

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09112

研究課題名(和文) 間質抑制による癌軟化作用を介した膵癌治療の開発

研究課題名(英文) Development of Pancreatic Cancer Therapy via Cancer Softening Action by Stromal Inhibition

研究代表者

工藤 大輔(Daisuke, Kudo)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00587024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵星細胞の培地にMU投与をすると、活性化が抑制されることが明らかになった。膵星細胞とBxPC3をBALBc-nu/nuマウスに皮下移植を行った。4週間の観察を行ったところ、腫瘍体積がコントロール群に比してMU群で有意に小さくなった。HE染色およびEVG染色では、MU群では間質のコラーゲン様成分が減少していることが明らかになった。マイクロアレイ解析では、MU群では癌関連線維芽細胞のマーカー遺伝子が有意に減少していることが明らかとなった。Gene Ontology解析では、MU群で細胞外マトリックス、低酸素への反応、優位に減少していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌間質をターゲットとした治療法は膵癌の新規治療の開発になり得る。MUは膵星細胞の活性化、癌関連線維芽細胞への変化を抑制することが明らかとなった。MUを投与したマウスでは、細胞外マトリックスおよび低酸素の反応が減弱することにより腫瘍径が小さくなることが示唆された。膵癌細胞へのMUの効果に関しては報告があるが、膵星細胞へのMUの効果はこれまで報告されておらず、膵癌治療の新しい切り口になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Normally, isolated PSCs change from a round to spindle-shaped morphology to a star-shaped activated morphology after a few days in culture. However, when 0.5 mM MU was administered to the medium of PSCs isolated from 8-week-old B6 mice, the growth rate decreased and more cells retained their round morphology. Next, the isolated PSCs and BxPC3, a human pancreatic cancer cell line, were subcutaneously transplanted into BALBc-nu/nu mice. After 4 weeks of observation, tumor volume was significantly smaller in the MU group compared to the control group. HE and EVG staining of the excised tumors revealed a decrease in collagen-like components in the stroma in the MU group. Microarray analysis of RNA extracted from tumors revealed that marker genes of cancer associated fibroblasts were significantly decreased in the MU group. Gene Ontology analysis revealed enrichments of extracellular matrix and response to oxygen levels were significantly decreased in the MU group.

研究分野：膵癌

キーワード：膵星細胞 浸潤性膵管癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌の難治性

膵癌は難治の癌であり、遺伝子変異は主に4種の変異に集約される。最も頻度が高い変異は、Kras 変異であり、90%の症例に変異が見られる。続いて、TP53, CDKN2A, SMAD4 が約半数の症例に変異が見られる[1-5]。また、遺伝子変異のみならず後天的遺伝子修飾により予後が悪化することも知られている[6]。しかし、遺伝子変異もしくは後天的遺伝子修飾をターゲットとした治療ははまだ画期的な治療を生み出していない。膵癌治療に関しては、膵癌間質における癌微小環境が重要な役割を果たすことが知られている[7]。膵癌間質において、膵星細胞が中心的役割を果たし、細胞外マトリックスを変化させる[8]。細胞外マトリックスのうち、ヒアルロン酸と膵癌の関係性が注目し研究を進めてきた。ヒアルロン酸は、グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンが結合した高分子化合物であり、細胞における様々な機能と関連性がある[9]。ヒアルロン酸は種々の癌の間質に豊富に存在し、癌細胞の接着、遊走、増殖、浸潤、および血管新生に関与している。代表的な薬剤治療としては、ヒアルロン酸を分解する酵素製剤である PEGPH20 (pegylated recombinant human hyaluronidase) の併用により、ゲムシタピンなど他の抗癌剤の効果が高まることが報告された[10-11]。しかし、ヒトを対象とした臨床試験において PEGPH20 は予後を改善しなかった[12]。ヒアルロン酸が膵癌においてどのように癌進展メカニズムに関わるかは不明な点が多い。我々は、膵癌間質において重要な役割を果たす膵星細胞に注目し、膵星細胞への 4-methylumbelliferone (MU) の作用の観点から膵癌間質の制御を試みた。

