

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04156

研究課題名（和文）膵癌間質のもたらす免疫抑制機能の網羅的解析と治療応用

研究課題名（英文）Analysis of immune suppressing mechanism of pancreatic cancer stroma

研究代表者

下瀬川 徹（Shimosegawa, Tooru）

東北大学・医学系研究科・名誉教授

研究者番号：90226275

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,900,000円

研究成果の概要（和文）： ヒト膵癌の進展に寄与することが明らかとなっている膵星細胞においてインテグリンシグナルの調節分子のノックダウンを行い、癌進展促進機能に与える影響を評価した。また、酸化ストレス応答の制御分子であるNrf2欠損バックグラウンドを膵癌モデルマウスへ導入し、膵癌細胞・膵星細胞株を樹立し、機能解析を行った。

インテグリンシグナル調節分子のノックダウンにより膵星細胞の活性化が抑制された。また、Nrf2欠損膵癌細胞における炎症関連分子の発現低下、Nrf2欠損膵星細胞における癌進展促進作用の減弱が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の実施により、膵星細胞による癌進展促進作用にインテグリンシグナルの調節因子が寄与することが明らかになった。酸化ストレス応答の中核分子、Nrf2は膵癌細胞において炎症性シグナルに關与する複数の分子の発現を制御することが判明した。膵星細胞におけるNrf2は癌促進作用に不可欠であり、酸化ストレス応答は癌細胞・間質細胞の両方で癌進展に寄与していた。以上の知見は膵癌における細胞間相互作用が局所の炎症・免疫機構に与える影響の一端を明らかにしたものであり、治療標的としてさらなる検討を要する。

研究成果の概要（英文）： We performed knockdown experiment of integrin signal regulator in pancreatic stellate cells. We also introduced Nrf2-deletion in a pancreatic cancer model mouse, and established wild-type and Nrf2-deleted cancer cells and stellate cells.

The knockdown of integrin signal regulator resulted in the attenuation of stellate cell activation. Deletion of Nrf2 in cancer cells reduced inflammation-related molecules. Deletion of Nrf2 in stellate cells attenuated cancer promoting effects.

研究分野：消化器内科

キーワード：膵癌間質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

この10年間で様々なシグナル伝達分子や細胞表面抗原、サイトカインや成長因子を標的とした分子標的薬が開発され、癌を含めた種々の疾患で治療効果の改善に大きく貢献している。しかしながら膵癌に対する分子標的薬の効果は十分なものではなく、既存治療と比較して有意差を持って有効であると認められた、本邦で使用可能な治療薬は今のところ erlotinib のみである(J Clin Oncol. 2007)。その生存期間延長効果もわずかなものであり、予後改善に大きく貢献する結果とはなっていない。悪性黒色腫や肺癌に有効性が認められ、適応が拡大している Nivolumab は免疫チェックポイント阻害を主作用とする分子標的薬であり、T細胞表面に存在するPD-1からのシグナルを阻害することにより癌細胞の免疫系からの回避を抑制する効果を持つ。癌細胞側に発現するPD-1リガンドに対する抗体も同様の効果を示すことが判明しており、治療標的として大きく注目されている。しかし、膵癌ではこれら免疫チェックポイント療法単独では有効性が少ない(Cancer Lett. 2016)。

膵癌においては、膵星細胞の活性化により形成される著明な線維化が組織学的特徴である。膵癌細胞と膵星細胞の相互作用は癌細胞の増殖・遊走能の亢進や癌幹細胞機能の維持といった多彩な機能を有し、膵癌進展に寄与していることが報告されてきた(Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2015)。しかし、Sonic hedgehog 阻害剤による膵癌間質枯渇療法はむしろ患者予後を悪化させる結果となり、単純な間質の除去はむしろ膵癌の進展を促進することが明らかとなった(Cancer Cell. 2014)。ゆえに、免疫チェックポイント療法への感受性を回復するための方法として一律な間質細胞の除去は有効な治療となり得ない。間質細胞は癌細胞とT細胞の間のPD-1を介したシグナル伝達以外に付加的な影響を与えることで抗腫瘍免疫を抑制していると予想されるが、その本態は解明されていない。

