

学位論文の要約

三重大学

| | | | |
|----|--|----|-------|
| 所属 | 三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 病態解明医学講座 腫瘍病理学分野 | 氏名 | 藤原 雅也 |
|----|--|----|-------|

主論文の題名

ASF-4-1 fibroblast-rich culture increases chemoresistance and mTOR expression of pancreatic cancer BxPC-3 cells at the invasive front *in vitro*, and promotes tumor growth and invasion *in vivo*

*In vitro*において、膵臓癌細胞 BxPc-3 と線維芽細胞 ASF-4-1 を共培養すると、腫瘍先端部では化学療法抵抗性の増加と mTOR 発現の亢進がみられ、さらに *in vivo* においては腫瘍増殖と浸潤が促進された。

Masaya Fujiwara, Kazuki Kanayama, Yoshifumi S. Hirokawa, Taizo Shiraishi

Oncology Letters 2016;11:2773-2779

Published: March 1, 2016

doi:10.3892/ol.2016.4289

主論文の要約

導入

大腸癌や早期乳癌においては、癌細胞と間質細胞の割合が予後と相関すると言われているが、膵臓癌において間質細胞比と腫瘍促進の関係性についての報告はない。膵臓癌で、間質細胞比が変化することで悪性度がどのように変化するか検討する。

背景

癌生物学において、癌微小環境は非常に重要な概念である。癌微小環境とは、癌細胞と細胞外基質、及び間質細胞によって構成され、これらの相互作用によって腫瘍細胞は増殖し、浸潤が起きる。また、扁平上皮癌では 3D 培養環境において、線維芽細胞が腫瘍浸潤を誘導することが証明されており、膵臓癌でも間質線維芽細胞が腫瘍進展を促進することが分かっている。細胞機能や相互作用の解析には、3D 培養環境が *in vivo* や体内での癌微小環境をより反映しているため有用である。

腫瘍簇出は浸潤先端部において脱分化した腫瘍細胞の小クラスター(1-5 個の細胞)と定義されるが、食道癌や結腸直腸癌と同様に膵臓癌においても独立した予後因子となっている。腫瘍簇出は転移結節と密接に関連し、上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition; EMT)を起こして腫瘍

浸潤を促進することが分かっている。膵臓癌において、線維芽細胞数が増えれば簇出が増加するかどうかを検討する。一方、Mammalian target of rapamycin(mTOR)はリボソームでのタンパク合成を調整することで細胞の大きさを調整するが、mTOR 発現亢進と腫瘍進展、化学療法抵抗性との関連が明らかとなっている。

目的

今回我々は、膵臓癌において、間質細胞比が増加することで悪性度が増加するかどうかを研究した。体内での癌微小環境を模倣するため、膵臓癌細胞 BxPC-3 とヒト皮膚線維芽細胞 ASF-4-1 を細胞外器質コラーゲンゲル使用下で 3D 共培養を行い、線維芽細胞比を変化させた際に腫瘍簇出や mTOR 発現、並びに化学療法抵抗性がどのように変化するかを検討することで悪性度の変化を評価した。

方法

ヒト膵臓癌細胞 BxPC-3 とヒト皮膚線維芽細胞を使用し、培養を行った。Matrigel と Atelocell を 1:3 の割合で混合したものを $8\mu\text{m}$ 孔の Cell Culture Insert に分注し、24 穴プレートの well 上に留置した。37℃で 1 時間待ち、Cell Culture Insert 内の混合ゲルが凝固してから RPMI-1640(10%ウシ胎児血清(FBS)と penicillin を加えたもの)を Cell Culture Insert の下の well に $500\mu\text{l}$ 分注し、well 内の medium に Cell Culture Insert が半分程度浸る状態とした。また、 $100\mu\text{m}$ で 1.0×10^6 個となるように FBS を加えていない RPMI-1640 で調整した BxPC-3 と ASF-4-1 を、比を 1:1(fibroblast-poor)、1:3(fibroblast-rich)と変えて Cell Culture Insert 内の混合ゲル上に散布した。その後 48 時間培養してから顕微鏡で形態を観察し、混合ゲルと腫瘍塊をまとめて 10%ホルマリンに 6 時間浸透させ、HOLD GEL で固めてパラフィン固定を行った。ブロックを $3\mu\text{m}$ の厚さで薄切し、ヘマトキシリンエオジン染色や免疫染色を行った。使用抗体は CK-18、E-cadherin、M30 CytoDEATH、vimentin、MIB-1、CD31、mTOR 抗体で、mTOR 阻害剤にはラパマイシンを、抗癌剤はゲムシタピンを使用した。Ki-67index は MIB-1 染色を施行して測定した。mTOR の染色評価は腫瘍先端部で染色範囲、染色強度をスコア化し、比較検討した。

マウスはオスの SCID マウス(severe combined immunodeficiency mice)8 週のものを使用し、無菌室で 12 時間毎の日照、及び自由な食事、水分を与えた。BxPC-3(1.0×10^5 個)と ASF-4-1 を 1:1、1:3 の割合で前述の方法で 3D 共培養し、48 時間後の腫瘍塊を背中皮下に移植した。移植後 4 週、6 週、8 週、10 週で 5 匹ずつ殺処理を CO₂ 吸入で行い、腫瘍を摘出して比較検討を行った。

結果

線維芽細胞の比率が高い共培養での BxPC-3 の方が、線維芽細胞の比率が低い状態で共培養した BxPC-3 よりも腫瘍簇出が多く観察され、細胞が有意に大きく、腫瘍先端部では mTOR の発現上昇が見られた。また、ゲムシタピンに対して耐性を示した。さらに、mTOR 阻害剤であるラパマイシンを加えると、腫瘍先端部での腫瘍浸潤が抑制され、先端部では有意に MIB-1 index が低値となった。In vivo においては、線維芽細胞の比率が高い共培養での BxPC-3 移植片の方が、線維芽細胞の比率が低い状態で共培養した BxPC-3 移植片と比較して、移植後 6 週、8 週、10 週いずれにおいても MIB-1 index が高値を示し、細胞には核異型や多型が目立ち、扁平上皮への分化や

神経周囲侵襲が見られた。血管新生については CD31 陽性細胞をカウントしたが、有意な差は認められなかった。

結論

膵臓癌細胞 BxPc-3 と高量の線維芽細胞 ASF-4-1 を共培養すると、腫瘍先端部において簇出の増加、mTOR 発現上昇、化学療法抵抗性の増加が見られ、*in vivo* においても腫瘍増殖と浸潤が促進された。以上から、*in vivo*, *in vitro* いずれにおいても、高量の線維芽細胞と共培養した BxPC-3 細胞は、低量の線維芽細胞と共培養した BxPC-3 細胞に比較すると悪性度が高い可能性が示唆された。