2. 研究の目的

MU がヒアルロン酸合成を特異的に抑制することを見出し、その作用が培養ヒト膵癌細胞に抗腫瘍効果を及ぼすことを明らかにして来た。実際のヒト膵癌組織では、膵癌細胞を取り囲む大量の間質が観察され、その中には多数の線維芽細胞とヒアルロン酸が存在し、抗癌剤や免疫担当細胞の拡散を妨げることによって治療抵抗性を獲得していると予想される。従って、MU によって線維芽細胞のヒアルロン酸合成が抑制されれば癌組織内圧が低下し、抗癌剤や免疫担当細胞の組織移行性が高まり、結果としてより良い治療効果が得られるという仮説が着想される。これまでの一連の研究を発展させて、膵癌組織内圧を MU によって制御し、膵癌間質を標的とした新規膵癌治療方法の開発の可能性を探ることを目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

試薬

4-methylumbelliferone (SIGMA) を dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し使用した。

細胞培養

8週齢の C57BL/6 マウス(メス)より膵星細胞を既存の報告に従い重層単離法により単離した[8]。細胞は、非動化した仔牛血清(SIGMA)を10%、抗生剤(ペニシリン/ストレプトマイシン)を1%含む、DMEM/F-12 培地を使用し、37℃、5%CO₂の環境で培養した。継代は施行しなかった。

トランスフェクション

Retro Nectin コートプレートに Firefly Luciferase 遺伝子を持ったレンチウイルス液 (GeneCopoeia, #LPP-hLUC-Lv206-025-C) を投与した。さらに、BxPC3 (ATCC) を同ディッシュに投与し静置した。ピューロマイシンで Firefly Luciferase 遺伝子が導入された BxPC3 を選択的に生存させ BxPC3-luc 細胞株を樹立した。

皮下移植モデル

11週齢の BALB/c-nu/nu(メス)(日本クレア)の右わき腹に単離した膵星細胞(1.0×10^5)と BxPC3-luc (1.0×10^5) を共にマトリゲル (CORNING) 20ul に混ぜて皮下移植を行った。

4. 研究成果

MU は膵星細胞の活性化を抑制する

膵星細胞は正常の膵臓にも存在し、線維化の中心的役割を果たす。単離した膵星細胞はディッシュ上で培養が可能であり、増殖能も存在するため回収することも可能である。一方で、膵星細胞は活性化することが知られており、種々の刺激により星状の活性化星細胞に変化する。通常、単離した星細胞は培養の日数が立つと、円形～紡錘形の形態から星状の活性化した形態に変化する。今回、8週齢の B6 マウスより単離した膵星細胞を使用した。コントロール群として培地に DMSO 単独を投与した細胞と培地に DMSO に溶解した 0.5mM の MU 投与した細胞を観察した。一週間後に、細胞免疫染色を施行したところ、MU 投与群では増殖速度が減少し、円形の形態を保つ細胞が多くなることが明らかになった。

皮下移植モデルにおいて MU は腫瘍の増大を抑制する

次に、単離した星細胞 (1.0×10^5) とヒト膵癌細胞株である BxPC3 (1.0×10^5) を共にマトリゲルに溶解し、11週齢の BALB/c-nu/nu マウスに皮下移植を行った。コントロール群は通常の粉餌を

与え、MU 群は体重当たり 2mg/g/day 摂取するよう粉餌に MU を加え与えた。腫瘍を皮下移植後から一週間ごとに、腹腔内にルシフェラーゼを投与し In vivo imaging を施行したが、すべての個体において遠隔転移は見られなかった。4 週間の観察を行ったところ、腫瘍体積がコントロール群に比して MU 群で有意に小さくなった (15.7cm^3 vs 127.3cm^3 , $P=0.029$) (図 1-2)。4 週間の観察後、腫瘍を摘出した。すべての個体において肝・肺転移は見られなかった。

