μL)、EthD-1 (2 μL) を添加した。タイムラプス撮影は、倒立型蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-X700 and BZ-9000; Keyence Corporation) を使用した。

アポトーシス誘導

PCI-55 細胞を 60 mm 培養ディッシュにて一晩培養した。PBS で 2 回洗浄した後、PCI-55 細胞に Bio-Rad GS Gene Linker (Bio-Rad, San Jose, CA) を使用して 250 mJ/cm^2 UV を照射した。再度 PBS で洗浄した後、無血清 DMEM で 2 時間培養を行った。PCI-55 死細胞及び、そのデブリスをセルスクレーパーにて回収し、死細胞を餌として添加する実験に使用した。

Edu 検出

PDAC 細胞 (5×10^5 個) を 10 μM EdU を含む培地下で、60 mm 培養ディッシュにて 24 時間培養した。次に、4% パラホルムアルデヒドを含む PBST で室温、20 分間固定し、0.5% TritonX-100 を含む PBS で 20 分間透過処理した。AlexaFluor 555 標識 Click-iT EdU imaging Kits (Invitrogen) を用いて、EdU を検出した。

統計解析

統計解析手法は、Student's *t*-test と反復測の定分散分析を用い、*P* 値が 0.05 未満を有意差とした。

実験結果

Ad-MCA 様の足場依存性の微小腫瘍組織の自己組織化を誘導できる新規 3D 培養デバイスである、「マイクロ・ナノ基板」を開発した

生きている PDAC の腫瘍ダイナミクスを体外で可視化するために、微細加工技術 (Kuribayashi K. et al., 2010) を応用し、新規 3D 培養デバイスである、「マイクロ・ナノ基板」を独自に開発した (図 1A, B)。具体的には、ガラス基板に MPC ポリマー、パリレンを付着させ、その上にエッチングしない部分を photoresist (PR) 蒸着させることで、パターン化した。パターン化された基板は、 O_2 プラズマを使用して PR が蒸着していない MPC ポリマー、パリレン層のみエッチングした。PR は、除去してから使用した。基板の表面の粗さを解析するため、共焦点レーザー顕微鏡 (VK-X250; Keyence Corporation) を使用して、算術平均の高さ (Ra)、最大の高さ (Rz) を検討した (図 1C-E)。マイクロ・ナノ基板は、従来のマイクロ基板と比較して、Ra 及び Rz いずれも、約 2 倍の表面の粗さがあった。次に、基板のマイクロスケールパターンが削られていることを定量解析するため、算術平均のピーク円形率 (Spc)、展開面積比 (Sdr) を検討した。Spc は、従来品よりも約 2 倍であり、Sdr は、約 4.8 倍であった。以上の結果より、本基板は従来のマイクロ基板よりも、スライドカバーガラスにナノスケールの粗さを持つマイクロスケールパターンが形成されることが示された。

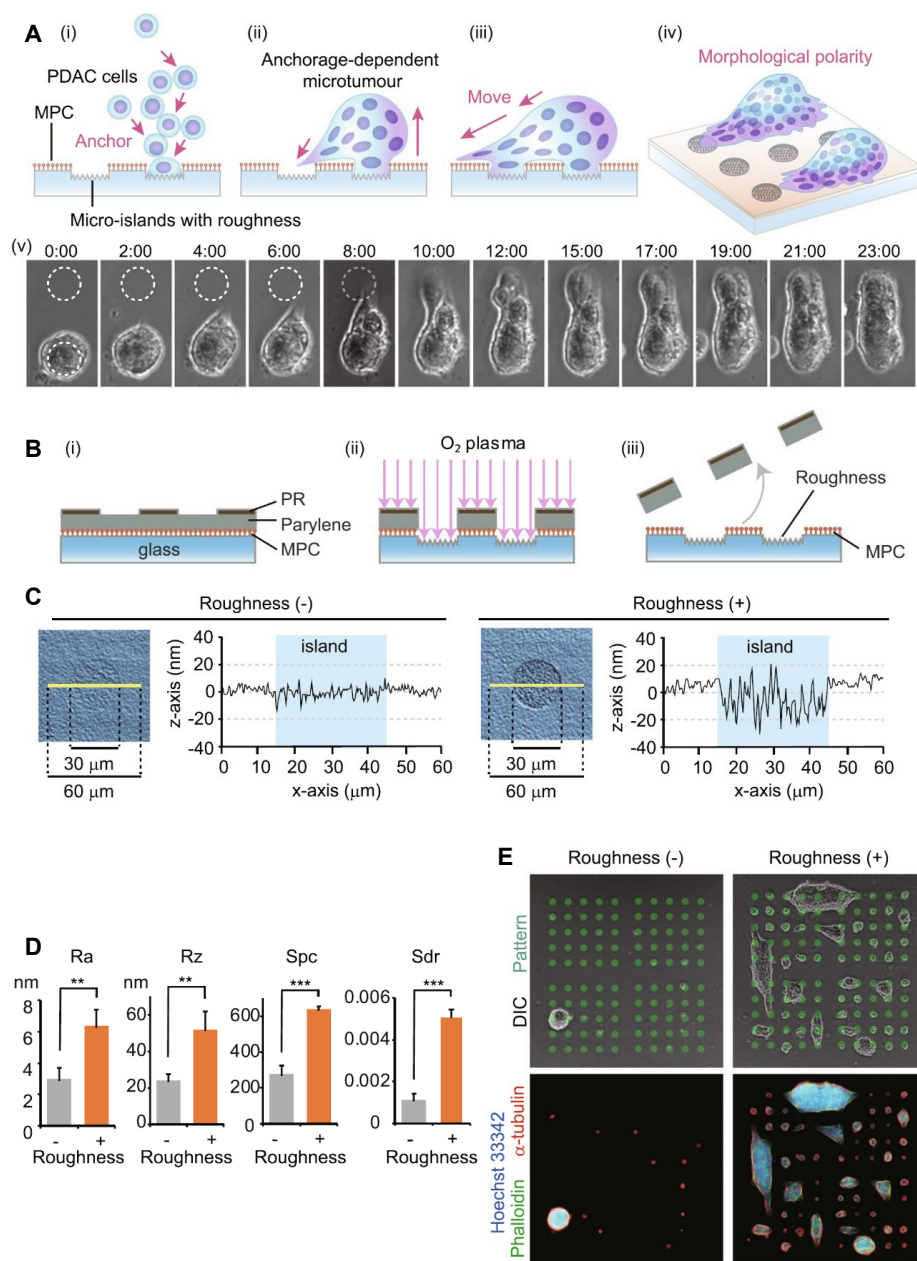


図 1. マイクロ・ナノ基板は、PDAC 細胞を Ad-MCA 様の足場依存性の微小腫瘍に自己組織化させる

PCI-55 細胞を直径 30 μm のマイクロスケールパターンを施したマイクロ・ナノ基板又は施していないマイクロ基板(従来品)上に一晩培養した。(A) 模式図。1-3×10⁶ PDAC 細胞を 10% FBS DMEM にて一晩培養した。(i) PDAC 細胞が直径 30 μm のマイクロナノパターンに入り込み、(ii) 足場依存的に PDAC 微小腫瘍を形成する。(iii) 形成した PDAC 微小腫瘍は、組織運動極性を示し、新たなマイクロスケールパターンを目指して移動する。(iv) マイクロ・ナノ基板を上から観察した状態である。(v) タイムラプス撮影した結果、PCI-55 微小腫瘍の形成が観察された。時間は、hh:mm を示す。(B) 概略図。(i) ナノスケールの粗さを持つマイクロ・ナノ基板は、微細加工技術を応用して作製した。(ii) MPC ポリマー、パリレン層に対して O₂ プラズマを使用してエッチングを行った。(iii) 使用前に、PR を剥がした。(C, D) 共焦点レーザー顕微鏡を使用して、マイクロスケールパターンにおける粗さについて、定量解析を行った。(C) グラフは、強拡大(×10000)で撮影後、高低差にて粗さを解析したもの。(D) マイクロ・ナノ基板の表面の粗さを解析するため、算術平均の高さ(Ra)、最大の高さ(Rz)を測定した。基板のマイクロスケールパターンが削られていることを確認するため、算術平均のピーク円形率(Spc)、展開面積比(Sdr)を測定した。(E) 上図は、微分干渉画像。下図は、Hoechst 33342、Phalloidin 及び、抗 α-tubulin 抗体を使用して蛍光免疫染色した画像。緑色のドットは、マイクロスケールパターンを示す。これらの実験結果は独立した 6 回の結果の平均値を示す。*P<0.01, ***P<0.001

PDAC、頭頸部癌、肺癌、大腸癌細胞株は、マイクロ・ナノ基板上に微小腫瘍を自己組織化する

PDAC 細胞はマイクロ・ナノ基板上で一晩培養すると、基板の MPC ポリマー（細胞非接着面）を跨いで Ad-MCA 様の複数の微小腫瘍を自己組織化した（図 2A, B）。他種癌の細胞株について、基板上で自己組織化するかどうかを検討した。頭頸部癌、肺癌、大腸癌細胞株などの他種癌の細胞株も基板上の培養によって、PDAC 細胞株と同様に微小腫瘍を自己組織化した（図 2C）。

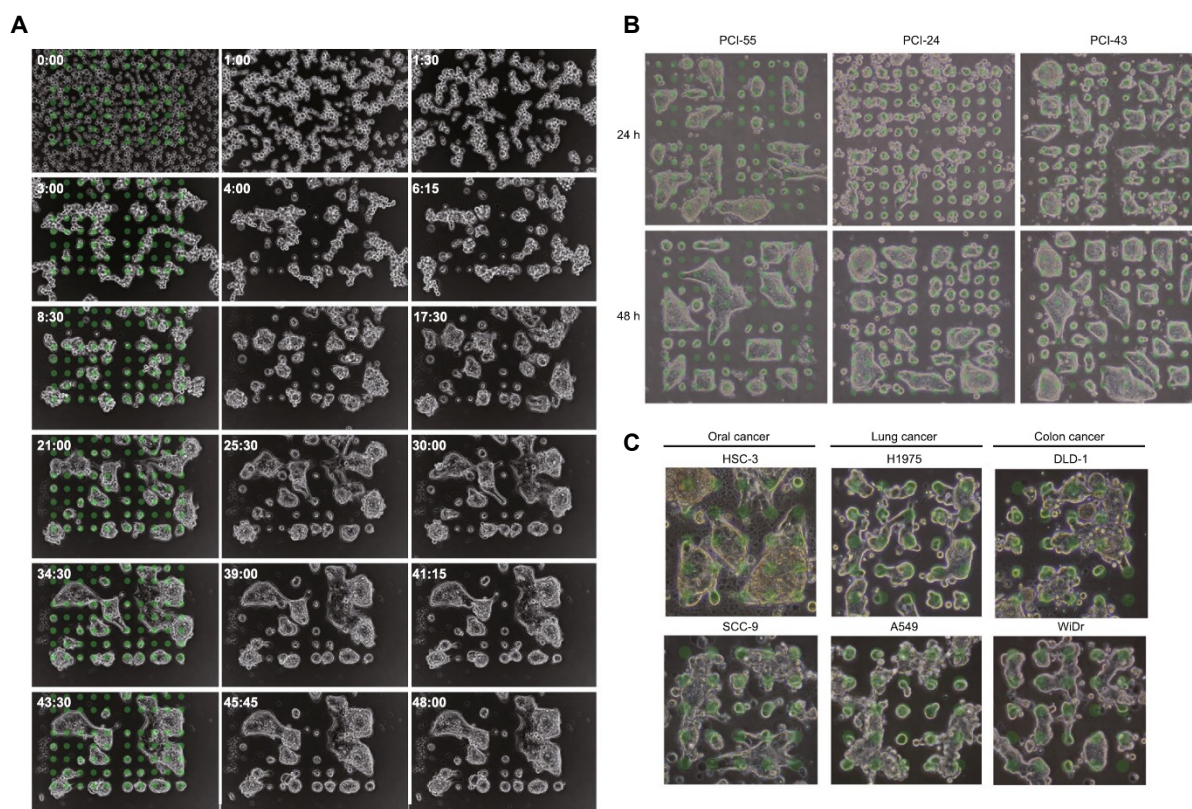


図 2. PDAC、頭頸部癌、肺癌、大腸癌細胞株は、マイクロ・ナノ基板上に微小腫瘍を自己組織化する

(A) マイクロ・ナノ基板上に培養した PCI-55 細胞のタイムラプス画像の一部である。時間は、hh:mm を示す。(B) マイクロ・ナノ基板上に PDAC 細胞株である、PCI-55、PCI-24、PCI-43 を培養した。(C) マイクロ・ナノ基板上に、他種の癌細胞を培養した。頭頸部癌、肺癌、大腸癌細胞株をマイクロ・ナノ基板上に一晩培養を行ったところ、様々な形態を示す足場依存性の微小腫瘍が形成した。緑色のドットは、細胞接着が可能な 30 μm のマイクロスケールパターンを示す(A-C)。

PDAC 微小腫瘍は、組織運動極性を示す

自己組織化は、細胞が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パターンにおいて、効率的に誘導された（図 3A, B）。また、PDAC 微小腫瘍は、マイクロスケールパターンの大きさである 30 μm を超えると、隣接するパターンに跨ぐことがわかった（図 3C-E）。3D 再構築画像解析によって、PDAC 微小腫瘍はパタ

ーンを跨ぐ方向性が明瞭であり、組織運動極性を示すことを明らかにした(図 3F)。

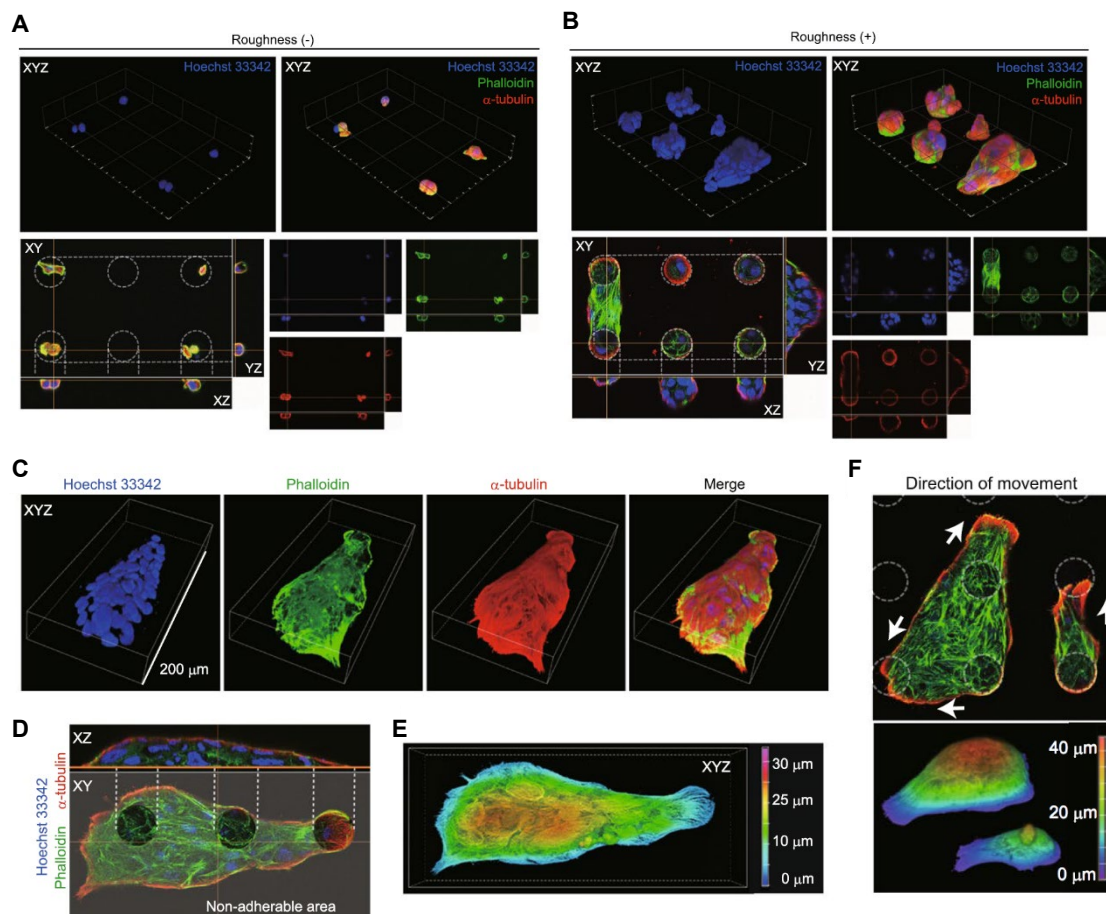


図 3. 足場依存性の PCI-55 微小腫瘍は、組織運動極性を示す

(A-F) PCI-55 微小腫瘍における三次元 (3D) 再構築蛍光画像である。(A) 蛍光顕微鏡画像は、PCI-55 細胞を粗さのないマイクロ基板(従来品)上に一晚培養したもの。(B) マイクロ・ナノ基板上に一晚培養した PCI-55 細胞の蛍光顕微鏡画像である。(C) PCI-55 微小腫瘍は、3 個のマイクロスケールパターンに足場を形成した。(D) マイクロ・ナノ基板の底面部を示す。灰色背景は、MPC ポリマーによる細胞非接着面を示す。(E) 標高図は、PCI-55 微小腫瘍の高さを可視化したもの。(F) 足場依存性の PCI-55 微小腫瘍は、組織運動極性を示し、矢印の方向に移動していることがわかった。

