

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06165・19K21274

研究課題名（和文）新たな細胞死necroptosisによる治療抵抗性膵癌微小環境改変と治療への応用

研究課題名（英文）Modification of the microenvironment of treatment-resistant pancreatic cancer and its application to treatment by necroptosis

研究代表者

小菌 真吾（KOZONO, Shingo）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：40706850

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はapoptosis耐性の膵癌に対してnecroptosisを誘導することで治療抵抗性を克服する新規治療法を開発することを目的とした。necroptosisを誘導した膵癌細胞由来上清は膵癌細胞の遊走・浸潤能を促進すること、その上清内にはCXCL5が特異的に上昇していること、necroptosis誘導膵癌細胞ではCXCL5受容体CXCR2が高発現していること、その遮断がnecroptosisによって強化された遊走・浸潤能を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の治療を困難としている要因に薬剤耐性が挙げられ、従来の抗癌剤によるapoptosisに耐性をもつことは治療における大きな障壁となっている。近年発見されたプログラム細胞死の一つであるnecroptosisはapoptosisのfail-safe機構としての役割もあり、necroptosisの誘導はapoptosis耐性となった膵癌に対する有効な治療手段と考えられるが、necroptosisには癌細胞遊走・浸潤能を促進する側面も存在していることが明らかにされた。本研究により、今後は、CXCL5-CXCR2軸を遮断しながらnecroptosisを誘導する具体的治療方法の検討につながるものである。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a novel therapeutic method that overcomes the therapeutic resistance by inducing necroptosis in apoptosis resistant pancreatic cancer.

We revealed that the necroptosis-induced pancreatic cancer cell derived supernatant promotes the migration/invasion ability of pancreatic cancer cells, CXCL5 is specifically elevated in the supernatant, CXCR2(CXCL5 receptor) is highly expressed in necroptosis induced pancreatic cancer cells, and the CXCL5-CXCR2 blockade suppresses the migration/invasion ability.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 apoptosis耐性 necroptosis CXCL5 CXCR2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は5年生存率6%と非常に予後不良な癌であり手術が唯一の根治的治療法であるが、発見時には進行癌となっていることが多く、手術可能例は約20%程度しかない。そのため、化学療法が予後改善において重要な役割を占めているが、有効な薬剤が少ない上に、早期の薬剤抵抗性獲得がより治療を困難としている。多くの抗癌剤は腫瘍細胞に対して apoptosis を誘導することで治療効果を期待しており、癌細胞の apoptosis 耐性は治療において大きな障壁となっている。

従来、非プログラム細胞死と考えられていた necrosis の中に、様々な分子によって制御されたプログラム細胞死が存在することが明らかになり、necroptosis として注目を集めている。Necroptosis では細胞死の初期段階で細胞膜の破裂が起こるため、細胞傷害関連分子パターン(DAMPs)と称される様々な内因性分子の放出を伴い、炎症反応の惹起など、癌微小環境に強く影響を与える。Necroptosis は、apoptosis の fail-safe 機構としての側面もあり、実際にデスレセプターを介した細胞死誘導では、カスパーゼ8の酵素活性は apoptosis を誘導し necroptosis を抑制するが、カスパーゼ8が不活化すると apoptosis に代わって necroptosis が誘導される。Necroptosis を来した死細胞から放出される DAMPs は、樹状細胞の抗腫瘍免疫を活性化し、癌の進行を抑制している(Cancer Immunol Res 2015; 3: 902-914.)ことや、RIPK3はナチュラルキラーT細胞による抗腫瘍免疫応答を引き起こしている(Nat Commun. 2015 Sep 18;6:8371.)こと、RIPK1/3は活性酸素(ROS)の産生を促進(Oncogene. 2015 Nov 19;34(47):5796-806.)し、過剰な ROS は酸化ストレスによって転移細胞に細胞死を誘導する(Cell Mol Life Sci. 2016 Jun;73(11-12):2183-93)ことなどが報告されている。

## 2. 研究の目的

Apoptosis 耐性の癌細胞に necroptosis を誘導することで、治療抵抗性を克服する新たな治療法を検討、開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. 免疫組織化学染色的評価

ヒト膵癌切除標本を用いて necroptosis 関連分子の免疫組織化学染色を行い、necroptosis の頻度や関連分子の局在について解析を行った。

### 2. apoptosis 耐性膵癌細胞に対する necroptosis の誘導

ヒト膵癌切除組織から primary culture で樹立した膵癌細胞や膵癌細胞株に TNF- $\alpha$  や TRAIL, cIAP のアンタゴニストである second mitochondria-derived activator of caspase(SMAC) mimetic を用いて apoptosis を誘導し、それらの薬剤に不応性であった apoptosis 耐性細胞に対して caspase 阻害薬(zVAD-FMK)である TSZ を添加して necroptosis の誘導を試みた。