MU は細胞外マトリックスおよび低酸素への反応を抑制する可能性がある

4 週間後の観察後に提出した腫瘍の一部でパラフィン切片を作成し、一部から RNA を抽出した。HE 染色および EVG 染色では、MU 群では間質のコラーゲン様成分が減少していることが明らかになった (図 3)。抽出した RNA を GeneChip によるマイクロアレイ解析を施行した。MU 群では癌関連線維芽細胞のマーカーとして知られる *Ctgf*, *Acta2*, *Mmp3*, *Timp3*, *Cnn1*, *Il6*, *Tgfb* が有意に減少していることが明らかとなった (図 4)。Gene Ontology 解析では、MU 群で細胞外マトリックス、低酸素への反応、優位に減少していることが明らかとなった (図 5)。以上より、MU は腭星細胞の活性化、癌関連線維芽細胞への変化を抑制することが明らかとなった。MU を投与したマウスでは、細胞外マトリックスおよび低酸素への反応が減弱することにより腫瘍径が小さくなること示唆された。腭星細胞への MU の効果はこれまで報告されておらず、腭癌治療の新しい切り口になる可能性がある。

参考文献

1. Carnevale, J. and A. Ashworth, Assessing the Significance of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol*, 2015. 33(28): 3080-1.
2. Maurice, D., et al., Loss of Smad4 function in pancreatic tumors: C-terminal truncation leads to decreased stability. *J Biol Chem*, 2001. 276(46): 43175-81.
3. Collins, M.A., et al., Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of clinical investigation*, 2012. 122(2): 639-653.
4. Ying, H., et al., Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 2012. 149(3): 656-70.
5. Redston, M.S., et al., p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res*, 1994. 54(11): 3025-33.
6. Hong SM., et al. Molecular signatures of pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 716-727.
7. Torphy, R.J., et al., Stromal Content Is Correlated With Tissue Site, Contrast Retention, and Survival in Pancreatic Adenocarcinoma. *JCO Precis Oncol*, 2018. 2018.
8. Apte, M.V., et al., Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*, 1998. 43(1): 128-33.
9. Toole BP. Hyaluronan : from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 528-39.
10. Jacobetz MA., et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 2012; 62: 112-20.
11. Provenzano PP., et al. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012; 21:418-29.
12. Ramanathan RK., et al. Phase IB/II Randomized Study of FOLFIRINOX Plus Pegylated Recombinant Human Hyaluronidase Versus FOLFIRINOX Alone in Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: SWOG S1313. *J Clin Oncol*. 2019 May 1;37(13):1062-1069.