PDAC 微小腫瘍は、マイクロ・ナノ基板上で細胞内細胞浸潤(エントーシス)によって誘導される

次に、足場依存性の PDAC 微小腫瘍の自己組織化がマイクロ・ナノ基板上でどのように誘導されるのかを検討した。タイムラプス撮影によって、最初にマイクロスケールパターンに接着した細胞の中に、少なくとも 8 個の PCI-55 細胞が入り込んでいる(細胞内細胞浸潤, エントーシス, Overholtzer M. et al., 2007 ; Kroemer G. et al., 2014) (図 4A) ことがわかった。興味深いことに、エントーシスは可逆的であり、細胞死を伴わなかった(図 4B)。これらの結果より、エントーシスはヒト PDAC 病理組織で観察されるような、ほとんどの細胞内細胞が最終的に細胞死を示すもの

(Hamann J .C. et al., 2017)とは異なることが示された。PCI-55 細胞を基板上に培養したところ、少なくとも4個の細胞がポリープ状に細胞内細胞構造を形成した(図4C)。3D 再構築画像解析によって、CFSE 緑色蛍光強度が約 1/2 に減弱した PCI-55 微小腫瘍には、少なくとも6個の CFSE^{High} 標識 PCI-55 細胞が入り込んでいることがわかった。また、CFSE^{low} と CFSE^{high} 標識 PCI-55 細胞の隙間には病理学的な特徴である管腔構造が観察された(図4D)。PDAC 微小腫瘍は、マイクロスケールパターン周縁部において、 α -tubulin 及び phalloidin が高発現であることから、微小管及びアクチンフィラメントの形成が活発化することがわかった(図4E)。

以上の結果より、PDAC 微小腫瘍は、粗さのあるマイクロスケールパターン上でエントーシスを介して誘導され、成熟した微小腫瘍へと分化することが示された。

PDAC 微小腫瘍の体表面は、 α -tubulin 発現に覆われる

3D 培養において、 α -tubulin はスフェロイドの体表面に発現することが報告されている(Matsuda Y. et al., 2011)。本研究でも、PDAC 微小腫瘍の体表面において、 α -tubulin の発現を増強することがわかった(図4C-E)。微小管阻害剤である、ノコダゾールは有糸分裂を標的とする抗癌剤である(Jordan M.A. et al., 2004)。そこで、基板上に形成させた PDAC 微小腫瘍におけるノコダゾールの影響を検討した。PCI-55 微小腫瘍に対して、1 μ M ノコダゾールを暴露したところ、足場が弱くなり、スフェロイド様の形態を示すことがわかった(図4F)。また、死細胞マーカーである EthD-1 陰性の生きている PCI-55 細胞が微小腫瘍の外側に多数、散在していた(図4G, H)。

in vivo において PCI-55 細胞が微小腫瘍を形成し、体表面に α -tubulin を発現するかどうか検討するため、SCID マウスに CFSE(緑)で標識した PCI-55 細胞を腹腔内移植した。投与して3日後、緑色の蛍光を有する微小腫瘍が腹膜上に形成され、*in vitro*と同様に、微小腫瘍の体表面に α -tubulin の発現がみられた(図4I)。

以上の結果より、 α -tubulin で構成される微小管は、足場依存性の PDAC 微小腫瘍の形成に関与していることが示唆された。

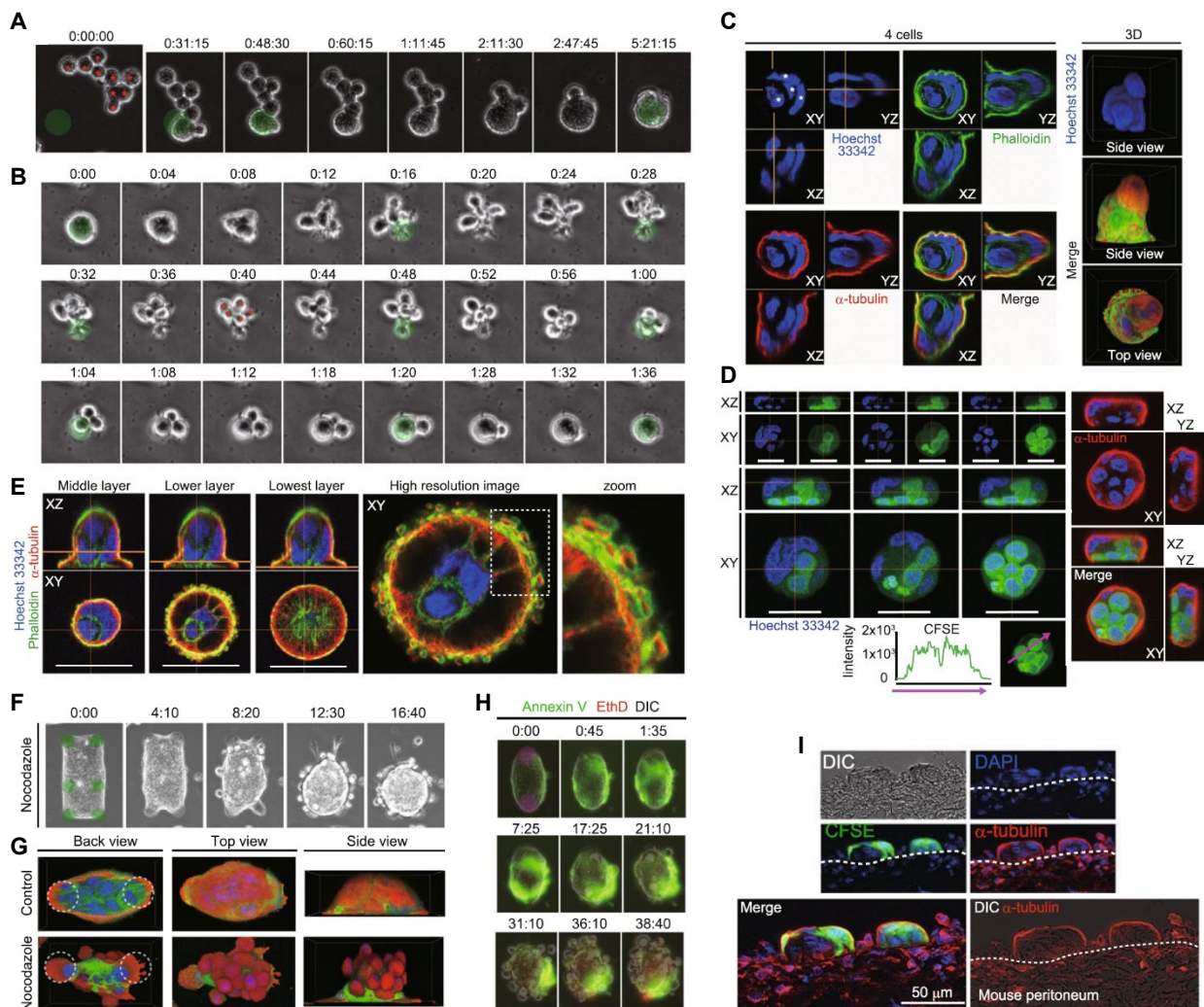


図 4. マイクロスケールパターン上での細胞内細胞浸潤を介して PDAC 細胞は足場依存性の微小腫瘍を形成し、体表面に α -tubulin の高発現を示す

(A) タイムラプス画像。少なくとも、9 個の PCI-55 細胞がエントーシスを介して、マイクロスケールパターン上で足場を形成した。(B) マイクロ・ナノ基板上に播種した PCI-55 細胞をライブイメージング解析した。マイクロ・ナノ基板上的エントーシスは、可逆性を示した。(C) エントーシスによって形成された PCI-55 微小腫瘍は、ポリープ状を示した。(D) CFSE^{high} 標識 PCI-55 細胞は、微小腫瘍を形成している CFSE^{low} 標識 PCI-55 細胞の中に入り込んでいた。(D, E) 3D 撮影後に、再構築した断面画像である。自己組織化した CFSE 標識 PCI-55 微小腫瘍は、体表面に α -tubulin の強発現が観察された。(F, G) PCI-55 微小腫瘍に対して 1 μ M ノコダゾールを 24 時間暴露しながら、タイムラプス撮影を行った。(G) 3D 撮影後に、再構築画像解析した。(H) 生/死細胞アッセイを行った。マイクロ・ナノ基板上に自己組織化させた PCI-55 微小腫瘍に、1 μ M ノコダゾール、Annexin V Alexa Flour 488 及び、EthD-1 を含む培地下でさらに培養を行った。(I) CFSE 標識 PCI-55 細胞を SCID マウスの腹腔内に投与したところ、腹膜上に PCI-55 微小腫瘍が形成され、体表面に強い α -tubulin の発現が観察された。時間は、hh:mm:ss (A)、hh:mm (B, F, H) を示す。Bars: 30 μ m (D, E), 50 μ m (I)

ヒト PDAC 病理組織において、微小腫瘍の体表面は、 α -tubulin の発現を示す

次に、PDAC 微小腫瘍の体表面にみられた α -tubulin の臨床的な関連性を解析するため、ヒト PDAC 病理組織と比較検討した。PanIN 病変及び浸潤性 PDAC において、腫瘍部位の体表面に、*in vitro* と類似した α -tubulin の発現がみられ、生細胞及び死細胞によって形成された細胞内細胞構造が観察された。一方、正常な膵管上皮では観察されなかった(図 5A, B, C; 左図)。生細胞を含む細胞内細胞構造が膵癌患者 11 人の PDAC 病理標本のうち 9 人で観察され(図 5D、矢頭)、死細胞を含む細胞内細胞構造(図 5D、矢印)と比較して、高頻度で観察された。特に、 α -tubulin の体表面の発現は、高悪性度の PanIN 病変及び、浸潤性 PDAC で強くみられた。浸潤性 PDAC の大きさが約 30 μ m であり、管腔構造も観察された(図 5C, D)。以上の結果より、マイクロ・ナノ基板上の PDAC 微小腫瘍は、ヒト PDAC 病理組織と、大きさ、細胞内細胞構造、管腔形成を含む構造が非常に類似していることが示された。

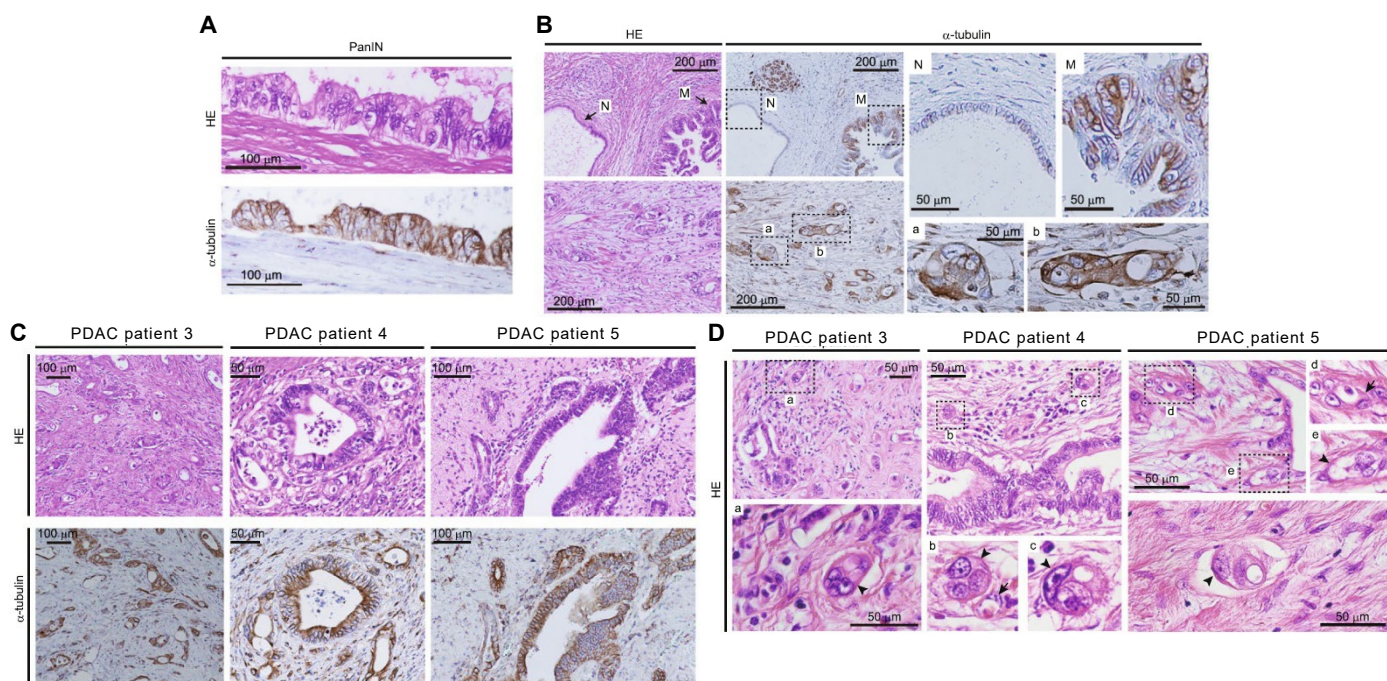


図 5. ヒト PDAC 微小腫瘍の体表面において、 α -tubulin が強く発現する

(A-C)ヒト PDAC 病理標本を使用して、組織学的な解析を行った。ヒト PDAC 微小腫瘍において、細胞内細胞構造及び、その体表面に α -tubulin の発現が観察された。(A)PDAC 患者 1 から得られた組織切片における PanIN 病変に対して、H&E、抗 α -tubulin 抗体染色を行った。(B)PDAC 患者 2 から得られた組織切片における正常膵管、PanIN(上図)及び、浸潤性 PDAC(下図)の組織像である。N: normal pancreatic duct, M: malignant lesion in pancreatic duct (C, D)PDAC 患者 11 人の内、患者 3、4、5 から得られた組織切片における浸潤性 PDAC の組織像である。矢頭は、生細胞によって形成された細胞内細胞構造を示す。矢印は、死細胞によって形成された細胞内細胞構造を示す。

生きている PDAC 微小腫瘍は、死細胞のデブリスを捉え、伸長する

マイクロ・ナノ基板上的 PDAC 微小腫瘍は、細胞複合体から成る巨大な葉状仮足を形成し、膜状の α -tubulin によって覆われることから、PDAC 微小腫瘍の形態学的な極性が単一細胞のものと非常に類似していることが示された(図 6A, B)。そこで、PDAC 微小腫瘍が単一の個体としてダイナミクスを示すのかを検討するため、タイムラプス撮影を行った。生きている PCI-55 微小腫瘍は活発に動き廻り、大きく伸長しながら葉状仮足や糸状仮足を用いて培地中の細胞デブリスを捉えることがわかった(図 6C)。次に、生きている PDAC 微小腫瘍が死細胞のデブリスを取り込むかどうかを検討するため、Annexin V(緑)と EthD-1(赤)を使用した生/死細胞アッセイ(Vermes I. et al., 1995)を行った。生きている PCI-55 微小腫瘍は、培地中の浮遊しているアポトーシス細胞や死細胞のデブリスを捉えるために、巨大な葉状仮足や糸状仮足を形成することがわかった(図 6D)。以上の結果より、PDAC 微小腫瘍は伸長しながら、細胞複合体から成る巨大な葉状仮足や糸状仮足を用いて死細胞デブリスを捉えることが示された。