我々はこれまで、膵星細胞と癌細胞の共培養系解析により、炎症性サイトカインの一つであるIL-6によって膵癌細胞のEMTが誘導されること(Dig Dis Sci. 2016)や、癌細胞・膵星細胞間相互作用に低酸素応答関連マイクロRNAのmiR-210が関わること(Biochem Biophys Res Commun. 2013)、Lin28やNestin、ABCG2といった癌幹細胞関連分子の発現が誘導されること(Biochem Biophys Res Commun. 2012)を報告してきた。これらの研究は主に癌細胞と膵星細胞間の相互作用を解析したものであり、免疫系への詳細な評価は未検討である。準備段階の解析ではヒト慢性膵炎組織から樹立した膵星細胞と膵癌由来の膵星細胞では遺伝子発現プロファイルが異なっていることを確認している。膵癌組織中の星細胞は癌細胞同様長期間にわたる発癌刺激を受けているため、機能変化には未知の遺伝子変異が関与している可能性が考えられるが、詳細な検討は行われていない。

以上の知見に基づき、膵癌微小環境中で抗腫瘍免疫を阻害する新たな因子の同定のために膵癌細胞・膵星細胞の遺伝子発現プロファイルを含めた網羅的解析を実施し、その機構を特異的に阻害することで腫瘍免疫賦活を主作用とする治療への感受性回復を実現するための研究計画を着想するに至った。

2. 研究の目的

本検討では膵癌細胞・膵星細胞における発現遺伝子の網羅的な解析によって、免疫抑制機能に関わるメカニズムの本態を明らかにし、抗腫瘍免疫抑制機能賦活による新たな治療法のための基盤開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト膵癌の進展に寄与することが明らかとなっている膵星細胞においてインテグリンシグナルの調節分子のノックダウンを行い、癌進展促進機能に与える影響を評価した。また、酸化ストレス応答の制御分子であるNrf2欠損バックグラウンドを膵癌モデルマウスへ導入し、膵癌細胞・膵星細胞株を樹立し、機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) インテグリンシグナル調節因子ノックダウンによる膵星細胞機能の変化

膵癌間質と免疫細胞・癌細胞間の相互作用に関わる分子を同定するため、ヒト膵癌組織について検討を進めた。これまでの検討でインテグリンシグナルの調節因子であるKindlin-2が膵星細胞による癌進展促進に寄与していることを報告している。この知見に基づき、他のインテグリンシグナル関連分子について免疫染色を実施し、smooth muscle actin陽性を示す活性化膵星細胞で発現する分子を同定した。同分子に対するshRNAを導入した細胞株を樹立し、活性化膵星細胞のマーカー発現を検討したところsmooth muscle actinの発現低下がみられた。この細胞株では膵癌細胞との共移植実験でみられる腫瘍形成能の増強効果が減弱しており、癌進展に寄与していることが示唆された。

(2) Nrf2欠損膵癌モデルマウスでの解析

マウス膵癌モデルでは、酸化ストレス応答の中核分子であるNrf2欠損により膵癌が抑制されることを見出した。このマウスでは膵に形成される前癌病変周囲への炎症細胞浸潤が減弱していた。癌細胞側の因子で炎症の惹起に関与する分子の発現変動を検討したところ、核内に発現

するアラミンの一種が減少していることが確認された。マウス膀胱癌細胞に酸化ストレスを誘導するとこの分子の mRNA 発現が増加することが判明し、新たな Nrf2 標的遺伝子と考えられた。