図 1

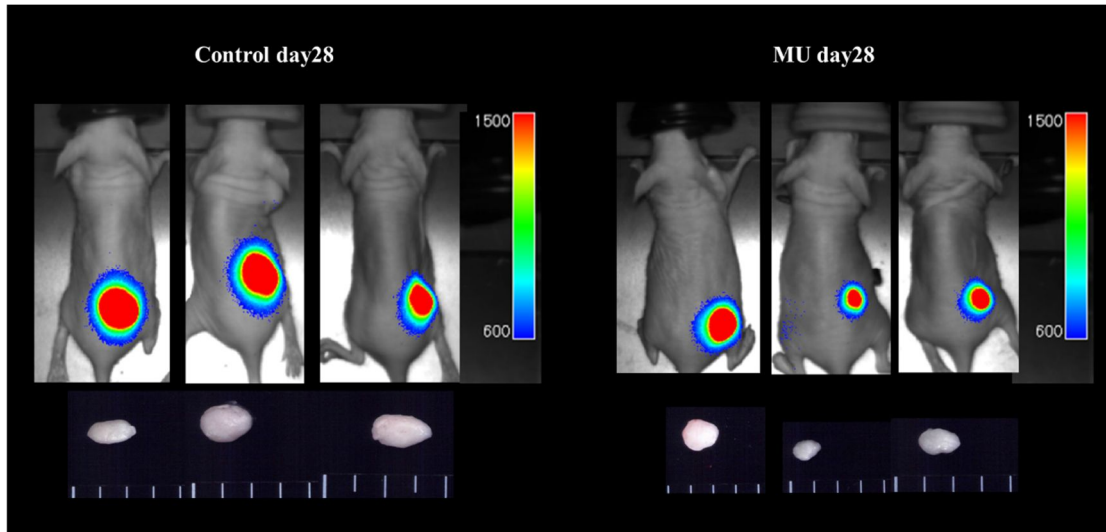


図 2

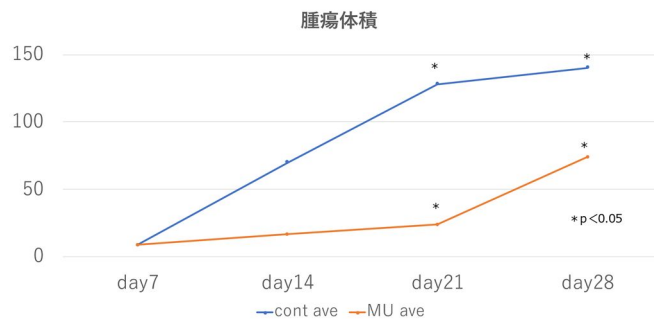
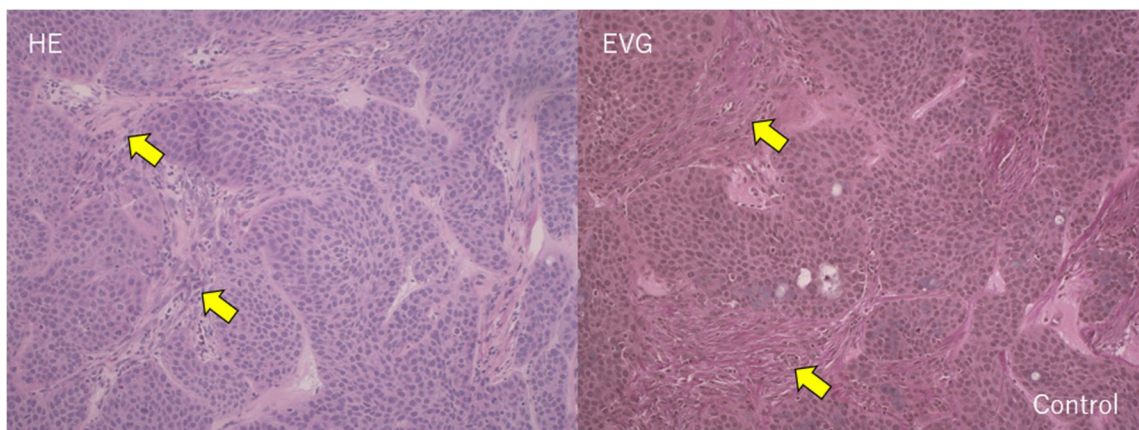