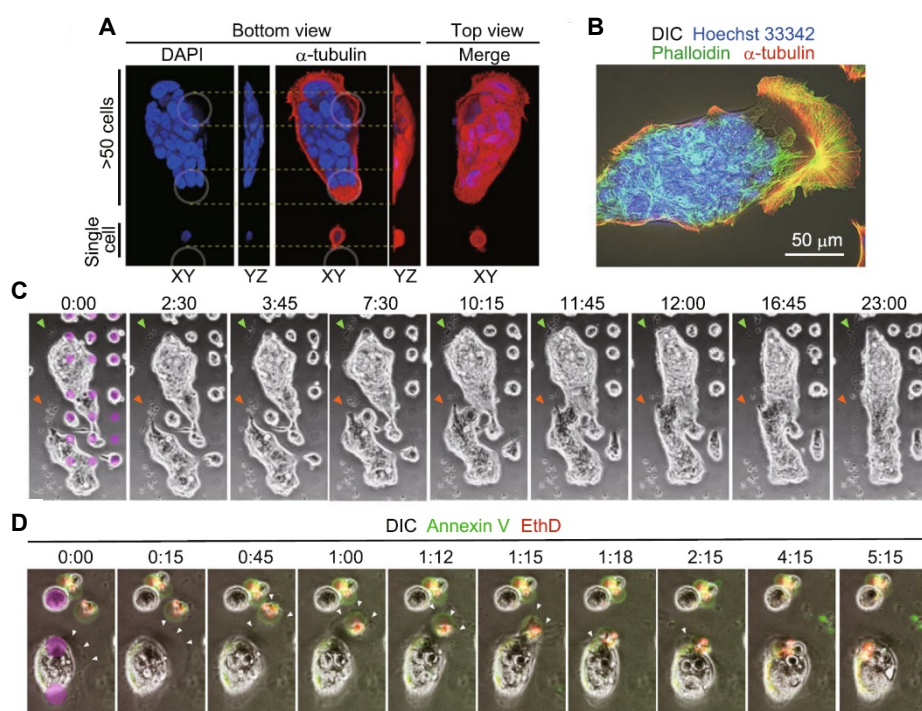


図 6. 生きている足場依存性の PDAC 微小腫瘍は、死細胞デブリスを捉える

(A, B) 足場依存性の PCI-55 微小腫瘍における形態学的な解析を行った。微小腫瘍は、マイクロスケールパターンを跨ぎ、大きく伸長した。(B) PCI-55 微小腫瘍は、細胞複合体から成る巨大な葉状仮足を形成した。(C) タイムラプス撮影によって、PCI-55 微小腫瘍は培地中の細胞デブリスを取り込みながら動き廻る様子を捉えた。(D) タイムラプス撮影を使用して、生/死細胞アッセイを行った。自己組織化させた PCI-55 微小腫瘍に、Annexin V Alexa Fluor 488(緑)、EthD-1(赤)を添加し、さらに培養した。生きている PCI-55 微小腫瘍は、浮遊しているアポトーシス細胞や死細胞デブリスを捉えるために、巨大な葉状仮足を形成した。時間は、hh:mm を示す。

生きている PDAC 微小腫瘍は、死細胞デブリスを捉え、フォスファチジルセリンを体表面に蓄積させる

死細胞デブリスは、PCI-55 微小腫瘍の周囲に蓄積されていることがわかった。この結果より、微小腫瘍はデブリスを吸引してから捉えていることが示唆された(図 6C, D)。そこで、培地中に緑色蛍光ナノビーズを添加してタイムラプス撮影を行った。緑色蛍光ナノビーズは、PCI-55 微小腫瘍に向かって流動的に吸い込まれることがわかった(図 7A)。この結果より、生きている PDAC 微小腫瘍の表面には、強い吸引力があることが示唆された。また、PDAC 微小腫瘍は、体表面に Annexin V で標識されるフォスファチジルセリン (Phosphatidylserine, PS) を蓄積することを高頻度で観察した(図 7B)。PS を細胞膜に発現させることは、癌の免疫回避に大きく関与することが報告されている (Utsuhi T. et al., 1991 ; Balasubramanian K. et al., 2007 ; Lima L.G. et al., 2009 ; Birge R.B. et al., 2016)。そこで、PDAC 微小腫瘍は PS を体表面に蓄積することで免疫からの攻撃を回避するかどうかを検討するため、ヒトナチュラルキラー (NK) 細胞株である KHYG-1 細胞と共培養を行った。PCI-55 微小腫瘍は、KHYG-1 細胞からの攻撃を回避することがわかった(図 7C, D)。以上の結果より、生きている PDAC 微小腫瘍は死細胞デブリスを捉え、体表面に PS を蓄積されることで、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。

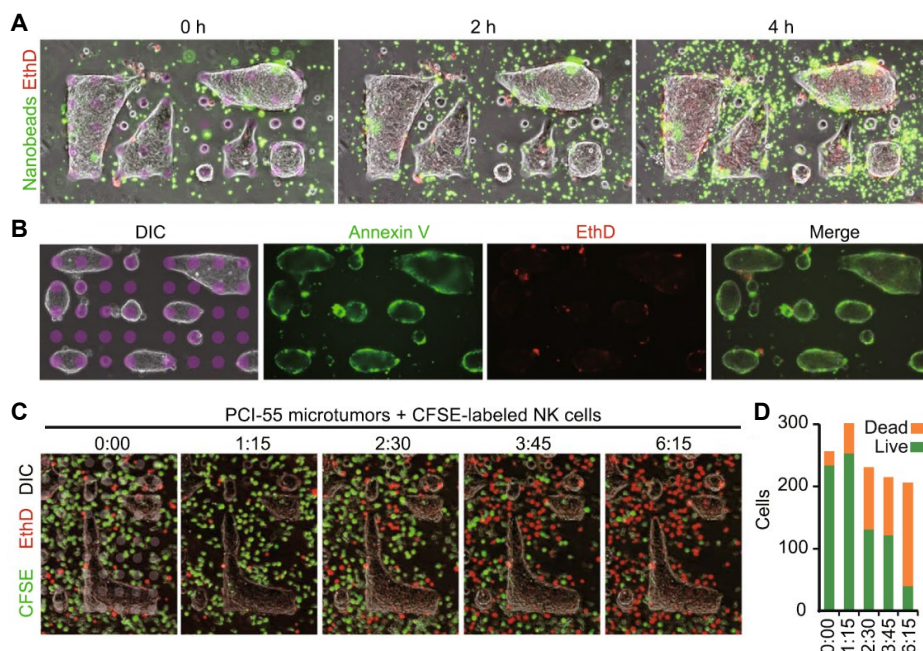


図 7. 生きている足場依存性の PDAC 微小腫瘍は、細胞死のフェノタイプを示す

(A)タイムラプス撮影を使用して、PCI-55 微小腫瘍の吸引力を可視化した。Alexa488 標識ナノビーズ(緑)を含んだ培地下で PCI-55 微小腫瘍を培養した。PCI-55 微小腫瘍の周囲にナノビーズが集積していたことから、生きている PDAC 微小腫瘍の体表面は強い吸引力があることが示された。(B) PCI-55 微小腫瘍は、体表面に Annexin V を大量に蓄積した。(C, D)CFSE 標識 NK 細胞は、PCI-55 微小腫瘍と共培養しても攻撃しなかった。(D) 共培養によって、NK 細胞の死細胞は亢進したが、PCI-55 微小腫瘍によるものではなかった。時間は、hh:mm を示す。

生きている PDAC 微小腫瘍は、死細胞デブリスを捕食する

Annexin V、EthD-1 を使用して PCI-55 微小腫瘍の生/死細胞アッセイを行ったところ、生きている PDAC 微小腫瘍は、Annexin V を体表面に蓄積したが、EthD-1 を細胞内に蓄積した(図 8A, B)。そこで、生きている PDAC 微小腫瘍は死細胞デブリスを捕食するかどうかを検討した。具体的には、餌として単層培養した PCI-55 細胞に UV を照射させて産出した死細胞デブリス(図 8C)を用いて、PDAC 微小腫瘍のダイナミクス解析を行った。PDAC 微小腫瘍は、死細胞デブリスを寄り集め、微小腫瘍の周囲に EthD-1(赤色)が観察された(図 8D)。さらに、成熟した微小腫瘍は、死細胞のデブリスを捕食することがわかった(図 8E)。死細胞デブリスを捕食した 48 時間後の微小腫瘍の大きさは、コントロールと比較して劇的に大きくなっていた(図 8F)。これらの結果より、PDAC 微小腫瘍は核酸に対して高い親和性を有する EthD-1 などの核成分を取り込むことが示され、オートファジー・リソソーム異化作用が核断片まで及んでいたことが示唆された(Perera R.M. et al., 2015)。

最後に、PDAC 微小腫瘍は死細胞由来のヌクレオシドを直接取り込むかどうかを検討するため、チミジンのヌクレオシド類似体である Edu を取り込ませた PCI-55 細胞を UV 照射させた後、CFSE 標識 PCI-55 微小腫瘍に供した。PDAC 微小腫瘍の体表面に Edu 陽性死細胞デブリスが多量に蓄積していることが観察された(図 8G)。3D 再構築画像解析によって、微小腫瘍の液胞に多数の Edu が認められた(図 8H)。一部の Edu は、リソソームで検出された(図 8I)。これらの結果より、PDAC 微小腫瘍はエンドサイトーシスを介してヌクレオシド(Edu)を直接、液胞に取り込むことが示された。

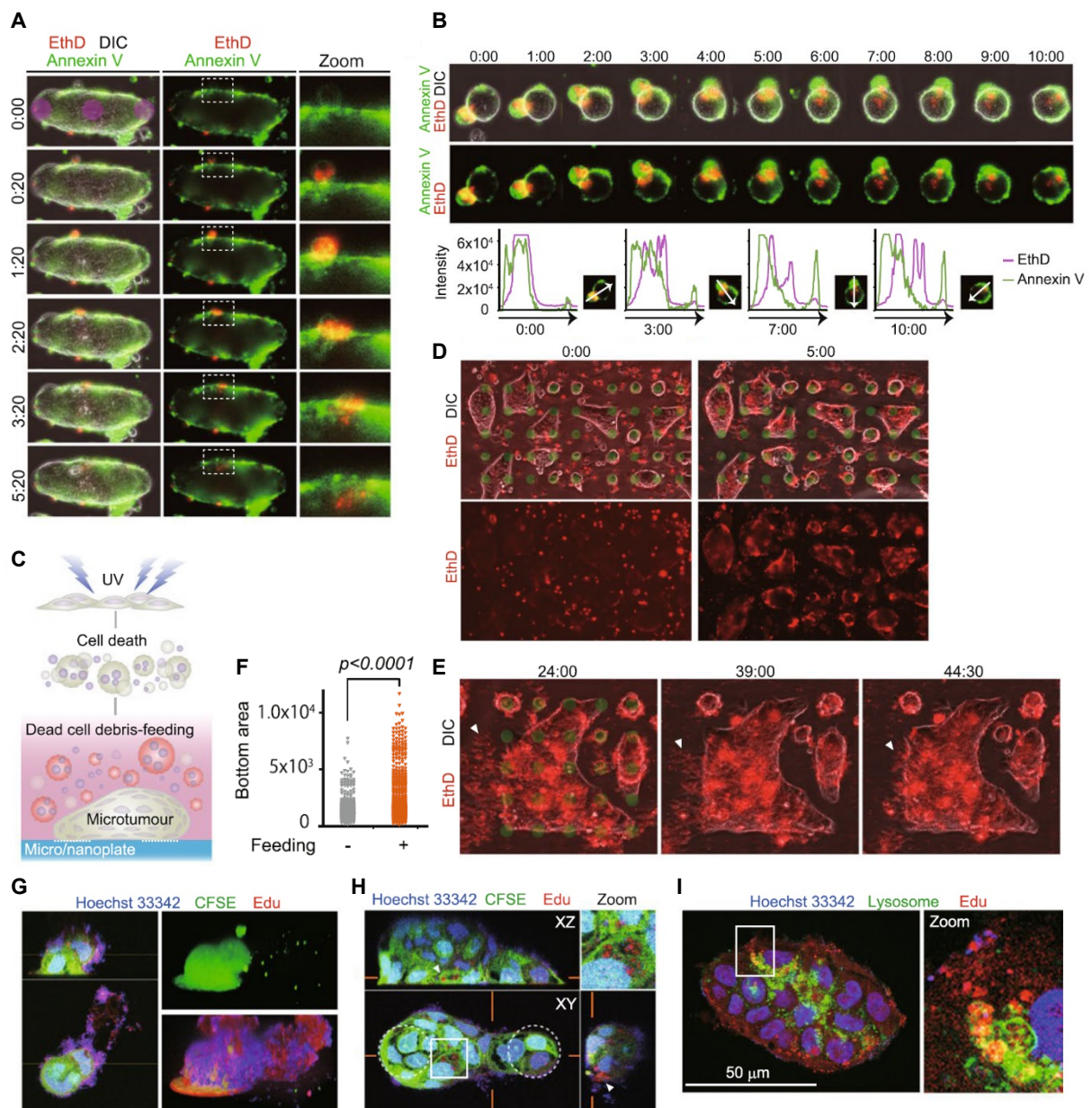


図 8. 生きている PDAC 微小腫瘍は、死細胞のデブリスを捕食する

(A, B) タイムラプス撮影を使用して、生/死細胞アッセイを行った。(A) 生きている PCI-55 微小腫瘍は、体表面で初期アポトーシス細胞から後期アポトーシス細胞へと誘導させ、微小腫瘍内に取り込むことが観察された。(B) Annexin V 陽性/EthD-1 陽性細胞を取り込んだ PDAC 微小腫瘍は、Annexin V (緑) を体表面に蓄積したが、EthD-1 (赤) を細胞内に蓄積した。(C-I) UV 照射による細胞死を誘発後、餌として死細胞デブリスを PCI-55 微小腫瘍に供した。(C) 模式図は、プロトコル。(D) タイムラプス撮影によって、PCI-55 微小腫瘍の体表面に、EthD-1 の蛍光が観察された。(E, F) PCI-55 微小腫瘍は、死細胞デブリスを捕食しながら、大きく成長した。(E) 時間は、死細胞デブリスを添加した後の経過時間 (hh:mm) を示す。(F) 死細胞デブリスを供してから 48 時間後のマイクロ・ナノ基板底部における細胞数。(G-I) Edu (赤) を取り込ませた PCI-55 細胞を UV 照射後、CFSE 標識 PCI-55 微小腫瘍に供した。(G, H) 3D 再構築画像 (G)、共焦点画像 (H) は、CFSE 標識 PCI-55 微小腫瘍に Edu 陽性死細胞デブリスを供した際のもの。(H) PCI-55 微小腫瘍は、死細胞デブリス由来の Edu を微小腫瘍内に取り込んでいた。(I) リソソーム染色によって、PCI-55 微小腫瘍は一部の死細胞デブリス由来の Edu を取り込むことがわかった。

考察

本研究では、半導体技術を応用したガラス基板の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・ナノ基板を開発した(図 1, 2)。基板上の足場依存性の PDAC 微小腫瘍は、組織運動極性を示すことを明らかにした(図 3)。PDAC 微小腫瘍の自己組織化は、粗さのある細胞接着可能なマイクロスケールパターン上でエントーシスを介して誘導されることがわかった(図 4)。ヒト PDAC 病理標本で高頻度に観察されるエントーシスは、癌細胞の競合、細胞内細胞構造、あるいは細胞捕食(カニバリズム)の根本的なメカニズムとして知られている(Bot N.L., 2007 ; Overholtzer M. et al., 2007 ; Kroemer G. et al., 2014)。基板上の非常に限られたマイクロスケールパターンは、エントーシスの誘導が容易であった。この結果より、膵管の内腔の制限された部分で異常な多層増殖を示す PDAC の悪性腫瘍病変と類似している可能性が考えられた。

PDAC 微小腫瘍の体表面は、*in vitro*と*in vivo*の両方において、 α -tubulin の発現が増強し、覆われることがわかった(図 4, 5)。微小管阻害剤は、有糸分裂を標的とする抗癌剤である(Jordan M.A. et al., 2004 ; Dobbelsstein M. et al., 2014 ; Poruchynsky M.S. et al., 2015)。本研究では、微小管阻害剤を暴露した PCI-55 微小腫瘍の多くが足場非依存性のスフェロイド様の形態を示し、生きている PCI-55 細胞が微小腫瘍の外側に散在することを明らかにした(図 4)。この結果より、PDAC 微小腫瘍は微小管阻害剤を暴露すると、細胞死を誘導せず、生きている癌細胞を飛散させ、再発・転移につながる可能性があることが示唆された。