(3) 野生型および Nrf2 欠損膀胱癌細胞株・膀胱癌細胞株の樹立と機能解析

KPC マウス由来膀胱癌細胞株のヌードマウス皮下単独移植・野生型マウス膀胱癌細胞株との混合移植・Nrf2 欠損膀胱癌細胞株との混合移植実験を行い、腫瘍形成能の変化を確認した。その結果、野生型膀胱癌細胞株との混合移植は皮下腫瘍の増殖を促進したが Nrf2 欠損膀胱癌細胞株ではその効果は失われていた。野生型膀胱癌細胞株・Nrf2 欠損膀胱癌細胞株での遺伝子発現プロファイルの比較では Nrf2 欠損により多くの Nrf2 標的遺伝子 (Gst ファミリー遺伝子や Nqo1 遺伝子など) の発現低下がみられるとともに、炎症性サイトカインや細胞接着因子といった局所での炎症の惹起・炎症細胞の遊走に関わる分子群の発現低下を確認した。以上の結果は膀胱癌細胞における酸化ストレス応答機構が膀胱癌局所での炎症の持続に寄与していることを示すものであり、これまで知られていた Nrf2 による炎症抑制作用とは異なる新たな知見と考えられた。

(4) 膀胱癌細胞による癌細胞機能の変化の検討

野生型マウス由来膀胱癌細胞の培養上清は膀胱癌細胞の細胞増殖を促進し、酸化ストレスによる細胞死を抑制した。Nrf2 欠損膀胱癌細胞由来の培養上清ではこの効果が失われており、膀胱癌細胞による癌進展促進効果は膀胱癌細胞側の酸化ストレス応答に依存している可能性が示された。初代培養膀胱癌細胞を用いた実験でも結果は同様であった。野生型膀胱癌細胞培養上清刺激により、膀胱癌細胞内では細胞増殖に関わるシグナル伝達経路の活性化がみられた。増殖以外に腫瘍形成能の増強に関わる因子を明らかにするため、上皮間葉形質転換に関わる転写因子発現レベルや癌幹細胞マーカー分子の発現変動をリアルタイム PCR にて評価したところ、有意差には至らなかったものの癌幹細胞で発現増加が報告されているトランスポーターが増加していた。以上の結果は膀胱癌細胞の増殖・癌幹細胞機能関連分子の発現が膀胱癌細胞との相互作用により維持される可能性を示唆するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masamune A, Kotani H, Sorgel FL, et al.	4. 巻 158
2. 論文標題 Variants That Affect Function of Calcium Channel TRPV6 Are Associated With Early-Onset Chronic Pancreatitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterology.	6. 最初と最後の頁 1626-1641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2020.01.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Lasher D, Szabo A, Masamune A et al.	4. 巻 114
2. 論文標題 Protease-Sensitive Pancreatic Lipase Variants Are Associated With Early Onset Chronic Pancreatitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 974-983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14309/ajg.0000000000000051.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Masamune A, Hamada S, Yoshida N, Nabeshima T, Shimosegawa T.	4. 巻 63
2. 論文標題 Pyruvate Kinase Isozyme M2 Plays a Critical Role in the Interactions Between Pancreatic Stellate Cells and Cancer Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dig Dis Sci.	6. 最初と最後の頁 1868-1877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-018-5051-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masamune A, Yoshida N, Hamada S, Takikawa T, Nabeshima T, Shimosegawa T.	4. 巻 495
2. 論文標題 Exosomes derived from pancreatic cancer cells induce activation and profibrogenic activities in pancreatic stellate cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 71-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.10.141.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada S, Taguchi K, Masamune A, Yamamoto M, Shimosegawa T.	4. 巻 38
2. 論文標題 Nrf2 promotes mutant K-ras/p53-driven pancreatic carcinogenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Carcinogenesis.	6. 最初と最後の頁 661-670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgx043.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hamada S, Masamune A, Shimosegawa T.
2. 発表標題 Halofuginone, a novel Nrf2 inhibitor, shows synergistic effect with gemcitabine in pancreatic cancer.
3. 学会等名 DDW2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hamada S, Masamune A, Taguchi K, Yamamoto M, Shimosegawa T.
2. 発表標題 Simultaneous activation of K-ras and NRF2 induce pancreatic atrophy.
3. 学会等名 DDW2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	濱田 晋 (Hamada Shin) (20451560)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	正宗 淳 (Masamune Atsushi) (90312579)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	