図 3



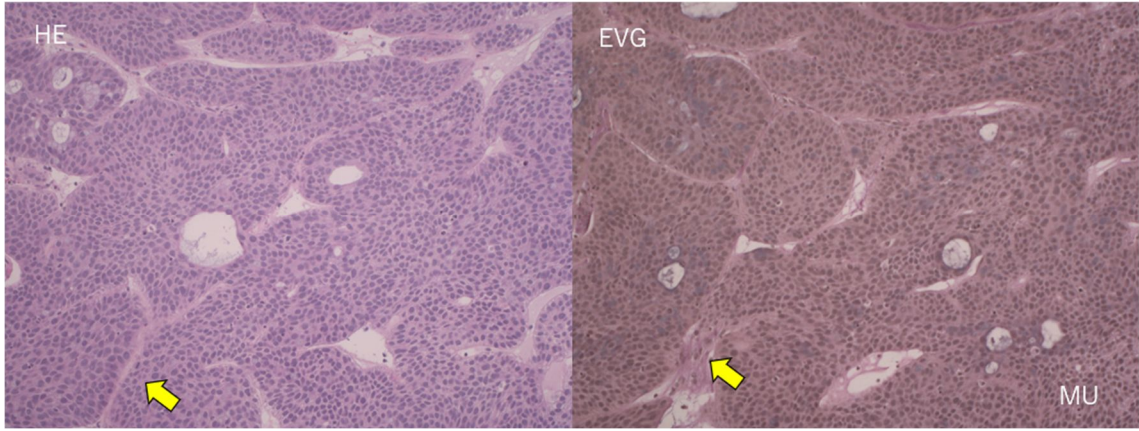


图 4

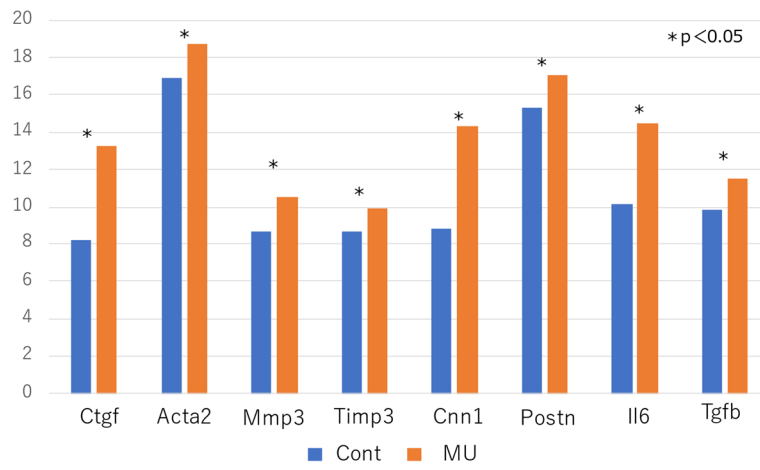
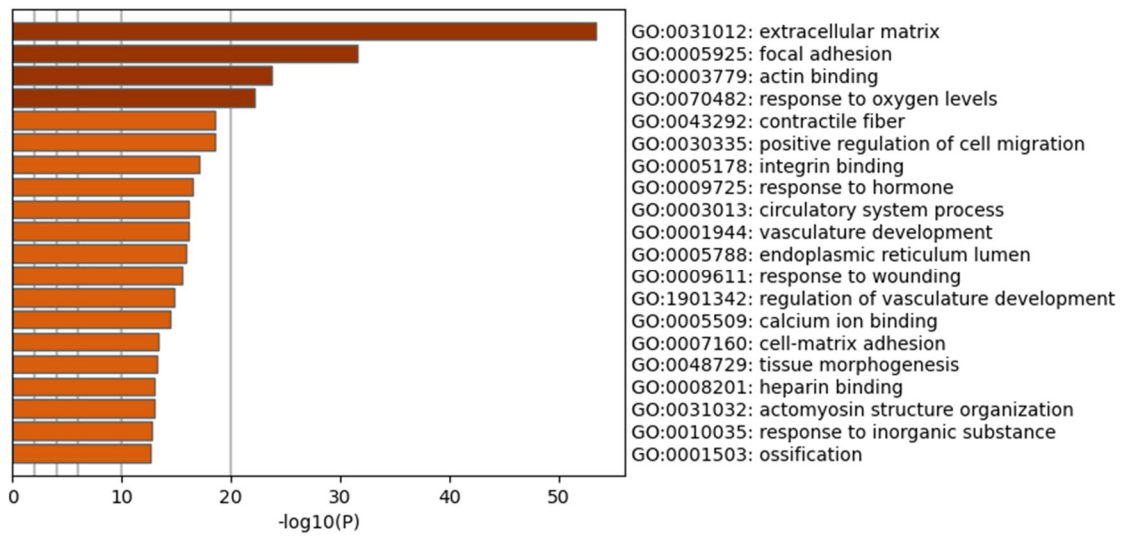


图 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	石戸 圭之輔 (Keinosuke Ishido) (00436023)	弘前大学・医学研究科・准教授 (11101)	
研究分担者	長瀬 勇人 (Hayato Nagase) (10750862)	弘前大学・医学部附属病院・助教 (11101)	
研究分担者	吉田 枝里 (Eri Yoshida) (20648886)	弘前大学・医学部附属病院・助教 (11101)	
研究分担者	袴田 健一 (Kenichi Hakamada) (30271802)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	
研究分担者	木村 憲央 (Norihisa Kimura) (60436029)	弘前大学・医学研究科・講師 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------