さらに、マイクロ・ナノ基板は生きた腫瘍のダイナミクスの可視化を可能にした。その結果、微小腫瘍は伸長しながら死細胞デブリスを取り込む様子を捉えることに成功した。PDAC 腫瘍の周囲の細胞死は、腫瘍の伸長を促進させるという報告もあることから(Seifert L. et al., 2016)、PDAC 微小腫瘍の周囲で生じた死細胞デブリスは、PDAC 微小腫瘍の伸長にも寄与することが示唆された。成熟 PDAC 微小腫瘍は死細胞デブリスを吸引して捉え、エンドサイトーシスを介してヌクレオシド(Edu)を直接、液胞に取り込み、死細胞由来のフォスファチジルセリン(PS)を微小腫瘍の体表面に蓄積させることを明らかにした(図 6, 7)。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(Utsuhi T. et al., 1991 ; Balasubramanian K. et al., 2007 ; Lima L.G. et al., 2009 ; Birge R.B. et al., 2016)ことから、成熟 PDAC 微小腫瘍は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。

本研究によって、PDAC の腫瘍ダイナミクスを体外で可視化することは、革新的な新規抗癌剤の開発に役立つことが示唆された。

第三章

膵管腺癌細胞の上皮間葉転換の状態に依存する

微小腫瘍のダイナミクス

緒言

EMT はバイナリー過程であると広く知られてきたが、最近、いくつかの中間型 (hybrid epithelial/mesenchymal) を介して進行する多段階の過程であることが報告された (Grigore A.D. et al., 2016 ; Pastushenko I. et al., 2018)。一方、膵癌モデルである KPC マウスにさらに EMT 誘導遺伝子である Snail または Twist を欠損させた KPC マウスにおいても、PDAC の浸潤・転移が KPC マウスと変わらず誘導されることが報告されている (Zheng X. et al., 2015 ; Aiello N.M. et al., 2017)。このように、EMT は癌の浸潤や転移に不可欠であるとされてきたが、定説とは不一致な報告が相次いでいる。このような不一致は、細胞レベルだけではなく、組織レベルにおける EMT の理解が不足しているからであると考えられる。EMT が細胞レベルで進行する際の PDAC のダイナミクス変化は、*in vitro* 及び、*in vivo* の両面から十分に検討されているが、EMT の進行による生きている PDAC 腫瘍のダイナミクスへの影響は検討されていない。そこで本研究では、マイクロ組織レベルの EMT の腫瘍ダイナミクスを理解するために、マイクロ・ナノ基板を使用して、異なる EMT の進行度を示す PDAC 細胞から自己組織化させた微小腫瘍のダイナミクス解析を行った。本研究によって、EMT の進行度は微小な癌組織レベルの挙動を変化させ、そのダイナミクスに影響を与える可能性があることを初めて示した。さらに、PDAC の重要な病理学的な特徴である管腔構造が生きている成熟した微小腫瘍においてどのように形成されるのかを明らかにした。

実験方法

抗体、試薬

ガラス板に対して 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer (PC modifier-C, Daiichi Kigyo, Japan) を使用し (Ishihara K. et al., 1990)、マイクロ・ナノ基板作製時に、Parylene-C (Specialty Coating Systems, IN, USA) 及び、positive photoresist (PR; S1818 Shipley, PA, USA) を使用した。PDAC 細胞株における KRAS 遺伝子変異解析には、LH Gene Mutation Detection Kit for KRAS Mutation Codons 12 and 13 (Wako, Osaka, Japan) を使用した。細胞生存率の解析には、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を使用した。ウエスタンブロッティング解析及び、免疫蛍光染色にラット抗ヒト/マウス CD44 抗体 (clone IM7; eBioscience Inc., San Diego, CA)、ラット抗ヒト/イヌ/マウス E-cadherin 抗体 (clone DECMA-1; Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、マウス抗ヒト/イヌ/ニワトリ/ラット Vimentin 抗体 (clone V9; Thermo Fisher Scientific)、マウス抗ヒト Slug 抗体 (clone 4B6D5; Novus Biologicals, CO, USA)、ラビット抗ヒト/マウス/ラット/ブタ/ウシ/ゼブラフィッシュ ZEB-1 抗体 (clone NBP1-68930; Novus Biologicals) を使用した。免疫蛍光染色に、マウス抗ヒト α -tubulin 抗体 (clone DM1A; eBioscience Inc.)、マウス抗ヒト Ki-67 抗体 (clone MIB-1; Dako, Glostrup, Denmark) を使用した。GM は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。細胞質染色には、5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を使用した。生/死細胞アッセイには、Annexin V Alexa Flour 488 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA)、Ethidium Homodimer-1 (EthD-1; Molecular Probes, Inc.) を使用した。ホルマリン固定パラフィン包埋組織は、Haematoxylin & Eosin (H&E) 染色後、LSAB2 Kit/HRP (Dako, Glostrup, Denmark) を使用して、免疫組織化学染色を行った。

細胞

ヒト PDAC 細胞株として PCI-55、PCI-24、PCI-6、PCI-35、MIA PaCa-2 の 5 種の細胞株を使用した。このうち、PCI-55、PCI-24、PCI-6、PCI-35 細胞は北海道大学病院にて外科切除された膵癌原発巣組織より、細胞株として当研究室にて樹立されたものである (Kishimoto T. et al., 1996)。MIA PaCa-2 細胞は、理研バイオリソースセンター (Tsukuba, Japan) より入手した。PDAC 細胞株は 10% fetal

bovine serum (FBS)、penicillin/streptomycin を含む Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) 培地で継代培養した。

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)、quantitative RT-PCR

PDAC 細胞株から RNeasy mini kit (QiaGen) を用いて RNA 抽出を行った。得られた RNA のうち 1 μ g に DNase I (Thermo Fisher Scientific) 処理を行い、Go Script Transcriptase & Reverse Transcription System (Promega) によって cDNA を合成した。PCR 反応は 2 $\times$ Go Taq Green Master Mix (Promega) を使用し、95 $^{\circ}$ C 15 分の変性後、95 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒の反応を 35 サイクル行った後、72 $^{\circ}$ C 7 分間の伸長反応を行った。得られた PCR 産物を 2% アガロースゲルにアプライ後、電気泳動を行い、画像解析装置 (FAS-IV; NIPPON Genetics, Tokyo, Japan) にて撮影した。qPCR 解析は、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRabio, Shiga, Japan) を使用して、2 $\times$ GoTaq qPCR Master Mix (Promega) にて施行した。得られたデータは、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて解析を行った。標準化には、*GAPDH* ハウスキーピング遺伝子を使用した。ImageJ 1.51 software package を使用して、CD44 バリエントアイソフォーム間のバンドの定量解析を行った。用いたプライマーの塩基配列は表 1 の通りである。

表 1. RT-PCR 法に用いたプライマーの塩基配列

遺伝子名	配列方向	プライマー配列 (5' -3')
CD44v	Forward	TCCCAGACGAAGACAGTCCCTGGAT
	Reverse	CACTGGGGTGGAATGTGTCTTGGTC
CDH1	Forward	AATCCCACACGTACAAGGG
	Reverse	GGAGGTGGTGAGAGAGACCT
VIM	Forward	GGCTCGTCACCTTCGTGAAT
	Reverse	GCAGAGAAATCCTGCTCTCCTC
Slug	Forward	TCGGACCCACACATTACCTTG
	Reverse	TTCTCCCCCGTGTGAGTTCTA
ZEB1	Forward	ATTCACAGTGGAGAGAAGCCA
	Reverse	GGTCGCCCATTCACAGGTAT
GAPDH	Forward	AGCGAGATCCCTCCAAAATC
	Reverse	GGCAGAGATGATGACCCTTT

ウエスタンブロッティング解析

PDAC 細胞株から 25×cOmplete protease inhibitor (F. Hoffmann-La Roche, Ltd., Basel, Swiss) を含む CelLytic MT (Sigma-Aldrich) を用いて Total protein 抽出後、4℃、20,000×*g* にて 10 分間の冷却遠心分離を行った。その上清のみ別のエッペンチューブに移し、一部、Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton, Inc., CO, USA) を使用して、Bradford 法にて濃度測定を行った。抽出液を用いて、4 µg/µL に濃度調整後、Sample Buffer, Laemmli 2× Concentrate (Sigma-Aldrich) を添加し、100℃、5 分間の煮沸を行い、サンプルを調製した。得られたサンプルを 10 µL のみ SDS-PAGE 後、polyvinylidene fluoride membranes (PVDF 膜; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) にブロッティングした。PVDF 膜をラット抗ヒト/マウス CD44 抗体、ラット抗ヒト/イヌ/マウス E-cadherin 抗体、マウス抗ヒト/イヌ/ニワトリ/ラット Vimentin 抗体、マウス抗ヒト Slug 抗体、ラビット抗ヒト/マウス/ラット/ブタ/ウシ/ゼブラフィッシュ ZEB-1 抗体でプローブし、免疫検出のために、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗 IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) と反応させた。PVDF 膜は、Western Lightning Ultra (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を使用して可視化し、Amersham Imager 680, Software version 2.0 (Cytiva, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

KRAS 遺伝子変異解析

コドン 12、13 の KRAS の遺伝子変異は、LH-MSALH Gene Mutation Detection Kit for KRAS Mutation Codons 12 and 13 (Wako) を使用して、Loop Hybrid Mobility Shift Assay 後、解析した。PDAC 細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR を使用して、標的遺伝子を増幅した。PCR 産物に LH プローブを付加させ、LH 反応を誘導した。反応液をポリアクリルアミドゲル電気泳動後、臭化エチジウム染色を行い、UV トランスイルミネーター (FAS-IV; NIPPON Genetics) を使用してバンドを可視化した。

細胞生存率アッセイ

Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo) を使用して、細胞の生存率を解析した。PDAC 細胞を 96 well plate に 1 well あたり 5×10^3 細胞の密度で播種した。0.1–50 µM の GM を 48 時間暴露した後、CCK-8 溶液を各 well に添加した。5% CO₂、37℃で 3 時間インキュベーション後、マイクロプレート吸光分光光度計 (Spectra

Max Paradigm; Molecular Devices CA, USA) を使用して、吸光度の測定を行った。

マイクロ・ナノ基板の作製

最初に、ガラス基板上に MPC ポリマー層を形成させた (Ishihara K. et al., 1990)。MPC 溶液をガラス板に付着させた後、クリーンベンチ内で室温にて基板を乾燥させ、ポリマー層を均一に形成させた。その後、70℃、4 時間、熱処理・脱水を行い、MPC ポリマーを基板に共有結合させた。Parylene deposition machine (Labcoater PDS2010, Specialty Coating Systems, USA) による化学蒸着を利用して、MPC ポリマー層上に、厚さ 1 μm の poly(p-xylylene) (Parylene-C) dry film mask を付着させた。次に、半導体製作に用いられる微細加工技術を応用して、基板を削るエッチングを行った (Kuribayashi K. et al., 2010)。MPC ポリマー・パリレン層上にエッチングを行わない部分のみ、photoresist (PR) を付着 (パターン化) させた。Glass mask (SUSS Micro Tes: MA-6, Germany) を通して紫外線を照射後、NMD-3 (2.38% Tetramethyl Ammonium Hydroxide) 現像液を使用して、PR のみ現像した。Inductively coupled plasma etching system (EIS-700, ELIONIX INC, Tokyo, Japan) を使用して、O₂ plasma (50 W、4.5 分間) でエッチングを行い、パターン化した部分の MPC ポリマー・パリレン層を除去した。

マイクロ・ナノ基板を用いた細胞培養

生きている PDAC 微小腫瘍のダイナミクスを可視化するために、第二章で開発を行ったマイクロ・ナノ基板を使用した。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直径 30 μm のマイクロスケールのパターンを持つ。基板を 1×PBS(+) 下に一晚浸けた後、MilliQ 水で 1 回洗浄し、パリレン層を穏やかに剥がしてから使用した。培地で 3 回洗浄した後、 $1-3 \times 10^6$ PDAC 細胞を 10% FBS DMEM に 3 mL だけ懸濁し、細胞懸濁液をペトリデッシュに固定した基板上に静かに播種した。5% CO₂、37℃ インキュベーター内で一晚培養を行い、基板上で自己組織化された PDAC 微小腫瘍をその後の実験に使用した。

免疫蛍光染色

培養上清を除去した後、基板上に形成させた微小腫瘍を、4% パラホルムアルデヒドで室温、30 分固定した。0.5% Triton X-100 (Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim, Germany)を含む PBS によって 20 分間の細胞透過処理を行った後、70% メタノールで 10 分間再度固定した。抗体の非特異反応を抑制するため、0.1% 正常ヤギ血清を含む PBST (0.05% Tween-20 in PBS) で 30 分間ブロッキングを行った。マイクロ・ナノ基板をペトリデッシュから取り出し、湿潤箱内のパラフィルムシート上に静置した。その後、以下の抗体反応を行った。一次抗体を 4℃で 2 時間反応させ、二次抗体として Alexa Fluor 標識ポリクローナル抗体を室温で 60 分間反応させた。タイムラプス撮影及び高解像度二次元 (two-dimensional, 2D) 撮影は、倒立型蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-X700 and BZ-9000; Keyence Corporation) を使用した。三次元 (three-dimensional, 3D) 解析は、スペクトルイメージング共焦点顕微鏡 (Nikon-A1R; Nikon Instech Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用して画像を取得後、NIS-Elements AR Ver 4.60.00 software (Nikon) を使用して画像再構築を行った。ImageJ 1.51 software package を使用して、phalloidin 及び、Ki-67 染色の画像解析を行った。

免疫組織化学染色

本研究では、組織学的に PDAC であると認められ、北海道消化器科病院 (Sapporo, Japan) にて外科的に切除された 11 症例を使用した。患者より採取した臨床検体を使用する実験は、本学医学部における倫理委員会の承認を得て行った。ヒト PDAC 病理検体のホルマリン固定パラフィン包埋組織を 3 μ m に薄切し、脱パラフィンした。全ての切片に対して H&E 染色を行った後、オートクレーブにて 121℃、20 分間抗原賦活化を行った。非特異反応を抑制するため、3% 正常ヤギ血清で 30 分間ブロッキングを行った。内因性ペルオキシダーゼの不活化のため、3% 過酸化水素水で 10 分間反応後、一次抗体を室温で 60 分間反応させた。最後に、ビオチン化二次抗体及びストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (LSAB2 kit; Dako) を反応させ、diaminobenzidine (Dako) にて検出を行った。核染色には、マイヤーのヘマトキシレンを使用した。画像は、独自の Olympus DP controller software (Olympus, Tokyo, Japan) を装備した Olympus DP70 camera を使用して取得した。

生/死細胞アッセイ

マイクロ・ナノ基板上に形成させた PDAC 微小腫瘍が入っているペトリデッシュ内の 3 mL DMEM に対して Annexin V Alexa Fluor 488 (25 μ L)、EthD-1 (2 μ L) を添加した。タイムラプス画像は、倒立型蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-X700 and BZ-

9000; Keyence Corporation)を使用して撮影した。

統計解析

統計解析手法は、Student's t -test または、one-way analysis of variance (ANOVA)と Tukey's post hoc test を用い、 P 値が 0.05 未満を有意差とした。

