

令和元年6月4日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07109

研究課題名(和文) 膵癌の微小環境におけるケモカインシグナルのインパクトとその作用機序の検討

研究課題名(英文) Impact of chemokine signals in the tumor microenvironment of pancreatic cancer

研究代表者

伊佐山 浩通 (ISAYAMA, Hiroyuki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70376458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：最難治癌の膵癌の病態解明と予後に寄与する治療の開発は急務である。これまでに膵癌細胞と線維芽細胞の双方がCXCケモカインを産生して相互の細胞浸潤・遊走を促進し腫瘍促進効果を示すことを明らかにしてきた。本研究では、臨床の膵癌像をよく再現する膵発癌モデルにおいてケモカイン受容体Cxcr2の全身ヘテロノックアウトを加えた際の表現型を解析した。Cxcr2のヘテロノックアウトにより、担癌マウスの生存期間が有意に延長し、腫瘍組織では癌細胞の脈管浸潤が減弱し、また好中球・MDSC浸潤が減弱し、マクロファージのM1/M2比が上昇する免疫炎症系微小環境のシフトが生じており、癌細胞のアポトーシスが増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は、最も予後不良な最難治癌であり、罹患数・癌死数とも増加の一途を示しているため、膵癌の病態理解および予後改善につながる知見は、社会的にもインパクトが大きい。膵癌は間質の増生・著明な線維化が組織学的に大きな特徴であり、癌の微小環境における腫瘍・間質間の相互作用が予後を含めた病態に深く関わっていると考えられるが、間質をいかに制御すべきかについてはまだ確立されていない。本研究では、CXCケモカインシグナル阻害による腫瘍間質相互作用の抑制が、膵癌における免疫炎症系微小環境のシフトを生じ、生命予後改善に寄与することが示され、微小環境の制御を通じた膵癌制御の新たなメカニズムを示した。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is one of the most deadly cancers. Understanding the biology and development of therapeutics contributing to the prognosis are urgently needed. Previously, we found that both pancreatic cancer cells and cancer-associated fibroblasts produce CXC chemokines that enhance cell invasion and migration each other, thereby promoting cancer progression. In this study, global Cxcr2 heterozygous knockout in a clinically-relevant murine pancreatic cancer model was achieved and analyzed. It demonstrated significant survival extension of the cancer-bearing mice, accompanied by decreased microvessel invasion of the cancer cells. We also observed a shift of immune-inflammatory microenvironment: decreased tumor-infiltrated neutrophils and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and increased M1/M2 ratio of the tumor-infiltrated macrophages, which resulted in increased apoptosis of the tumor cells.

研究分野：消化器内科学、膵臓、胆道

キーワード：膵癌 ケモカインシグナル CXCR2 ノックアウトマウス 膵発癌モデル 微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治癌の最たるものであり、その病態の解明と予後に寄与する治療法の開発は急務である。現在膵癌は年々増加傾向で、日本人の癌死の第4位となり、5年生存率は依然として9%程度と極めて不良である。米国では2030年には肺癌に次ぐ第2位の癌死の原因となることが最近米国癌学会から報告された。

膵癌の発癌および進展のメカニズムを理解するため、近年、膵臓特異的な遺伝子改変マウスによる、ヒトの膵癌をよく模倣する膵癌モデルが作成されてきた。その中でも、我々が樹立した恒常活性型 $Kras^{G12D}$ 発現 + TGF- β 型受容体ノックアウト ($Kras+Tgfbr2^{KO}$) という組合せのマウスは、ヒト膵癌と同様の臨床的症候を呈し、かつ著明な間質の増生・線維化 (desmoplasia) を伴う分化型管状腺癌が得られ、既報のモデルで報告されていた肉腫様の未分化腫瘍もみられず、最もヒトの膵癌に似たモデルと考えられる (Ijichi et al., Genes Dev 2006)。このモデルでは、前癌病変である PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) の段階的進行も見られ、ヒトの多段階発癌過程をもなぞらえている。

従来、膵癌の in vivo モデルは、ヌードマウスを用いた xenograft モデルが主流であったが、癌の微小環境が保たれ免疫系にも欠損がない点と発癌する過程を再現できる点では、特に遺伝子改変モデルが優れている。したがって、本研究において癌の微小環境を解析するには、臨床の膵癌像をよく近似する我々の遺伝子改変モデルが適していると言える。