### 3. necroptosis が膵癌細胞の遊走・浸潤能に及ぼす影響

TSZ を用いて necroptosis を誘導した癌細胞上清を膵癌細胞に添加し、創傷治癒およびトランスウェル遊走アッセイを行った。加えて、apoptosis を誘導した癌細胞上清でも同様の実験を行った。

### 4. necroptosis 誘導膵癌細胞上清内サイトカインの解析

necroptosis 誘導膵癌細胞由来メディエーターを調査すべく、上清のタンパク質アレイ分析を行って特異的に upregulate しているタンパクを同定し、その膵癌細胞における受容体発現を、qRT-PCR を用いて評価した。

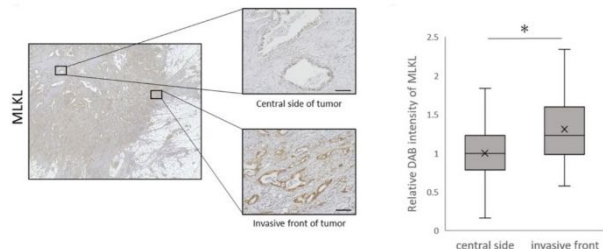
### 5. CXCL5-CXCR2 軸が膵癌細胞の遊走・浸潤能に及ぼす影響

方法4で特定された CXCL5、CXCR2 それぞれが膵癌細胞の遊走・浸潤能にどのような影響を及ぼすかを、拮抗薬や siRNA、組み換えヒト抗体などを用いて検討した。

## 4. 研究成果

### 1. 免疫組織化学染色的評価

ヒト膵癌切除標本を用いた免疫組織化学染色の解析において、necroptosis の実行に必要な RIP3 および MLKL は、正常膵と比較して、膵癌組織で高発現しており、MLKL の発現は、腫瘍中心部よりも浸潤先端部で有意に強いことを確認した。



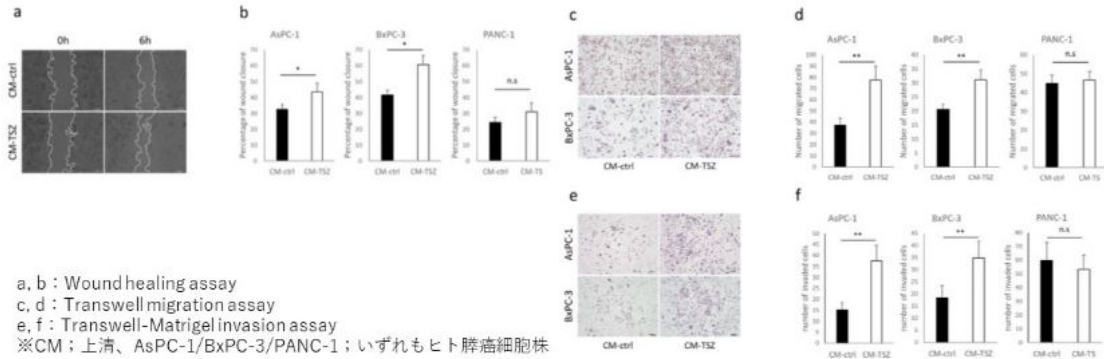
膵癌組織内におけるMLKLの発現の免疫組織化学染色的評価

### 2. apoptosis 耐性膵癌細胞に対する necroptosis の誘導

RIP3 発現と MLKL 低発現を同時に有する膵癌細胞は TNF- $\alpha$  と SMAC 投与による apoptosis を誘導できるが、RIP3 発現と MLKL 高発現を同時に有する膵癌細胞は apoptosis 抵抗性であり、TSZ の投与によって necroptosis を引き起こすことが可能であった。

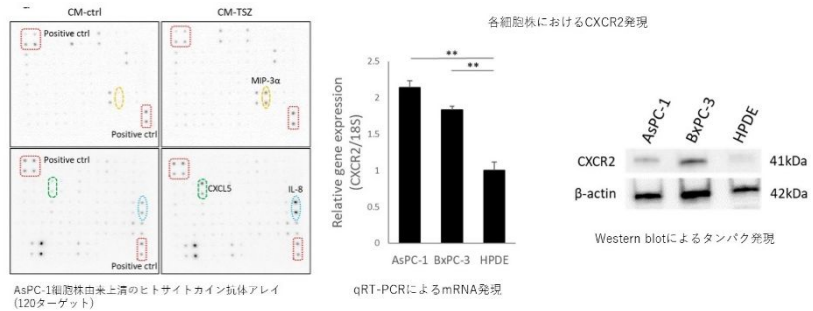
### 3. necroptosis が膵癌細胞の遊走・浸潤能に及ぼす影響

2. で得られた necroptosis 誘導の手法を用いて膵癌細胞に necroptosis を誘導し、その上清をもちいては膵癌細胞の遊走・浸潤能を評価したところ、necroptosis 誘導膵癌細胞由来上清は膵癌細胞の遊走・浸潤能を促進することを示した。



