The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The impact of cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype in cancer-associated fibroblasts on the malignancy of pancreatic cancer
Author(s)	東口, 公哉
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/93038
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	東口　公哉
論文題名 Title	The impact of cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype in cancer-associated fibroblasts on the malignancy of pancreatic cancer （癌関連線維芽細胞の細胞老化と細胞老化随伴分泌現象が膵癌の悪性度に与える影響）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

5年生存率が約10%と極めて予後不良な膵癌に特徴的な病態として、他の腺癌よりも癌間質が極めて豊富であることが挙げられ、その癌間質を構成する細胞のうち癌関連線維芽細胞(CAF)が治療抵抗性に深く関与している可能性が指摘されている。近年ではさらに、CAFにも様々な機能を有したサブタイプが存在し、その不均一性や個体差が膵癌の悪性度に影響することが明らかとなってきた。このような背景から、CAFを対象とした膵癌の新規治療戦略の開発に期待が寄せられている。

われわれは、癌微小環境における腫瘍促進的な状態を形成する現象の一つとして、細胞老化随伴分泌現象(SASP: Senescence-associated secretory phenotype)に着目した。細胞老化とは、正常細胞において発癌を誘発し得る修復不可能なDNA損傷が生じることで生じる不可逆的な増殖停止状態を指し、本質的には発癌抑制機構である一方で、細胞老化細胞の一部はSASPを介して炎症性サイトカインを分泌し、むしろ腫瘍促進的な微小環境を形成する可能性がある。老化間質細胞によるSASP因子の一部は大腸癌や前立腺癌に影響することが示唆されているが、本来生じる可能性のある老化間質細胞の個体差や、治療標的としての効果は検討されておらず、癌間質が豊富な膵癌において、間質細胞の細胞老化やSASPの意義を、より詳細に検討にする必要がある。以上から、本研究においては、CAFが膵癌の悪性度に与える影響を細胞老化やSASPの観点から検討し、新規治療標的としての可能性を評価した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

大阪大学医学部附属病院で手術を施行した8例の膵癌切除標本から腫瘍組織の一部を切り出して数mm角に細切し、以下の割合のウシ胎児血清(2日目まで20% 、以降は10%)を含有したDMEM培地を用いてCAFを初代培養し、以下の実験に用いた。

まず、これら8例のCAF(各1.0×10^4個)と膵癌細胞株であるPSN-1(1.0×10^5個)とを、0.4μmの小孔をもつチャンバーを介した非接触法で48時間共培養し、膵癌細胞株の増殖を評価した。その結果、CAFの個体差によって膵癌細胞株の増殖が変化し、最大差は約1.4倍であった($p<0.001$)。膵癌細胞株の増殖に影響した因子として、8例の臨床学的因子を検討すると、高齢患者に由来したCAFが、より膵癌細胞株を増殖させる傾向が認められ($r=0.705$, $p=0.051$)、CAFの細胞老化が膵癌の増殖に関連する可能性が示唆された。

次に、膵癌細胞株の増殖に関連したCAFの遺伝子発現解析を行った。各CAF(各1.0×10^4個)を用いて、ヒトAB型血清12時間刺激による発現上昇率(fold-change = (血清刺激時の発現量) / (血清飢餓状態での発現量))を、細胞老化・SASPに関するPCR array(QUIAGEN RT² Profiler™)で解析した。その結果、膵癌細胞株の増殖と有意に相関し、血清刺激に伴い発現上昇した遺伝子群は、*TP53*、*CDKN1A/p21*、*CDKN2A/p16*、*NFKB1*、*IL6*であった(いずれも$r>0.75$, $p<0.05$)。これらの遺伝子群の発現上昇率は、術前化学療法を行った6例における化学療法前後の腫瘍径比率と有意に相関した(いずれも$r>0.85$, $p<0.05$)ことから、CAFにおけるこれらの遺伝子発現は、膵癌における治療抵抗性に関連すると推察された。

以上の候補遺伝子群から、癌抑制遺伝子としても既報の多い*TP53*に着目し、*in vitro*で検証した。3例のCAFを用いて、p53の特異的阻害剤であるpifithrin-α(10μM)を5日間投与し、膵癌細胞株と共培養し、増殖に与える影響を検討した。pifithrin-α処理後のCAFと共培養した膵癌細胞株の増殖は、pifithrin-αで処理していないCAFと共培養した場合に比較して有意に抑制された(蛍光強度 4272±434 vs. 2379±251, $p<0.01$)。この共培養上清中に含まれるIL-6の濃度をELISA法で測定したところ、pifithrin-α処理後のCAFにおいて、有意なIL-6濃度の低下がみられた(441.4±304.4 pg/ml vs. 265.2±159.1 pg/ml, $p<0.05$)。IL-6は主要なSASP因子の一つであり、pifithrin-αがCAFのp53/p21経路を介した細胞老化やSASPの誘導を抑制したことで、膵癌細胞株の増殖が低下した可能性が示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

CAFの個体差は膵癌の増殖に影響し、その機序の一つとしてCAFのp53/p21経路を介した細胞老化とSASPが関連することを示した。これらは膵癌における新たな治療標的となりうる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　東口　公哉

		（職）	氏　　名	
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	江口 英利	署　名
	副　査	大阪大学教授	山下 浩文	署　名
	副　査	大阪大学教授	島津 研三	署　名

論文審査の結果の要旨

近年、癌関連線維芽細胞(CAF) の不均一性や個体差が膵癌の悪性度に関連するという報告が増えており、CAFを標的とした膵癌の新規治療戦略の開発に期待が寄せられている。しかし、CAFのどのような因子を治療標的にすべきかについては、現在も明らかとなっていない。一方、細胞老化が誘導された細胞の一部は、細胞老化随伴分泌現象(SASP)によって腫瘍促進的な微小環境を形成することが知られている。そこで本研究では、CAFの個体差が膵癌の悪性度に与える影響を、CAFの細胞老化の観点で検討した。本研究では、8例の膵癌切除標本から初代培養したCAFを使用し、膵癌細胞株との共培養実験や、CAFに対する遺伝子発現解析により、CAFにおける細胞老化・SASP関連遺伝子の発現が、膵癌細胞株の増殖に関連することを明らかにした。

本研究は、膵癌において、CAFの細胞老化・SASPが新規治療標的となり得ることを報告した点において学位論文に値する。