実験結果

PDAC 細胞における EMT の進行は、微小腫瘍のマイクロ・ナノ基板への足場依存性に影響を与える

はじめに、単層培養における PDAC 細胞株 (PCI-55、PCI-24、PCI-6、PCI-35、MIA PaCa-2) の EMT の進行度を検討した。癌の EMT の過程において、主要なヒアルロン酸受容体である CD44 の発現は CD44 バリエントアイソフォーム (CD44v) から CD44 スタンダードアイソフォーム (CD44s) へと変化することが知られている (Brown R.L. et al., 2011 ; Zöller M., 2011 ; Kiuchi S. et al., 2015 ; Miyatake Y. and Ohta Y. et al., 2018)。最近、EMT はいくつかの中間型を介して進行することが報告されている (Pastushenko I. et al., 2018)。そこで、EMT の進行度を分類するため、PDAC 細胞株における CD44 variant (CD44v) アイソフォームの発現パターンを検討した (図 1A, B)。PCI-55、PCI-24、PCI-6、PCI-35 細胞では、CD44v mRNA の高発現がみられ、CD44s mRNA の発現はほとんどみられず CD44v^{high} / CD44s^{low} を示す上皮型であった。中でも、PCI-55、PCI-24 細胞は CD44v のうち CD44v3-10 mRNA の発現が高く (CD44v3-10^{high} / CD44s^{low})、PCI-6、PCI-35 細胞は CD44v8-10 mRNA の発現が高かった (CD44v8-10^{high} / CD44s^{low})。一方、MIA PaCa-2 細胞は CD44s mRNA の発現亢進が認められる CD44v^{low} / CD44s^{high} の発現パターンを示す間葉系であった。ウエスタンブロッティングを用いた解析においても、CD44 タンパク質において RT-PCR と同様な結果が得られた (図 1C)。KRAS^{G12D} の遺伝子変異によって前癌病変である PanIN から PDAC に移行し (Ying H. et al., 2012)、その発現量に伴って PDAC が進行すると報告されている (Aguirre A.J. et al., 2003, Hingorani S.R. et al., 2003)。そこで、loop hybrid mobility shift assay を使用して、コドン 12、13 における KRAS 遺伝子変異の発現を検討した (図 1D)。PCI-55、PCI-24、PCI-6、PCI-35 細胞には、ヘテロ接合性の KRAS^{G12D} 変異がみられた (Ying H. et al., 2012 ; Kiuchi S. et al., 2015)。特に、PCI-6、PCI-35 細胞は KRAS^{WT} と比較して、KRAS^{G12D} の発現が高いことがわかった (図 1D; 中央図)。一方、MIA PaCa-2 細胞はホモ接合性の KRAS^{G12D} 変異を示した (図 1D; 右図)。EMT 関連遺伝子の発現パターンを検討するため、Quantitative RT-PCR 及び、ウエスタンブロッティングを行った。PCI-55、PCI-24、PCI-6、PCI-35 細胞は E-cadherin をコードする *CDH1* の発現が高く、*ZEB1* の発現が低いことがわかった。PCI-6、PCI-35 細胞は PCI-55、PCI-24 細胞と比較して、Vimentin をコードする *VIM* 及び、*Slug* の発現が高いことがわかった。一方、MIA PaCa-2 細胞は *VIM*、*ZEB1* の高発現を示した (図 1E, F)。PDAC 細胞

に対する標準的な化学療法薬である GM の細胞毒性を評価するため、各 PDAC 細胞株に GM (0.1-50 μ M) を 48 時間暴露した。PCI-55、PCI-24、PCI-6、PCI-35 細胞の The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) 値は、それぞれ 18 μ M、0.5 μ M、22 μ M、及び 50 μ M であった。この結果より、PCI-24 細胞は強い GM 感受性、PCI-35 細胞は強い GM 耐性を有することが示された (図 1G)。以上の結果より、PCI-55、PCI-24、PCI-6、PCI-35 細胞はいずれも EMT の中間型であることが示された。EMT の進行度に応じてさらに、PCI-55 及び PCI-24 細胞は上皮系形質寄り (hybrid epithelial/mesenchymal-type, EM-type)、PCI-6 及び PCI-35 細胞は間葉系形質寄り (hybrid mesenchymal/epithelial-type, ME-type) であると分類を行った。MIA PaCa-2 細胞は、間葉系形質 (mesenchymal-type, M-type) であったため、間葉系のコントロールとして使用した。

次に、異なる EMT の進行度を示す 5 種の PDAC 細胞株における生きている微小腫瘍のダイナミクスを可視化するため、マイクロ・ナノ基板を使用し、微小腫瘍のライブイメージング解析を行った。各 PDAC 細胞株は基板上で一晩培養すると、マイクロスケールパターンに足場を形成して、細胞非接着面 (MPC ポリマー層) を跨ぎ、成熟した微小腫瘍を自己組織化した (図 1H, I; 上図)。各 PDAC 細胞株における微小腫瘍の足場依存性を検討するため、PBS (-) で 5 回洗浄を行った。M-type である、MIA PaCa-2 微小腫瘍のみ、基板から剥がれた。一方、PCI-55、PCI-24、PCI-6、PCI-35 微小腫瘍は、マイクロ・ナノ基板上に残った (図 1H, I; 下図)。ME-type である、PCI-6、PCI-35 微小腫瘍は EM-type である、PCI-55、PCI-24 微小腫瘍と比較して、洗浄後にマイクロ・ナノ基板からわずかに剥がれた (図 1J, K, $P < 0.005$)。これらの結果より、PDAC 微小腫瘍は EMT の進行によって、マイクロスケールパターンへの足場依存性が低下することが示された。

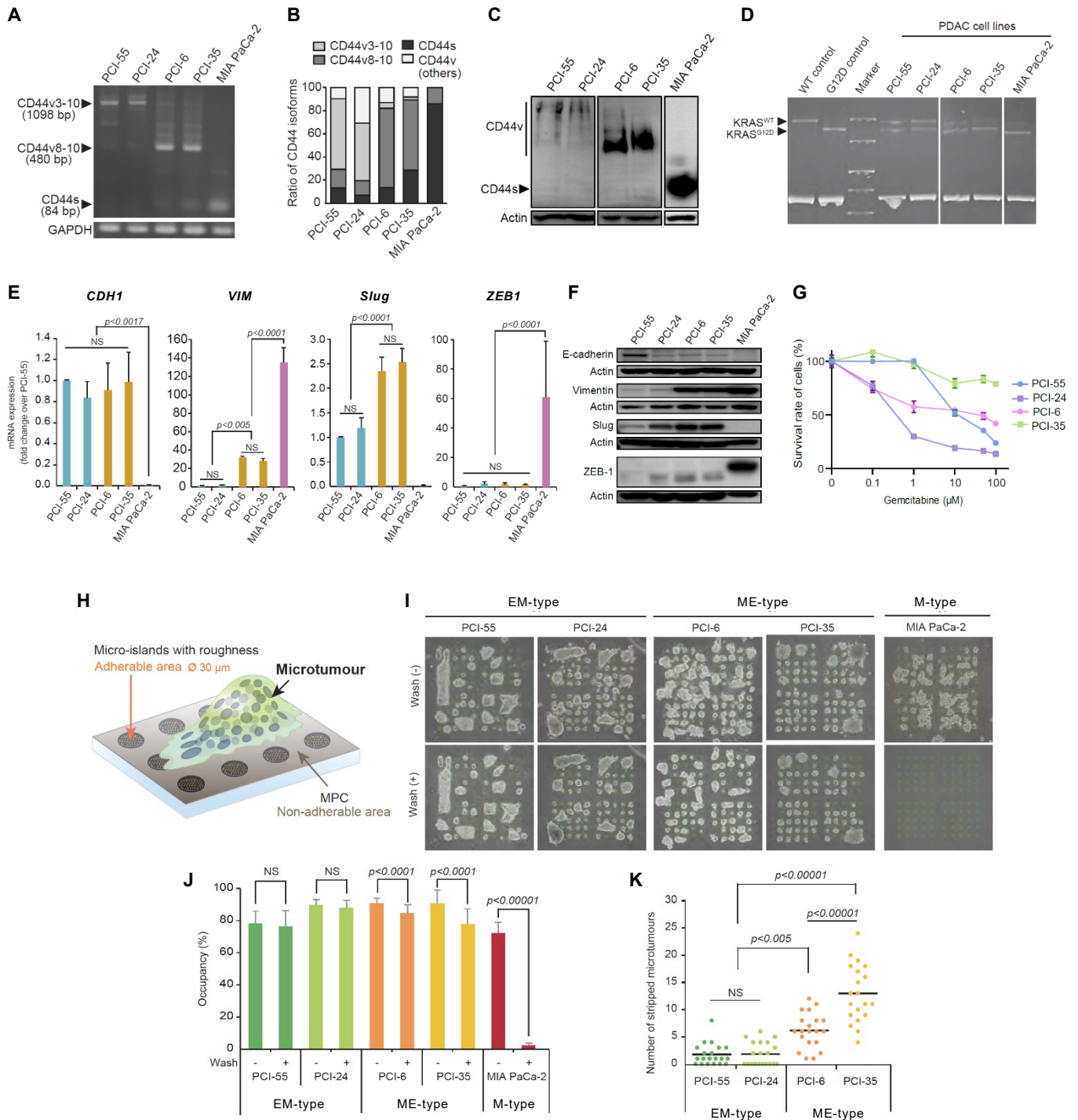


図 1. PDAC 細胞における EMT の進行度は、マイクロ・ナノ基板上における微小腫瘍の足場依存性に影響を与える

(A-G) 単層培養における PDAC 細胞の EMT 進行度の分類。(A) RT-PCR 法による、5 種のヒト PDAC 細胞株における CD44v アイソフォームの発現を検討した。(B) PDAC 細胞における CD44v アイソフォームの割合。RT-PCR から得られた CD44v アイソフォームを示すバンドは、ImageJ 1.51 software を使用して解析した。(C) ウェスタンブロット法による、CD44v アイソフォームの発現の検討。(D) Loop hybrid mobility shift assay を使用して、5 種の PDAC 細胞株におけるコドン 12、13 の KRAS 遺伝子変異を解析した。(E, F) Quantitative RT-PCR 法、ウェスタンブロット法による、*CDH1*、*VIM*、*Slug* 及び *ZEB1* の発現を検討した。(G) CCK-8 アッセイを使用して、GM 暴露 48 時間後における PDAC 細胞の IC₅₀ 曲線を作成した。(H) マイクロ・ナノ基板の模式図。(I-K) PCI-55、PCI-24、PCI-6、PCI-35、MIA PaCa-2 細胞はマイクロ・ナノ基板上で一晩培養すると、微小腫瘍を自己組織化した。(I; 上図) 培養 24 時間後の PDAC 微小腫瘍。(I; 下図) PBS で 5 回洗浄後の PDAC 微小腫瘍。(J) マイクロスケールパターンに接着した細胞による占有率。占有率は、マイクロスケールパターン 20 個の内、微小腫瘍が接着したパターンを計測後、算出した。(K) マイクロスケールパターンの内、洗い流された微小腫瘍の数。これらの実験結果は独立した 3 回の結果の平均値を示す。

EMT の進行度は、PDAC 微小腫瘍の伸張性に影響を与える

異なる EMT の進行を示す PDAC 微小腫瘍の形態学的な違いについて、細胞質 (CFSE; 緑) 染色及び、細胞骨格 (α -tubulin; 赤) 染色を使用して検討を行った (図 2A)。EM-type である PCI-55、PCI-24 細胞は、ME-type である PCI-6、PCI-35 細胞と比較して、表面積が大きい微小腫瘍を多数、形成した (図 2A, D)。表面積の大きい微小腫瘍は、マイクロ・ナノ基板の MPC ポリマー層 (細胞非接着面) を跨ぎ 5 個以上のマイクロスケールパターンに強く足場を形成していた (図 2B, C)。PDAC 微小腫瘍が単一のマイクロスケールパターン (Stride(-)) を超えると、EM-type である PCI-55、PCI-24 細胞は、ME-type である PCI-6、PCI-35 細胞と比較して、明確な組織運動極性を示した (図 2E-H)。EM-type である PCI-55、PCI-24 微小腫瘍は、ME-type である PCI-6、PCI-35 微小腫瘍と比較して、2 個のパターン間の細胞非接着面に形成されたアクチンストレスファイバー (アクチンフィラメントの再構築) の高発現を示した (図 2I-K, $P < 0.001$)。stride area/bottom area における phalloidin 染色の割合は、EM-type である PCI-55、PCI-24 微小腫瘍の方が ME-type である PCI-6、PCI-35 微小腫瘍よりも有意に亢進していた (図 2L, $P < 0.00001$)。これらの結果より、PDAC 微小腫瘍は EMT の進行によって、伸張性が低下することが示された。

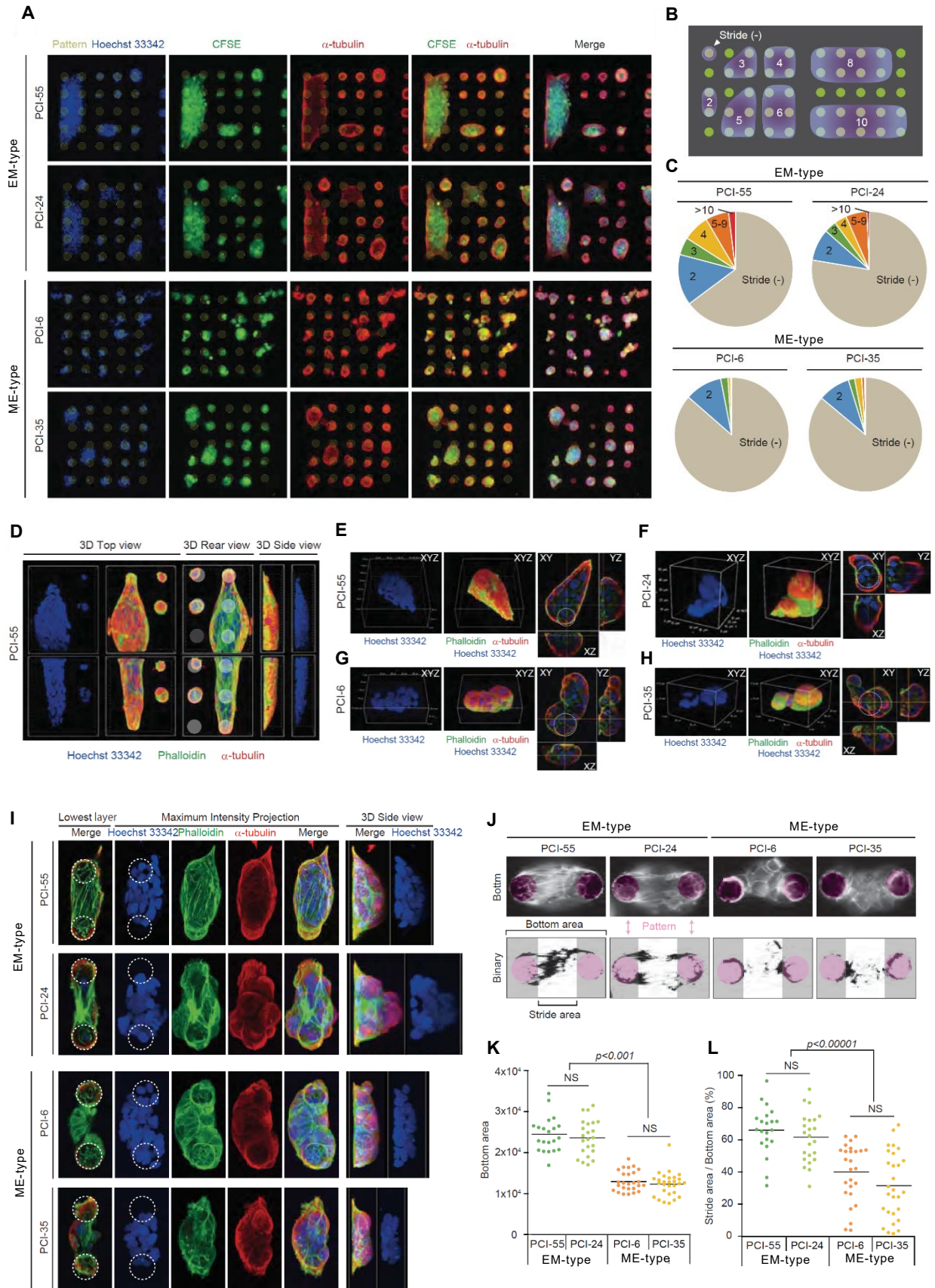


図 2. EMT の進行度は、PDAC 微小腫瘍の伸張性、アクチンストレスファイバーの発現に影響を与える

PDAC 細胞をマイクロ・ナノ基板上で一晩培養後、免疫蛍光染色を行った。(A)PDAC 微小腫瘍において Hoechst33342、CFSE、及び抗 α -tubulin 抗体染色を行った。(B, C) マイクロ・ナノ基板を使用して PDAC 微小腫瘍の伸張性について半定量解析を行った。(B) プロトコルの模式図。(C) 細胞が接着したマイクロスケールパターンの数と大きさによる微小腫瘍の割合。(D-H) 微小腫瘍を自己組織化させた後、Hoechst 33342、phalloidin、および抗 α -tubulin 抗体を用いて蛍光免疫染色した。(D, E) PCI-55 微小腫瘍。(F) PCI-24 微小腫瘍。(G) PCI-6 微小腫瘍。(H) PCI-35 微小腫瘍。(I) PDAC 微小腫瘍における蛍光強度が最大時の 3D 画像。(J) EM-type 微小腫瘍は、ME-type 微小腫瘍と比較して stride area におけるアクチンストレスファイバーの発現が増強していた。(K) PDAC 微小腫瘍が bottom area の内、phalloidin が発現していた (phalloidin positive areas) 細胞数。(L) phalloidin の発現における bottom area あたりの stride area の割合。phalloidin 染色の画像解析には、ImageJ 1.51 software を使用した。灰色円、点線円は、細胞接着が可能な直径 30 μ m のマイクロスケールパターンを示す(A, D-I)。