近年、癌という疾患の研究は癌細胞のみの研究では不十分であり、癌細胞を取り巻く間質部分を含めた癌の微小環境の重要性が注目されている (Mueller and Fusenig, Nat Rev Cancer 2004)。特に腫瘍組織において間質が非常に豊富な膵癌では、腫瘍間質相互作用が病態において大きな比重を占めると考えられ、これが特に癌の悪性度の高さとも関連している可能性がある。癌の微小環境には、腫瘍血管、線維芽細胞、マクロファージ・リンパ球等の免疫・炎症性細胞が存在し、これらは癌の微小環境において癌細胞に教育され、腫瘍促進的に働くようになるという考えが定着してきていた (Kalluri and Zeisberg, Nat Rev Cancer, 2006; Pollard, Nat Rev Cancer, 2004)。したがって、これら癌の微小環境を修飾することが、癌に対する治療の介入点となり得ると考えられた。しかしその後、膵癌の間質の volume を減らすことが癌の悪性度を高め、生命予後をも悪化させるという報告もなされ (Ozdemir et al., Cancer Cell, 2014; Rhim et al., Cancer Cell, 2014)、膵癌の微小環境とその修飾の意味付けについては、再び議論の分かれるところとなっている。

我々はこれまで $Kras+Tgfbr2^{KO}$ モデルを用いて膵癌の微小環境における腫瘍間質相互作用を研究してきた。マウスの癌組織から分離した膵癌細胞は、複数の CXCR2 ケモカインを特徴的に産生分泌しており、実際に膵癌組織での発現が確認された。これらケモカインは、癌細胞自身の増殖には直接影響しなかったが、受容体 CXCR2 を介し膵線維芽細胞からも複数のケモカイン・サイトカイン産生を誘導し、結果として腫瘍促進的な腫瘍間質相互作用があることがわかった。そこで CXCR2 阻害剤を膵発癌マウスに投与すると抗腫瘍効果を示し、生存期間が有意に延長した。すなわち、膵癌の腫瘍間質相互作用の遮断が、膵癌の治療になり得るということである (Ijichi et al, J Clin Invest 2011)。その後の検討で、癌組織中の線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast, CAF) は、正常膵のそれと比べ base の遺伝子発現プロファイルが異なり、また癌細胞からの刺激に対する応答としての発現プロファイルも異なることがわかった。驚いたことに、CAF の応答には、癌細胞が出す CXCR2 リガンドと同じものが上位に見出され、癌細胞と CAF が同じ分子を分泌し互いの浸潤能・遊走能を高めるという結果が得られ、CXCR2 シグナルがそれまでの想定以上に重要であることが示唆された。また CAF は CCR2 リガンドも大量に産生し、それは癌細胞からの刺激でさらに誘導されることがわかった。すなわち、膵癌の特徴である線維化 (desmoplasia) を示す微小環境において、ケモカインシグナルが膵癌の発育進展に重要であるとする知見が蓄積されてきている。

2. 研究の目的

本研究では、膵癌微小環境において腫瘍間質相互作用の鍵と考えられるケモカイン受容体 CXCR2 および CCR2 の膵癌発育進展におけるインパクトを明らかにするために、 $Kras+Tgfbr2^{KO}$ モデルにおいて CXCR2、CCR2 のノックアウト・ノックダウンを行い、その表現型を明らかにすることを目的とした。これらケモカインシグナルは、膵癌微小環境における腫瘍間質相互作用において重要と考えられるため、そのノックアウト・ノックダウンは、膵臓上皮のみでなく、間質側でも生じる必要があり、コンディショナルではなく全身ノックアウト・ノックダウンとした。さらに膵癌微小環境における CXCR2、CCR2 シグナルの作用機序をモデルの膵腫瘍の組織学的検索に重点をおいて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) $Kras+Tgfbr2^{KO}$ 膵発癌モデルにおいて $Cxcr2$ の全身ヘテロノックアウトを樹立する
元の $Kras+Tgfbr2^{KO}$ 膵発癌モデル (遺伝子型 $Ptf1a^{cre/+}; LSL-Kras^{G12D/+}; Tgfbr2^{flox/flox}$) (以下 PKF) は、遺伝子型 $Ptf1a^{cre/+}; Tgfbr2^{flox/flox}$ (以下 PF) と $LSL-Kras^{G12D/+}; Tgfbr2^{flox/flox}$ (以下 KF) との交配により 1:4 の確率で得られ、膵臓上皮特異的に変異型 $Kras$ 発現と $Tgfbr2$ ノック