### 4. necroptosis 誘導膵癌細胞上清内サイトカインの解析

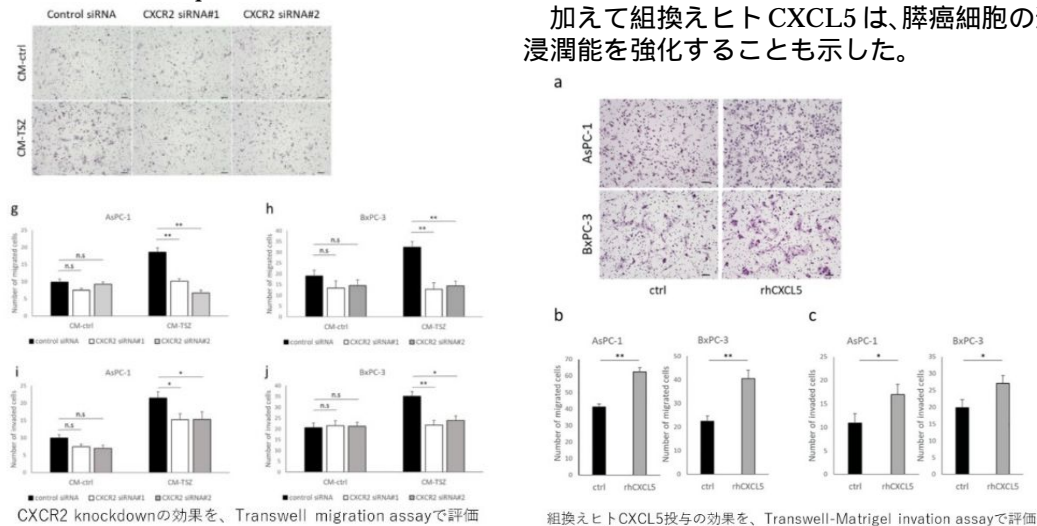
necroptosis を起こした膵癌細胞の上清内においては CXCL5 が特異的に upregulate しており、CXCL5 の受容体である CXCR2 は、非癌性ヒト膵管上皮細胞と比較して膵癌細胞で有意に過剰発現していた。



### 5. CXCL5-CXCR2 軸が膵癌細胞の遊走・浸潤能に及ぼす影響

選択的 CXCR2 阻害薬 SB225002 の投与や siRNA を用いた膵癌細胞の CXCR2 knockdown はそれぞれ、necroptosis によって強化された癌細胞の遊走・浸潤能を抑制した。

加えて組換えヒト CXCL5 は、膵癌細胞の遊走・浸潤能を強化することも示した。



以上から、膵臓癌浸潤先端部の necroptosis が CXCL5 を放出し、CXCR2 を介して癌細胞の遊走・浸潤を促進すると考えられた。

Necroptosis 誘導は、apoptosis 耐性となった膵癌に対する有効な治療手段と考えられるが、本研究では necroptosis には癌細胞遊走・浸潤能を促進する側面も存在していることが明らかにされた。今後は CXCL5-CXCR2 軸を遮断しながら necroptosis を誘導する具体的な治療方法を検討していく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yohei Ando, Kenoki Ohuchida, Yoshiki Otsubo, Shin Kibe, Shin Takesue, Toshiya Abe, Chika Iwamoto, Koji Shindo, Taiki Moriyama, Kohei Nakata, Yoshihiro Miyasaka, Takao Ohtsuka, Yoshinao Oda, Masafumi Nakamura	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis in Pancreatic Cancer Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Release of CXCL5	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0228015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1371/journal.pone.0228015	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ando K, Ohuchida K, Otsubo Y, Sagara A, Kibe S, Takesue S, Nakayama M, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Ohtsuka T, Mizumoto K, ama M, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2. 発表標題 Neeroptosis in Pancreatic Cancer Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Release of CXCL5
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤陽平、大内田研宙、岐部晋、武居晋、中山宏道、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 膵癌細胞への異なった細胞死誘導による遊走・浸潤能への影響の比較
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤陽平、大内田研宙、相良亜希子、米永晃子、岐部晋、武居晋、中山宏道、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 膵癌細胞のnecroptosisによって放出されるCXCL5は膵癌細胞の遊走・浸潤を促進する
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----