PDAC 微小腫瘍における有糸分裂細胞の位置は、EMT の進行度に依存する

これまで、PCI-55 微小腫瘍の体表面は α -tubulin の発現増強によって覆われ、有糸分裂期の多くの細胞が PCI-55 微小腫瘍の外側に位置することを報告してきた (Miyatake Y., Shigetomi K.K., Ohta Y. et al., 2018)。そこで、EMT の進行度が PDAC 微小腫瘍の有糸分裂細胞の位置に与える影響について検討するため、PDAC 微小腫瘍に対して Ki-67 蛍光免疫染色を行い、各微小腫瘍の有糸分裂細胞の位置について定量化を行った (図 3A-D)。EM-type である PCI-55、PCI-24 微小腫瘍が 1 個または 2 個のマイクロスケールパターンに足場を形成している場合は、Ki-67、 α -tubulin 陽性の有糸分裂細胞が微小腫瘍の外側に位置することがわかった (図 3C, $P < 0.0002$)。一方、ME-type である PCI-6、PCI 35 微小腫瘍は、有糸分裂細胞が微小腫瘍の内部で観察された (図 3D, $P < 0.0001$)。共焦点断面画像及び、3D 再構築画像解析によって、EM-type と ME-type 微小腫瘍との間には、有糸分裂細胞の位置に明らかな違いがあることがわかった (図 3E-G)。PCI-55 微小腫瘍のタイムラプス撮影によって、有糸分裂期にある PDAC 細胞が微小腫瘍の外側に出現することがわかった (図 3H)。対照的に、微小腫瘍が 3 個以上のマイクロスケールパターンに足場を形成した場合は、EM-type、ME-type に関わらず、PDAC 微小腫瘍の内部で非常に増加した有糸分裂細胞が観察された (図 3C, D)。これらの結果より、EMT の進行度は、PDAC 微小腫瘍における有糸分裂細胞の位置に影響を与えることが示された。

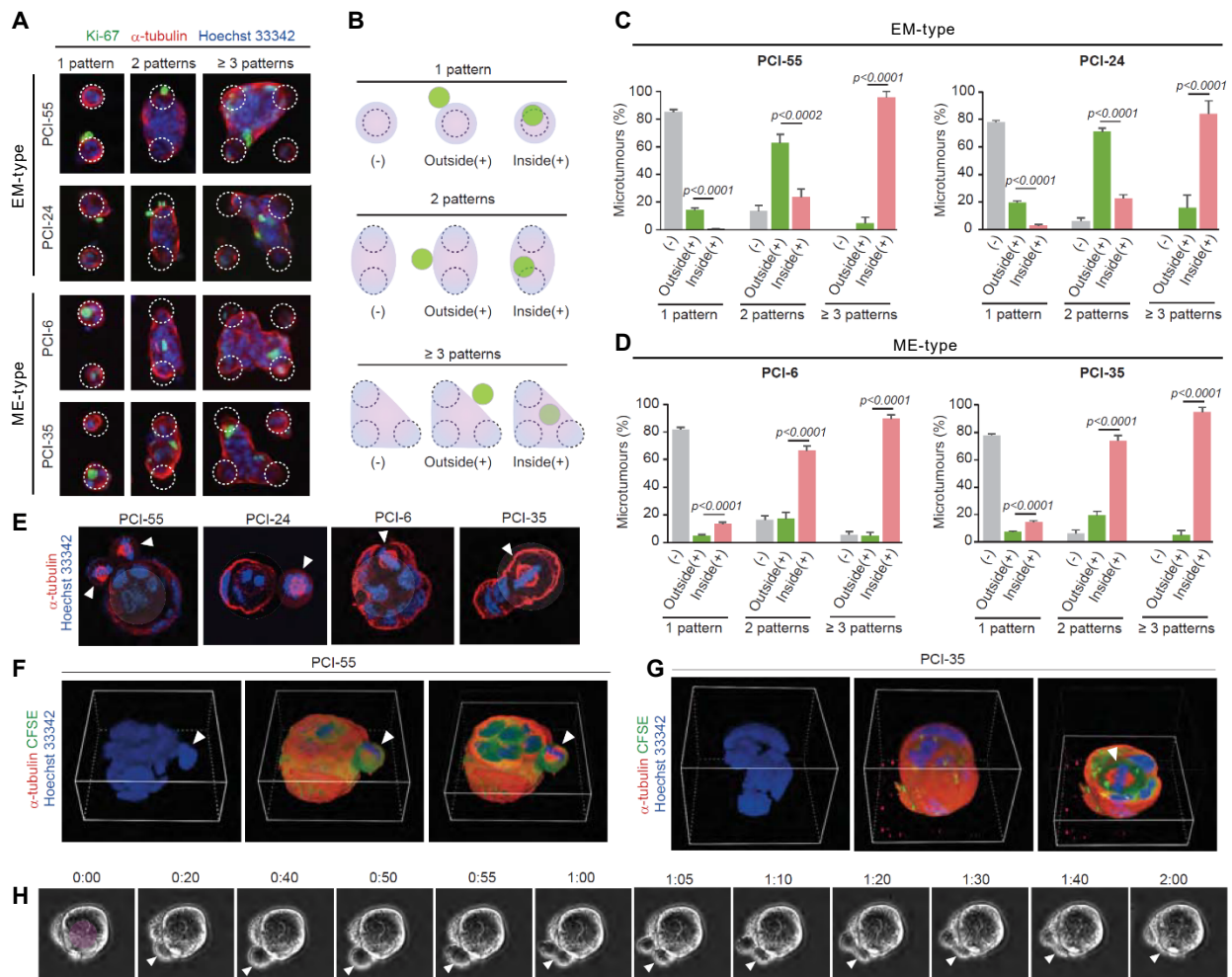


図 3. PDAC 微小腫瘍における有糸分裂細胞の位置は、EMT の進行度に依存する

(A-D) マイクロ・ナノ基板上に形成された PDAC 微小腫瘍における有糸分裂細胞の位置を半定量化解析した。(A) PDAC 微小腫瘍に対して Hoechst33342、抗 Ki-67 抗体、及び抗 α-tubulin 抗体を用いて免疫蛍光染色した。(B) 模式図は、半定量化解析のプロトコル。(C, D) PDAC 微小腫瘍における Ki-67 陽性細胞の割合。(-): 微小腫瘍に Ki-67 陽性細胞が観察されなかった割合; Outside(+): 微小腫瘍の表面に Ki-67 陽性細胞が観察された割合; Inside(+): 微小腫瘍の内部に Ki-67 陽性細胞が観察された割合。(C) PCI-55、PCI-24 微小腫瘍。(D) PCI-6、PCI-35 微小腫瘍。(E) PDAC 微小腫瘍の断面画像。(F, G) 3D 再構築画像、3D 断面画像。(F) PCI-55 微小腫瘍。(G) PCI-35 微小腫瘍。(H) PCI-55 微小腫瘍におけるタイムラプス画像。有糸分裂期にある PCI-55 細胞のみ、微小腫瘍の外側に出現した。矢頭: 有糸分裂細胞を示す(E-H)。時間は hh:mm を示す。

成熟した PDAC 微小腫瘍は、管腔構造の形成を誘導する

第二章では、PCI-55 細胞をマイクロ・ナノ基板上で培養すると、管腔構造が誘導されることを明らかにした (Miyatake Y., Shigetomi K.K., Ohta Y. et al., 2018)。そこで、PDAC 微小腫瘍における EMT の進行度は、ヒト PDAC の主要な病理学的特徴である管腔への分化 (Hruban R.H. et al., 2001 ; Kamisawa T. et al., 2016 ; Kleeff J. et al., 2016) に影響を与えるかどうか検討するため、基板上に PDAC 微

小腫瘍を形成させた後、さらに 24 時間、タイムラプス撮影を行った。PCI-55 微小腫瘍から出現した管腔構造は、まるで蠕動運動のように波状の収縮を示しながら成長し、自己組織化することがわかった(図 4A)。CFSE(緑)、 α -tubulin(赤)染色によって、PCI-55 微小腫瘍から生じた管腔構造は内腔を有することを明らかにした(図 4B)。単一のマイクロスケールパターン(Stride(-))上に足場を形成した成熟微小腫瘍は、内部で管腔構造を形成して、表面から出現することがわかった(図 4D)。一方、2 個以上のマイクロスケールパターンをまたいでいる微小腫瘍は、体表面で管腔構造を形成することが観察された(図 4C)。第二章において、管腔構造は PDAC 微小腫瘍によるエントーシスによって、誘導されることを明らかにした(Miyatake Y., Shigetomi K.K., Ohta Y. et al., 2018)。本研究においても、この結果と一致して、マイクロ・ナノ基板上で一晩培養したところ、エントーシスが誘導され(図 4E)、表面細胞とエントーシスによる内部細胞の間に小さな空洞(管腔構造)が観察された。特に、Stride(-)の PCI-55 微小腫瘍において高頻度に観察された(図 4F)。いくつかの PCI-55 微小腫瘍は、管腔構造が外側で観察された(図 4G)。複数の細胞によって形成された巨大で複雑な管腔構造を有する PCI-55 微小腫瘍は、ごく稀に観察された(図 4H)。最近、ヒト乳がん細胞である MCF7 細胞及び、正常ヒト乳腺上皮細胞である MCF10A 細胞において、エントーシスの誘導にはカルシウム依存性の接着結合が重要であることが報告された(Overholtzer M. et al., 2007)。そこで、EMT の進行がエントーシスの誘導に与える影響について検討を行うため、上皮系形質を示す PCI-55 細胞及び間葉系形質を示す MIA PaCa-2 細胞を基板上に播種し、カルシウムイオンキレート剤である、2.5 mM EDTA 及び Rho キナーゼ阻害剤である、35 μ M Y27632 を含む培地下でタイムラプス撮影した。PCI-55 微小腫瘍は、EDTA 暴露後 30 分、Y27632 では 24 時間後に、微小腫瘍内の細胞が外側に出現し、ブドウ房状を示した(図 4I)。一方、MIA PaCa-2 微小腫瘍は暴露前後で形態に変化がみられず、ブドウ房状を示した(図 4J)。これらの結果より、エントーシスは上皮系形質が保持されている細胞において誘導されることが示された。

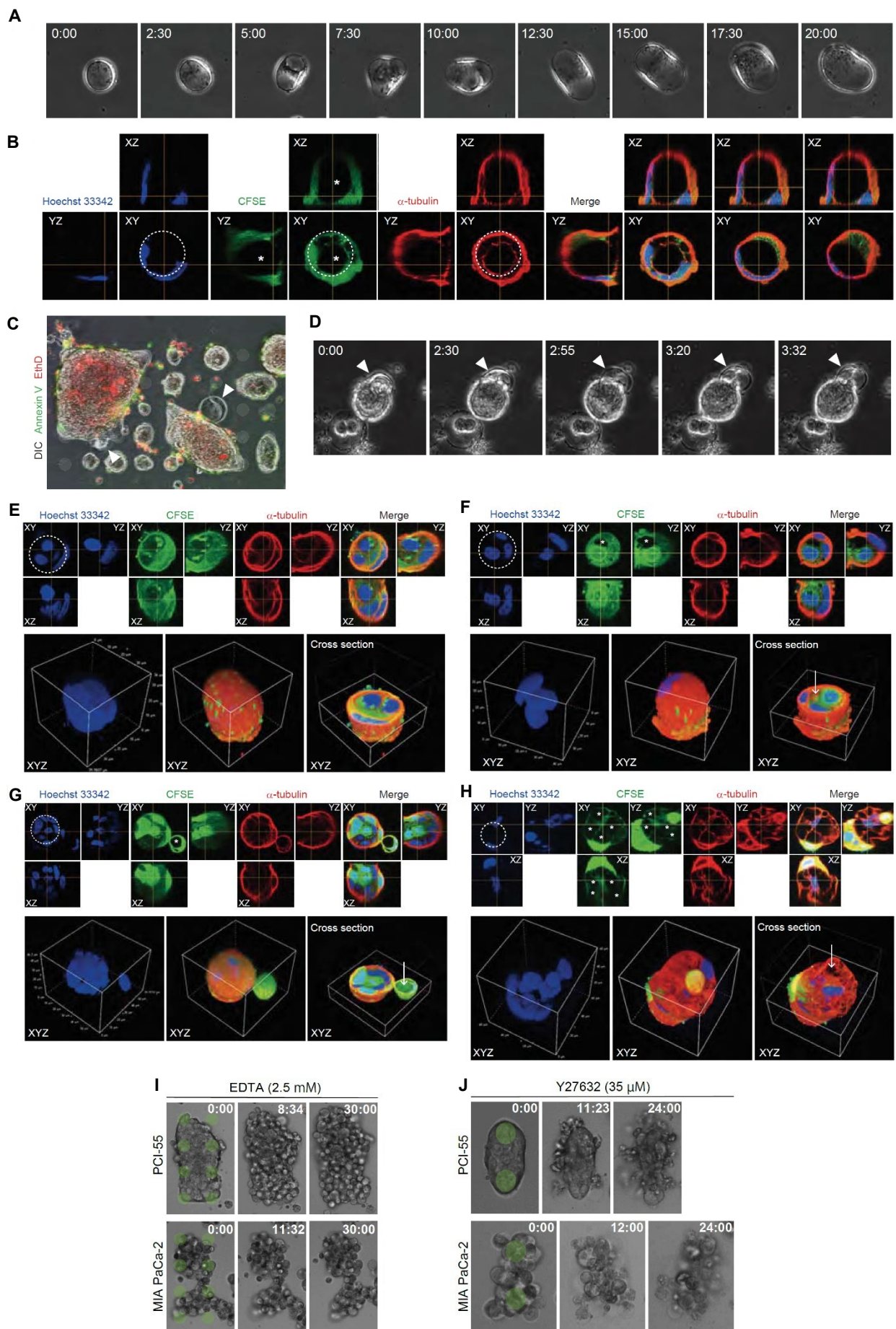


図 4. 成熟した PDAC 微小腫瘍は、管腔構造の形成を誘導する

(A) PCI-55 微小腫瘍から形成された管腔構造。マイクロ・ナノ基板上で 1 日培養後、自己組織化させた PCI-55 微小腫瘍をさらに培養しながら、ライブイメージング解析を行った。成熟した微小腫瘍から形成された生きた管腔構造は、波状の収縮とともに成長した。(B) PCI-55 微小腫瘍から形成された管腔構造。(C) タイムラプス撮影を使用した生/死細胞アッセイを行った。マイクロ・ナノ基板上で自己組織化させた成熟 PCI-55 微小腫瘍に対して、Annexin V Alexa Fluor 488 (緑)、EthD-1 (赤) を含む培地下でさらに培養した。マイクロスケールパターンを跨ぐ成熟した巨大な PCI-55 微小腫瘍は、体表面から管腔構造が出現した。(D) 単一のマイクロスケールパターンに足場のある成熟微小腫瘍は、内部で管腔構造が形成して、体表面から出現した。(E-H) PCI-55 微小腫瘍に対して、Hoechst 33342、CFSE、及び、抗 α -tubulin 抗体を用いて免疫蛍光染色した。(E) PCI-55 微小腫瘍における細胞内細胞構造。(F) 多くの PCI-55 微小腫瘍には、表面細胞と内部細胞の間に小さな管腔構造が観察された。(G) いくつかの PCI-55 微小腫瘍には、体表面に管腔構造が観察された。(H) ごく稀に、PCI-55 微小腫瘍には大きく複雑な管様構造が観察された。(I, J) マイクロ・ナノ基板上で自己組織化した PCI-55、MIA PaCa-2 微小腫瘍に対して、(I) 2.5 mM EDTA、(J) 35 μ M Y27632 を暴露しながら、タイムラプス撮影した。PDAC 微小腫瘍から PDAC 細胞が出現した。時間は hh:mm (A, C, D, J)、mm:ss (I) を示す。アスタリスク、矢印: 管腔構造の内腔 (B, E-H)。点線、緑色の円: 直径 30 μ m の細胞接着面である、マイクロスケールパターン (A, E-J)。

EMT の進行度は、PDAC 微小腫瘍における管腔構造への分化に影響を与える

次に、PDAC 微小腫瘍における EMT の進行度が管腔構造の形成に与える影響について検討した。PCI-55 微小腫瘍から形成された様々な形態の管腔構造は PCI-24、PCI-6、PCI-35 微小腫瘍で観察された (図 5A-F)。細胞株の間で管腔構造の形態学的な特徴に明らかな違いは観察されなかった。しかしながら、PCI-6、PCI-35 微小腫瘍において、単一細胞内にいくつかの死細胞が観察され (図 5C, E; 矢頭)、カニバリズムであることが示唆された (Cano C.E. et al., 2012)。マイクロ・ナノ基板上で 2 日間、培養したところ、ME-type である PCI-6、PCI-35 微小腫瘍は、EM-type である PCI-55、PCI-24 微小腫瘍と比較して、管様構造の形成率が有意に亢進した (図 5G, H)。この結果より、PDAC 微小腫瘍は EMT の進行によって、管腔構造の形成が促進されることが示された。