クアウトを生じ、100%の浸透率で膵癌を発癌し癌死する。この膵発癌モデルとCxcr2のノックアウトマウスCxcr2^{-/-}の交配を進めることとした。Cxcr2^{-/-} (Cacalano et al., Science 1994)は、Jackson研究所より入手した。Cxcr2^{-/-}マウスはホモノックアウトでは出生率が著明に低下するため、Cxcr2アレルはヘテロノックアウトの状態に維持されており、ホモノックアウトの表現型を解析することは困難と考えられた。したがって、Cxcr2アレルはヘテロノックアウトとし、目的の遺伝子型はPtf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tgfr2^{lox/lox};Cxcr2^{+/-} (以下PKF2h)とした。交配の実際は下記の通りである。

まずPF、KF、もしくはTgfr2^{lox/lox} (以下F)とCxcr2^{+/-}の交配によりCxcr2-アレルとTgfr2^{lox}アレルが共にヘテロの個体が得られる。次いでこの個体とTgfr2^{lox/lox}の交配によりTgfr2^{lox}アレルがホモでCxcr2-アレルがヘテロの個体(以下F2h)が得られる。続いてこのF2hとPFの交配によりPF2h (Ptf1a^{cre/+};Tgfr2^{lox/lox};Cxcr2^{+/-})が得られ、最後にPF2hとKFの交配により、1:8の確率で目的の遺伝子型PKF2hが得られることになる。

(2) Kras+Tgfr2^{KO}膵発癌モデルにおけるCxcr2全身ヘテロノックアウト(PKF2h)の表現型を解析する

PKF2hの表現型を元のPKFとの比較において、Kaplan-Meier曲線、組織像について解析した。

(3) Kras+Tgfr2^{KO}膵発癌モデルにおいてCcr2の全身ノックアウトを樹立する

元のPKF膵発癌モデルとCcr2のノックアウトマウスCcr2^{-/-}の交配を進めることとした。Ccr2^{-/-} (Kuziel et al., PNAS 1997)も、Jackson研究所より入手した。Ccr2^{-/-}マウスはホモノックアウトでも出生率の低下は特にみられず、PKFにおけるCcr2全身ホモノックアウトを目指すこととした。目的の遺伝子型はPtf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tgfr2^{lox/lox};Ccr2^{-/-} (以下PKFC)である。交配の実際は下記の通りである。

まずPF、KF、もしくはTgfr2^{lox/lox} (以下F)とCcr2^{-/-}の交配によりCcr2-アレルとTgfr2^{lox}アレルが共にヘテロの個体が得られる。次いでこれら同士の交配もしくは、Ccr2^{-/-}、やTgfr2^{lox/lox}との交配によりTgfr2^{lox}アレルがホモでCcr2-アレルがヘテロの個体、もしくはTgfr2^{lox}アレルがヘテロでCcr2-アレルがホモの個体が得られる。続いてもう一度交配を繰り返すことにより、PFC (Ptf1a^{cre/+};Tgfr2^{lox/lox};Ccr2^{-/-})とKFC (LSL-Kras^{G12D/+};Tgfr2^{lox/lox};Ccr2^{-/-})が得られ、最後にPFCとKFCの交配により、1:4の確率で目的の遺伝子型PKFCが得られることになる。

(4) Kras+Tgfr2^{KO}膵発癌モデルにおけるCcr2全身ホモノックアウト(PKFC)の表現型を解析する

PKFCの表現型を元のPKFとの比較において、Kaplan-Meier曲線、組織像について解析する予定であった。

4. 研究成果

(1) Kras+Tgfr2^{KO}膵発癌モデルにおけるCxcr2全身ヘテロノックアウトPKF2hの作成
上記のような交配の過程を経て、目的の遺伝子型Ptf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tgfr2^{lox/lox};Cxcr2^{+/-} (PKF2h)を得ることができた。交配の途中段階では、Cxcr2の全身ヘテロノックアウトかつ膵臓上皮特異的なTgfr2ノックアウトという遺伝子型(Ptf1a^{cre/+};Tgfr2^{lox/lox};Cxcr2^{+/-}, PF2h)が生じたが、特にこの段階で出生率に偏向は表れず、交配の進行に特に支障を来さなかった。

(2) Kras+Tgfr2^{KO}膵発癌モデルにおけるCxcr2全身ヘテロノックアウトPKF2hの表現型の解析

PKF2hは、CXCケモカイン/CXCR2 axisのシグナルが半減することから、これまでに明らかにしてきた腫瘍促進的な腫瘍間質相互作用という方向性からは、Cxcr2ヘテロノックアウトにより、膵癌の形成に抑制がかかることが推測された。さらに、膵癌細胞だけでなく膵癌関連線維芽細胞CAFもCXCケモカインを産生して互いの細胞浸潤や細胞遊走を促進しているという知見から、当初考えていたよりもCXCLs/CXCR2 axisの抑制がもつインパクトは大きいことが予測され、膵癌が形成されなくなる可能性もあるのではないかと考えられた。

PKF2hは有意に生存期間が延長する

PKF2hのKaplan-Meier曲線をPKFと比較すると生存期間は中央値PKF=56日(n=27)に対しPKF2h=75日(n=25)、ログランク検定にてP=0.0164と有意に延長し、ヘテロノックアウトにより膵癌の病勢に抑制的に作用するであろうという予測と一致する結果であった。しかし、膵癌は形成されており、生存期間の延長はあったものの、依然として膵癌で死亡していた。

PKF2hは有意に脈管浸潤が減弱する

組織像の詳細な比較のために、7週齢の時点での膵腫瘍組織をPKF(n=7)およびPKF2h(n=6)から採取し解析した。まず腫瘍が多中心性に生じてくる中で、acinar-ductal

metaplasia および PanIN から浸潤癌への発癌進展過程の grading をしてみると、PKF2h と PKF の間に特に有意な差は認められなかった。Ki67 の免疫染色にも特に差はみられず、細胞増殖も明らかな変化なしという結果であった。一方、CD31 と LYVE1 の染色性をみると PKF に比べ PKF2h で CD31 の染色性が低下しており、腫瘍血管新生が抑制されていることがわかった。リンパ管については明らかな差がないという結果であった。そこで K19 で癌細胞を染めて血管内皮の CD31、リンパ管内皮の LYVE1 との二重染色を行って見たところ、PKF2h では PKF に比べ膵癌細胞の微小血管浸潤が有意に減弱し(PKF 100% v.s. PKF2h 50%)、リンパ管浸潤も減少する傾向(PKF 71.4% v.s. PKF2h 50%)がみられた。

PKF2h は有意に腫瘍への好中球浸潤、MDSC 浸潤が減弱している

腫瘍への好中球浸潤を myeloperoxidase(MPO) , myeloid-derived suppressor cell (MDSC)の浸潤を CD11b と Ly-6G の二重染色で検討したところ、PKF2h では PKF に比べ有意に好中球および MDSC の腫瘍内浸潤が減弱していた。

PKF2h において腫瘍に浸潤したマクロファージは有意に M1 type が増え M2 type が減り、腫瘍細胞のアポトーシスが誘導されている

腫瘍に浸潤したマクロファージを F4/80 にて染色すると PKF2h の方が PKF よりも増加していた。そこで M1 type を iNOS で、M2 type を arginase-1 で検出すると PKF2h では M1 type が増え、M2 type が減っていることが示された。M2 type は腫瘍関連マクロファージとして癌に有利にはたらし、M1 type はアポトーシスを誘導することが知られており、アポトーシス細胞を TUNEL と K19 の二重染色で検出したところ、腫瘍細胞のアポトーシスが PKF2h で有意に増加していることがわかった。

PKF2h, PKF ともリンパ球の腫瘍内浸潤は少ない

CD8, CD4, FOXP3, CD45R の染色にてそれぞれ細胞傷害性 T 細胞、ヘルパー T 細胞、制御性 T 細胞、B 細胞の腫瘍内浸潤を検出したところ、CD8 陽性細胞は PKF2h で減っていたが、いずれも陽性細胞数が少なく、リンパ球系の腫瘍浸潤の寄与はちいさいものと考えられた。