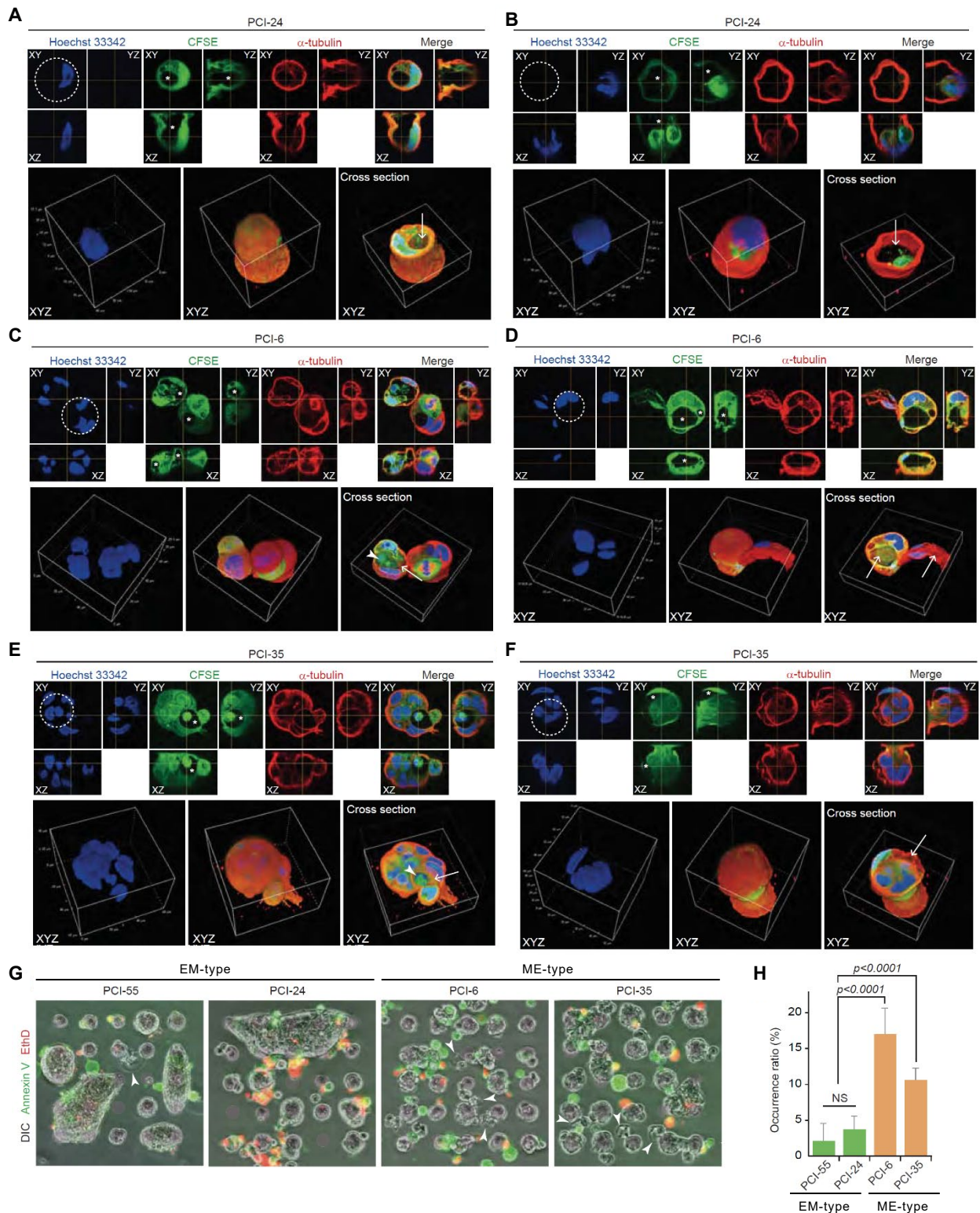
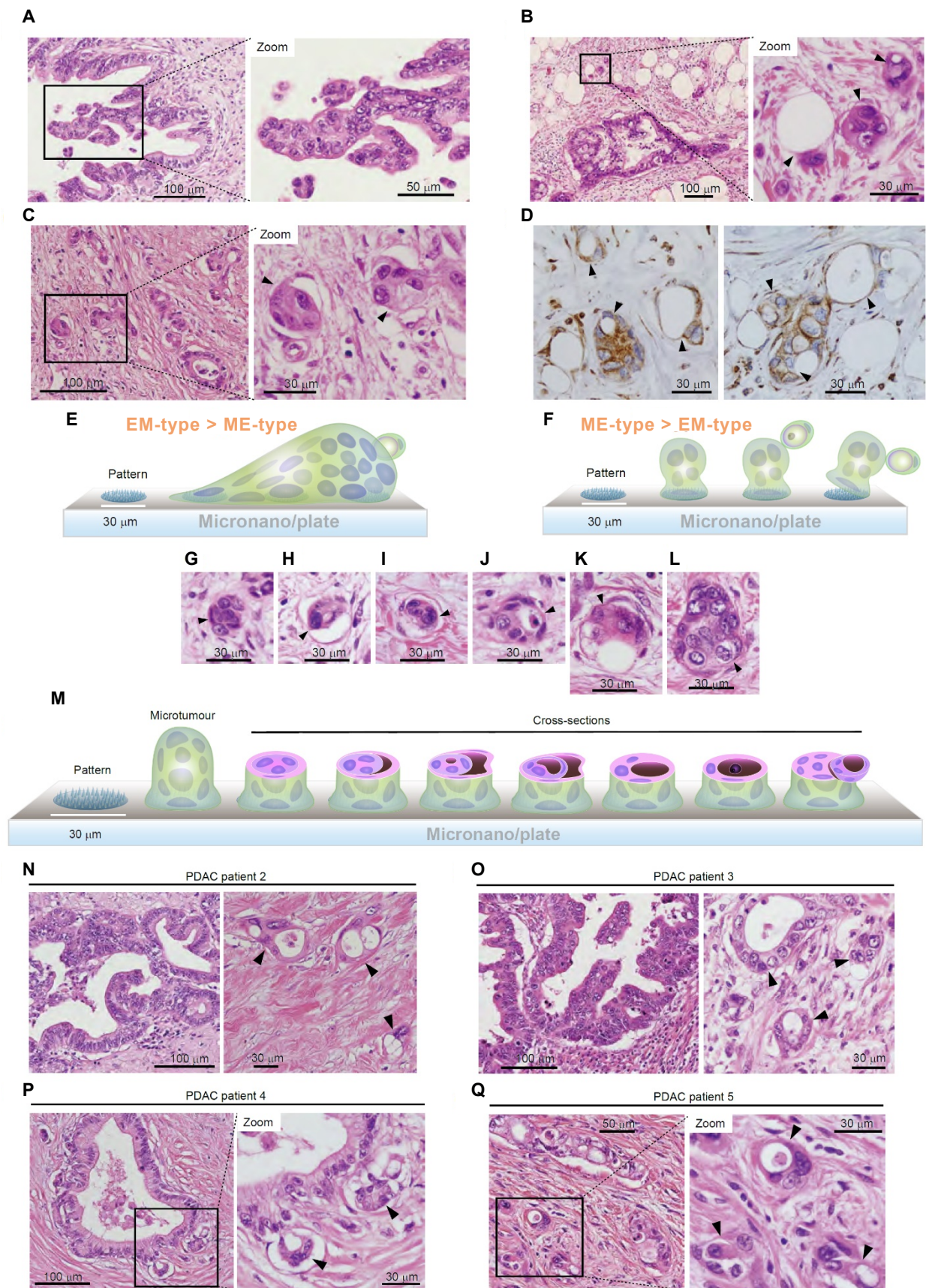


図 5. EMT の進行度は、PDAC 微小腫瘍における管腔構造への分化に影響を与える

(A-F) PCI-24、PCI-6、PCI-35 微小腫瘍に対して、Hoechst 33342、CFSE、及び、抗 α -tubulin 抗体を用いて免疫蛍光染色した。アスタリスク、矢印：管腔構造の内腔。点線の円：直径約 30 μ m の細胞接着面である、マイクロスケールパターン。(A, B) PCI-24 微小腫瘍。(C, D) PCI-6 微小腫瘍。(E, F) PCI-35 微小腫瘍。(C, E; 矢頭)いくつかの死細胞は微小腫瘍に取り込まれていた。(G) タイムラプス撮影を使用して、生/死細胞アッセイを行った。矢印は管腔構造。(H) マイクロ・ナノ基板上に 2 日間培養後、微小腫瘍から形成された管腔構造の割合。少なくとも 20 視野 (100 マイクロスケールパターン/視野) における微小腫瘍から形成された管腔構造を計測した。

マイクロ・ナノ基板上で自己組織化された管腔 PDAC 微小腫瘍は、ヒト PDAC における病理学的な特徴を模倣する

最後に、11 人の膵癌患者から得られた PDAC 病理標本を使用して、マイクロ・ナノ基板上の EM-type 及び ME-type PDAC 微小腫瘍から形成された管腔構造における臨床的な関連性を検討した(図 6A-D, G-L, N-Q)。PDAC 患者 1 の標本のパラフィンブロックから得られた組織切片は、様々な形態を示す管腔構造が観察された(図 6A-D, G-L)。基板上の EM-type 微小腫瘍は、ME-type と比較して 2 個以上のマイクロスケールパターンを跨ぎ、管腔構造が微小腫瘍の体表面で高頻度に観察された(図 2, 6E)が、ヒト PDAC の PanIN 病変においても、同様の組織極性をもつ大きな微小腫瘍が高頻度に観察された(図 6A, N-O; 左図)。一方、ME-type 微小腫瘍は単一のマイクロスケールパターン上に形成され、管腔構造が内部から高頻度に出現したが(図 2, 6F)、浸潤性 PDAC 病変においても、非常に類似した管腔構造が多数観察された(図 6B-D, N-O; 右図, P, Q)。最近、結腸癌、胃癌及び膵癌において、単一細胞又はごく小さな細胞集団である簇出(tumor budding)の存在が報告され、EMT の中間型でみられるアグレッシブな浸潤を示すことから、組織形態学的なマーカーであると考えられている(Karamitopoulou E. et al., 2013 ; Berg K.B. et al., 2018 ; Zlobec I. et al., 2020)。本研究においても、浸潤性 PDAC 病変で直径が約 30 μm の tumor budding が多数観察され、マイクロスケールパターンの直径と同様の大きさであった(図 6B-D, G-L, N-O; 右図, P, Q)。以上の結果より、EM-type 微小腫瘍は PanIN 病変の大きさ及び、形態が類似しているものが多いことが示された。一方、より悪性度の高い ME-type 微小腫瘍は浸潤性 PDAC 病変の tumor budding と大きさ、管腔形成を含む構造が非常に類似していることが示された。



←

図 6. マイクロ・ナノ基板上で自己組織化した管腔 PDAC 微小腫瘍は、ヒト PDAC の病理学的な特徴を模倣する

(A-D)PDAC 患者 1 から得られた組織切片を使用して、組織学的な解析を行った。(A)腭上皮内腫瘍性病変(PanIN)、(B, C)浸潤性 PDAC 病変に対して、H&E 染色を行った。(D)浸潤性 PDAC 病変に対して、抗 α -tubulin 抗体を用いて免疫染色を行った。(E, F)マイクロ・ナノ基板上に、異なる EMT の進行を示す PDAC 細胞から自己組織化させた PDAC 微小腫瘍のダイナミクスを示す概略図。(E)EM-type は、2 個以上のマイクロスケールパターンを跨ぎ、管腔構造が微小腫瘍の体表面で高頻度に観察された。(F)ME-type は、単一のマイクロスケールパターン上に形成され、管腔構造が内部から高頻度に出現した。(G-L)PDAC 患者 1 から得られた組織切片を使用して、H&E 染色を行った。矢頭のように、PDAC 病理標本において PanIN 病変の周囲に多数、観察された tumor budding の直径は約 30 μm であった。(M)単一のマイクロスケールパターン上に自己組織化した PDAC 微小腫瘍が管腔構造を形成する過程を示した模式図。(N)PDAC 患者 2 から得られた組織切片における PanIN(左図)、浸潤性 PDAC(右図)病変。(O)PDAC 患者 3 から得られた組織切片における PanIN(左図)、浸潤性 PDAC(右図)病変。(P)PDAC 患者 4 から得られた組織切片における PanIN、浸潤性 PDAC 病変。(Q)PDAC 患者 5 から得られた組織切片における浸潤性 PDAC 病変。矢頭：直径約 30 μm の tumor budding(B-D, G-L, N-Q)。

考察

本研究では、マイクロ組織レベルの EMT の腫瘍ダイナミクスを理解するために、マイクロ・ナノ基板を使用して、異なる EMT の進行度を示す PDAC 細胞から自己組織化させた微小腫瘍のダイナミクス解析を行った。PDAC 微小腫瘍は、EMT の進行によって、マイクロスケールパターンへの足場依存性及び、伸張性が低下することがわかった(図 1, 2)。EM-type 微小腫瘍は、細胞非接着面を跨ぐ際に 2 つのマイクロスケールパターン間でアクチンストレスファイバーの高発現を示した。一方、ME-type 微小腫瘍はそのような現象が観察されなかった(図 2)。以上の結果より、微小腫瘍の伸張性はアクチンストレスファイバーの発現に依存することが示唆された。EM-type 微小腫瘍は ME-type 微小腫瘍と比較して、足場依存性及び、伸張性が高い(図 1, 2)ことから、腫瘍部位と隣接している足場の形成に適した血管やリンパ節などの組織への浸潤能が高い可能性が示唆された。対照的に、ME-type 微小腫瘍は EM-type 微小腫瘍よりも転移しやすい可能性が考えられた。

PDAC 微小腫瘍における有糸分裂細胞の位置は、EMT の進行度と腫瘍の大きさに依存することが示された(図 3)。単一のマイクロスケールパターン(Stride(-))上の非常に小さな EM-type 微小腫瘍は、体表面に発現している α -tubulin の外側に有糸分裂細胞が位置していた。一方、同様の大きさの ME-type 微小腫瘍は有糸分裂細胞が内側に位置していた。この違いは、アグレッシブに進行する PDAC において、ごく小さな現象ではあるが有糸分裂細胞を標的とする抗癌剤に対する感受性に大きな影響を与える可能性が考えられる。

第二章では、PDAC 微小腫瘍は粗さのあるマイクロスケールパターン上で足場を形成し、エントーシスを介して自己組織化されることを明らかにした(Miyatake Y., Shigetomi K.K., Ohta Y. et al., 2018)。本研究においても EM-type 及び、ME-type 微小腫瘍は細胞内細胞構造を含むことがわかった。EM-type である PCI-55 微小腫瘍及び、M-type である MIA PaCa-2 微小腫瘍にエントーシス阻害剤としてカルシウム拮抗作用を示す EDTA 及び、Y27632 を暴露したところ(Overholtzer M. et al., 2007)、PCI-55 微小腫瘍は体表面に細胞が出現し、MIA PaCa-2 微小腫瘍と同様に、ブドウ房状になることがわかった(図 4)。これらの結果より、エントーシスは上皮系形質が保持された細胞で誘導され、カルシウム依存的であることが示唆された(Krishna S. et al., 2016 ; Hamann J.C. et al., 2017 ; Fais S. et al., 2018)。

さらに、第二章において管腔構造は PDAC 微小腫瘍によるエントーシスを介して誘導されることを明らかにした(Miyatake Y., Shigetomi K.K., Ohta Y. et al.,

2018)。本研究において、ME-type 微小腫瘍は EM-type 微小腫瘍と比較して、Stride(-)上の微小腫瘍から管腔構造を多く形成することがわかった(図 4, 5)。タイムラプス撮影によって、管腔構造は Stride(-)上の微小腫瘍の内部から出現することが明らかになった。微小腫瘍の外に出現した生きた管腔様微小腫瘍は、波のような収縮を示しながら成長する様子も初めて捉えた(図 4)。これらの結果より、ME-type 微小腫瘍は足場依存性が低く、Stride(-)上の微小腫瘍が多いため、管腔構造を多く形成することが示唆された。3D 再構築画像解析によって、Stride(-)上で自己組織化した EM-type、ME-type PDAC 微小腫瘍は直径約 30 μm のポリープ状であることがわかった(図 4, 5)。PDAC の病理学的な特徴として、管腔構造を取り巻く線維性間質における重度の間質線維化反応が挙げられる(Kamisawa T. et al., 2016)。線維性間質で満たされたヒト浸潤性 PDAC 病変において、細胞内細胞構造及び、管腔構造を伴った非常に類似した構造が高頻度で観察された(図 6)。基板を使用した *in vitro* の本研究結果より、PDAC 患者で観察された悪性病変の特徴的な構造は豊富な線維性間質の中に埋もれる前に出現する可能性が考えられた(図 4, 5, 6)。さらに、ME-type 微小腫瘍は EM-type 微小腫瘍と比較して、管腔構造において死細胞が頻繁に観察された(図 6)。この結果より、エンタースが起こった後、細胞死に誘導され、予後不良につながる可能性が考えられた(Cano C.E. et al., 2012 ; Hamann J.C. et al., 2017)。

結論

① 本研究から得られた新知見

- 上皮系形質を保った CD44 陽性 PDAC 細胞株は、HEK293T 細胞との直接共培養によって、CD44 強陽性 Ad-MCA を形成した。
- Ad-MCA を形成した CD44v3-10^{high}/CD44s^{low} PDAC 細胞のみ、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した。
- *in vitro* と同様な Ad-MCA の形成は、マウス腹膜播種モデルでも誘導された。
- HEK293T と直接共培養された PDAC 細胞において、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。
- マイクロ・ナノ基板上での培養によって、マイクロスケール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。
- 上皮系形質を保持した PDAC 細胞は、エントーシスを介して PDAC 微小腫瘍を形成し、組織運動極性を獲得、管腔へと分化成熟した。
- PDAC 微小腫瘍は、PDAC 外科検体の腫瘍部位における、大きさ、細胞内細胞構造、管腔形成を含む構造が類似した。
- 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仮足によって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した。
- PDAC 微小腫瘍は、NK 細胞からの攻撃を回避した。
- PDAC 微小腫瘍は、EMT の進行度に応じ、マイクロスケールパターンへの足場依存性、伸張性が低下した。
- EMT の進行度の異なる PDAC 細胞によって自己組織化された微小腫瘍は、大きさ、管腔構造の形成率及び、有糸分裂期細胞の位置が異なった。

② 新知見の意義

PDAC 細胞は、Ad-MCA を形成することで、癌幹細胞様の治療抵抗性を獲得、さらに、あたかも正常組織であるかのように遺伝子発現パターンを変化させることによって、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。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可能性が考えられた。

PDAC 微小腫瘍は、体表面に PS を蓄積させることにより、見かけ上は死細胞の表現型となることで、免疫細胞から攻撃対象として認識されず、癌の免疫回避の要因となる可能性が示唆された。本研究によって、PDAC の腫瘍ダイナミクスを体外で可視化することは、革新的な新規抗癌剤の開発に役立つことが示唆された。

PDAC 細胞の EMT 進行度は、腫瘍ダイナミクスに大きく影響を与えることが示唆された。

③ 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

一連の研究によって、EMT が誘導される前の適応度の低い PDAC 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ことを明らかにした。PDAC の細胞集団組織としての腫瘍ダイナミクスの機序を詳細に理解することは、PDAC の激しい治療抵抗性の本質に迫ることとなり、今回得られた知見に基づき今後は、より効果的な新規 PDAC 治療法の開発へと繋げるさらなる研究が望まれる。

④ 今後の課題

本研究によって、PDAC の治療抵抗性の本質に迫るためには、PDAC の細胞集団組織としての腫瘍ダイナミクスを理解することが重要であることが示された。本研究によって得られた成果を、今後、PDAC を標的とした新たな治療戦略の開発へと繋げていくためには、抗癌剤暴露によるダイナミクス変化やさらなる詳細な分子機序の解明を行う必要がある。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださりご指導とご校閲を賜りました、北海道大学大学院医学研究院分子病理学教室 笠原正典教授に深くお礼申し上げます。

また、直接研究のご指導、ご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院医学研究院分子病理学教室 宮武由甲子助教、ならびに分子病理学教室員各位に深くお礼申し上げます。

なお、本研究の一部は、北海道大学大学院特別教育プログラム 新渡戸スクール プロジェクト助成金による助成を受けたものです。また、科研費基盤研究(C) 2646046、科学技術振興機構(JST) A-STEP 機能検証フェーズ VP3011806807、実証研究フェーズ JPMJTM19Y2 の助成を受けたものです。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* *119*, 1438–1449.

Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., DePinho, R.A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* *15*, 3112–3126.

Aiello, N.M., Brabletz, T., Kang, Y., Nieto, M.A., Weinberg, R.A., Stanger, B.Z. (2017). Upholding a role for EMT in pancreatic cancer metastasis. *Nature.* *547*, E7–E8.

Arora, S., Bhardwaj, A., Singh, S., Srivastava, S.K., McClellan, S., Nirodi, C.S., Piazza, G.A., Grizzle, W.E., Owen, L.B., Singh, A.P. (2013). An undesired effect of chemotherapy: gemcitabine promotes pancreatic cancer cell invasiveness through reactive oxygen species-dependent, nuclear factor κ B- and hypoxia-inducible factor 1 α -mediated up-regulation of CXCR4. *J. Biol. Chem.* *288*, 21197–21207.

Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K.F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J.L., Gallick, G.E., Logsdon, C.D., McConkey, D.J., Choi, W. (2009). Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.* *69*, 5820–5828.

Balasubramanian, K., Mirnikjoo, B., Schroit, A. J. (2007). Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. *J. Biol. Chem.* *282*, 18357–18364.

Berg, K.B. and Schaeffer, D.F. (2018). Tumor budding as a standardized

parameter in gastrointestinal carcinomas: more than just the colon. *Modern Pathol.* *31*, 862–872.

Birge, R. B., Boeltz, S., Kumar, S., Carlsin, J., Wanderley, J., Calianese, D., Barcinski, M., Brekken, R.A., Huang, X., Hutchins, J.T., et al. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.* *23*, 962–978.

Borovski, T., De Sousa, E., Melo, F., Vermeulen, L., Medema, J.P. (2011). Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.* *71*, 634–639.

Brown, R.L., Reinke, L.M., Damerow, M.S., Perez, D., Chodosh, L.A., Yang, J., Cheng, C. (2011). CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* *121*, 1064–1074.

Burris, H.A., Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoffet, P., et al. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* *15*, 2403–2413.

Caliari, S. R. and Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat. Methods.* *13*, 405–414.

Cano, C.E., Sandí, M.J., Hamidi, T., Calvo, E.L., Turrini, O., Bartholin, L., Loncle, C., Secq, V., Garcia, S., Lomberg, G., et al. (2012). Homotypic cell cannibalism, a cell-death process regulated by the nuclear protein 1, opposes to metastasis in pancreatic cancer. *EMBO Mol. Med.* *4*, 964–79.

Craene, B.D. and Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer.* *13*, 97–110.

Dobbelstein, M. and Moll, U. (2014). Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 179–196.

Fais, S. and Overholtzer, M. (2018). Cell-in-cell phenomena in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* *18*, 758–66.

Gjorevski, N., Sachs, N., Manfrin, A., Giger, S., Bragina, M.E., Ordóñez-Morán, P., Clevers, H., Lutolf, M.P. (2016). Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature.* *539*, 560–564.

Gravelle, P., Jean, C., Familiades, J., Decaup, E., Blanc, A., Bezombes-Cagnac, C., Laurent, C., Savina, A., Fournié, J.J., Laurent, G. (2014). Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival, chemoresistance, and sensitivity to immune effectors in follicular lymphoma. *Am. J. Pathol.* *184*, 282–295.

Grigore, A.D., Jolly, M.K., Jia, D., Farach-Carson, M.C., Levine, H. (2016). Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J. Clin. Med.* *5*, 51.

Hamann, J.C., Surcel, A., Chen, R., Teragawa, C., Albeck, J.G., Robinson, D.N., Robinson, N., Overholtzer, M. (2017). Entosis Is Induced by Glucose Starvation. *Cell Rep.* *20*, 201–10.

Hezel, AF., Kimmelman, AC., Stanger, BZ., Bardeesy, N., Depinho, RA. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* *10*, 1218–1249.

Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* *362*, 1605–17.

Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., et al. (2003).

Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell.* *5*, 437–450.

Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E.S., Goodman, S.N., Kern, S.E., Klimstra, D.S., Klöppel, G., Longnecker, D.S., et al. (2001) . Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* *25*, 579–86.

Ishihara, K., Aragaki, R., Ueda, T., Watanabe, A., Nakabayashi, N. (1990). Reduced thrombogenicity of polymers having phospholipid polar groups. *J. Biomed. Mater. Res.* *24*, 1069–1077.

Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., et al. (2011). CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(–) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell.* *19*, 387–400.

Jordan, M. A. and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer.* *4*, 253–265.

Kamisawa, T., Wood, L.D., Itoi, T., Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *Lancet.* *388*, 73–85.

Karamitopou, E., Zlobec, I., Born, D., Kondi-Pafiti, A., Lykoudis, K., Mellou, A., Gennatas, K., Gloor, B., Luglia, A. (2012). Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. *Eur. J. Cancer.* *49*, 1032–1039.

Kishimoto, T., Ishikura, H., Kimura, C., Takahashi, T., Kato, H., Yoshiki, T. (1996) . Phenotypes correlating to metastatic properties of pancreas adenocarcinoma in vivo: the importance of surface sialyl Lewis(a) antigen. *Int. J.*

Cancer. *69*, 290–4.

Kiuchi, S., Ikeshita, S., Miyatake, Y., Kasahara, M. (2015). Pancreatic cancer cells express CD44 variant 9 and multidrug resistance protein 1 during mitosis. *Exp. Mol. Pathol.* *98*, 41–46.

Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La-Vecchia, C., Johnson, C.D., Biankin, A.V., Neale, R.E., Tempero, M., Tuveson, D.A., Hruban, R.H., et al. (2016). Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers.* *2*, 16022.

Krishna, S. and Overholtzer, M. (2016). Mechanisms and consequences of entosis. *Cell Mol. Life Sci.* *73*, 2379–86.

Kroemer, G. and Perfettini, J. L. (2014). Entosis, a key player in cancer cell competition. *Cell Res.* *24*, 1280–1281.

Kuribayashi, K., Tsuda, Y., Nakamura, H., Takeuchi, S. (2010). Micro-patterning of phosphorylcholine-based polymers in a microfluidic channel. *Sensors and Actuators B: Chemical.* *149*, 177–183.

Bot, N.L. (2007). Entosis: cell death by invasion. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1346.

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* *67*, 1030–1037.

Li, D., Xie, K., Wolff, R., Abbruzzese, J. L. (2004). Pancreatic cancer. *Lancet.* *363*, 1049–1057.

Li, L. and Bhatia, R. (2011). Stem cell quiescence. *Clin. Cancer Res.* *17*, 4936–4941.

Licht, T., Bross, K.J., Fiebig, H.H., Schötta, K., Berger, D.P., Dreher, C., Löhr, G.W., Herrmann, F. (1992). Expression of the proliferation-associated Ki-67 antigen of transferrin receptors and of DNA polymerase alpha in human tumour lines: implications for in vitro chemoresistance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *118*, 116–122.

Lima, L. G., Chammas, R., Monteiro, R. Q., Moreira, M. E., Barcinski, M. A. (2009). Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Lett.* *283*, 168–175.

Mani, S. A. Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* *133*, 704–715.

Matsuda, Y., Kawamoto Y., Teduka K., Peng W.X., Yamamoto T., Ishiwata T., Naito Z. (2011). Morphological and cytoskeletal alterations of nervous system tumor cells with different culturing methods. *Int. J. Oncol.* *38*, 1253–1258.

Miyatake, Y., Shigetomi, K.K., Ohta, Y., Ikeshita, S., Subagyo, A., Sueoka, K., Kakugo, A., Amano, M., Takahashi, T., Okajima. T., et al. (2018). Visualising the dynamics of live pancreatic microtumours self-organised through cell-in-cell invasion. *Sci. Rep.* *8*, 14054

Miyatake, Y., Ohta, Y., Ikeshita, S., Kasahara, M. (2018). Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces a quiescent stem-like intractable phenotype in pancreatic cancer cells. *Oncotarget.* *9*, 29845–56.

Miyatake, Y., Oliveira, A.L., Jarboui, M.A., Ota, S., Tomaru, U., Teshima, T., Hall, W.W., Kasahara, M. (2013). Protective roles of epithelial cells in the survival of adult T-cell leukemia/ lymphoma cells. *Am. J. Pathol.* *182*, 1832–1842.

Miyatake, Y., Sheehy, N., Ikeshita, S., Hall, W.W., Kasahara, M. (2015). Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like ATL cells in an NF- κ B- and vimentin-dependent manner. *Cancer Lett.* *357*, 355–363.

Morris 4th, J.P., Wang, S.C., Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Rev. Cancer.* *10*, 683–695.

Notta, F., Chan-Seng-Yue, M., Lemire, M., Li, Y., Wilson, G.W., Connor, A.A., Denroche, R.E., Liang, S.B., Brown A.K., Kim, J.C., et al. (2016). A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature.* *538*, 378–382.

Overholtzer, M., Mailleux, A.A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S.J., King, R.W., Cibas, E.S., Brugge, J.S. (2007). A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell.* *131*, 966–979.

Pampaloni, F., Reynaud, E. G., Stelzer, E. H. (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 839–845.

Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Keymeulen, A.V., Brown, D., Moers V., Lemaire, S., et al. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature.* *556*, 463–8.

Perera, R. M., Stoykova, S., Nicolay, BN., Ross, KN., Fitamant, J., Boukhali, M., Lengrand, J., Deshpande, V., Selig, MK., Ferrone, C.R., et al. (2015). Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature.* *524*, 361–365.

Poruchynsky, M. S., Komlodi-Pasztor, E., Trostel, S., Wilkerson, J., Regairaz, M., Pommier, Y., Zhang, X., Maity, T.K., Robey, R., Burotto, M., et al. (2015). Microtubule-targeting agents augment the toxicity of DNA-damaging agents by disrupting intracellular trafficking of DNA repair proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *112*, 1571–1576.

Ranga, A., Gjorevski, N., Lutolf, M. P. (2014). Drug discovery through stem cell-based organoid models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *69–70*, 19–28.

Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., et al. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell.* *148*, 349–361.

Rocha Lima, C. M., Green, M.R., Rotche, R., Miller Jr, E.H., Jeffrey, G.M., CisarAdele-Morganti L.A., Orlando, N., Gruia, G., Miller, L.L. (2004). Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. *J. Clin. Oncol.* *22*, 3776–3783.

Seifert, L., Werba, G., Tiwari, S., Giao-Ly, N.N., Alothman, S., Alqunaibit, D., Avanzi, A., Barilla, R., Daley, D., Greco, S.T., et al. (2016). The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature.* *532*, 245–249.

Su, Y.J., Lai, H.M., Chang, Y.W., Chen, G.Y., Lee, J.L. (2011). Direct reprogramming of stem cell properties in colon cancer cells by CD44. *EMBO J.* *30*, 3186–3199.

Thoma, C. R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J. M., Krek, W. (2014). 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *69–70*, 29–41.

Vaccaro, V., Sperduti, I., Milella, M.(2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* *365*, 768–9.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin. *V. J. Immunol Methods.* *184*, 39–51.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H., Goggins, M.(2011). Pancreatic cancer. *Lancet.* *378*, 607–20.

Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., et al.(2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature.* *518*, 495–501.

Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A.S., Ali, S., Abbruzzese, J.L., Gallick, G.E., Sarkar, F.H.(2009). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res.* *69*, 2400–2407.

Wendt, D., Riboldi, S. A., Cioffi, M., Martin, I.(2009). Potential and bottlenecks of bioreactors in 3D cell culture and tissue manufacturing. *Adv. Mater.* *21*, 3352–3367.

Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., et al.(2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell.* *149*, 656–670.

Yu, J., Blackford, A. L., Dal Molin, M., Wolfgang, C. L., Goggins, M.(2015). Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high

tumour stages. *Gut*. *64*, 1783–1789.

Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.C., LeBleu, V.S., Kalluri, R. (2015). Epithelial–mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*. *527*, 525–530.

Zöller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer*. *11*, 254–67.

Zlobec, I., Berger, M.D., Lugli, A. (2020). Tumour budding and its clinical implications in gastrointestinal cancers. *Br. J. Cancer*. *123*, 700–708.