このように、PKF2h では、有意に生存期間の延長が示され、それは、癌細胞の脈管浸潤の減弱と好中球・MDSC の腫瘍内浸潤の減弱の一方、マクロファージの M1 type/M2 type 比の上昇という免疫炎症系微小環境のシフトを介する癌細胞のアポトーシスの増加と相関していることが示唆される結果となった。

本研究を遂行中に Steele らによって、別の膵発癌モデルを用いた Cxcr2 ノックアウトが報告された(Steele et al., Cancer Cell 2016)。ここでは、変異型 Kras 発現 + 変異型 Tp53 発現による膵発癌モデルを用いており、それに対し Cxcr2 の全身ホモノックアウトを樹立していた。しかし、Cxcr2 全身ホモノックアウトでは生存期間は延長しなかったと報告されている。一方、彼らは膵臓上皮特異的 Cxcr2 ノックアウトも行っており、それは肝転移の増大を来し、かえって予後不良となるという結果であった。また CXCR2 阻害剤をモデルに投与すると生存延長効果があり、CD3 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤が増加するため、免疫チェックポイント阻害剤との併用の可能性を示す結果が述べられている。

したがって、我々の結果といくつかの点で相違がみられている。この相違について、我々の結果ではヘテロノックアウトにても生存延長がみられたことから、我々の PKF モデルの方が CXCLs/CXCR2 axis への依存性が高いことが示唆される。

(3) Kras+Tgfb^{2KO}膵発癌モデルにおける Ccr2 の全身ノックアウト

上記の手順により、PKF モデルにおけるもう一方の代表的ケモカインである CC ケモカインの受容体 Ccr2 を全身ノックアウトすることを試みた。しかし、この多段階交配の中で、特に *Tgfb^{2lox}* アレルと *Ccr2*-アレルに何らかの相互排他性が存在するようであり、両アレルがホモとなる産仔が非常に得られにくく、交配の進展が妨げられていた。しかし、その中で両アレルホモの個体が僅かに得られてきて、その個体を用いて交配を進めていくことが可能となった。現在、PFC および KFC の個体を複数得ることができており、それらの交配により目的の PKFC を得ることが可能となっている。ここまでに至るのに時間を要し、PKFC の個体数およびその表現型の解析については、今後の検討を待たねばならない。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Sano M, Ijichi H, Takahashi R, Miyabayashi K, Fujiwara H, Yamada T, Kato H, Nakatsuka T, Tanaka Y, Tateishi K, Morishita Y, Moses HL, Isayama H, Koike K. Blocking CXCLs-CXCR2 axis in tumor-stromal interactions contributes to survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma through reduced cell invasion/migration and a shift of immune-inflammatory microenvironment. *Oncogenesis*, 査読有, Vol. 8, No. 2, 2019, p.8, doi: 10.1038/s41389-018-0117-8

〔学会発表〕(計 3 件)

佐野誠、伊地知秀明、立石敬介、多田稔、伊佐山浩通、小池和彦. 膵癌における CXCLs/CXCR2 阻害は癌免疫環境を修飾し生存に寄与する. 第 49 回日本膵臓学会大会、Jun 29、2018、和歌山

Makoto Sano, Hideaki Ijichi, Ryota Takahashi, Koji Miyabayashi, Keisuke Tateishi, Hiroyuki Isayama, Harold L Moses, Kazuhiko Koike. Blocking CXCLs-CXCR2 axis in tumor-stromal interaction contributes to the survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma via reduced invasion and a shift of immune-inflammatory microenvironment. AACR Special Conference on Pancreatic cancer: Advances in science and clinical care, Sep 23, 2018, Boston, U.S.A.

佐野誠、伊地知秀明、立石敬介、多田稔、小池和彦. Blocking CXCLs-CXCR2 axis in tumor-stromal interaction contributes to the survival in a mouse model of pancreatic cancer. 第 77 回日本癌学会学術総会、Sep 27、2018、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊地知 秀明

ローマ字氏名：IJICHI, Hideaki

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 70463841

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：佐野 誠

ローマ字氏名：SANO, Makoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。