

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03754

研究課題名(和文) PDX-3D法を用いた創薬ライブラリ構築と新規膵癌治療薬探索

研究課題名(英文) Construction of drug discovery library using PDX-3D method and discovery of novel therapeutic agents for pancreatic cancer

研究代表者

水元 一博 (MIZUMOTO, Kazuhiro)

国際医療福祉大学・赤坂心理・医療福祉マネジメント学部・教授

研究者番号：90253418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌における新たな間質標的治療薬の開発を目指して、膵星細胞の脂肪滴を用いた独自の薬剤スクリーニングを開発し、複数のHit化合物から候補薬を同定した。同定した候補薬は癌間質相互作用を抑制するのみならず、免疫チェックポイント阻害剤と併用することで著明な腫瘍縮小効果を示し、腫瘍免疫を増強させる効果を発揮することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌において間質標的治療の有望性を示唆する報告は多数あるが、実臨床に向けての治療法はまだ確立されていない。我々はすでに臨床で使用されている既承認薬を用いた薬剤スクリーニング系を開発した。そこで得られた化合物は癌間質相互作用を抑えるのみならず、腫瘍免疫を増強させる効果があることも示唆された。本研究はすでに実臨床で使用されている薬剤を用いたスクリーニングであり、速やかな臨床応用が可能である点で社会的意義は大きい。また、間質標的治療が抗腫瘍免疫をも増強させるということも明らかにし、今後そのメカニズムを詳細に解析することで、腫瘍免疫増強の新たな機序が判明する可能性があり学術的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We developed the original drug screening using fat-droplet staining in pancreatic stellate cells to develop new stromal-targeted therapeutics in pancreatic cancer. The identified candidate drugs inhibited cancer-stromal interactions and showed marked tumor shrinkage when combined with immune checkpoint inhibitors, suggesting that they could enhance tumor immunity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：薬剤スクリーニング 癌間質相互作用 PSC 膵星細胞 間質標的治療 CAF 腫瘍免疫 膵癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌を代表とする難治性固形腫瘍は、早期から浸潤、転移を生じ、発見時に既に治癒切除が困難であることが多い。特に膵癌の5年生存率はここ30年間でほとんど改善が無く、治療法の開発は社会的緊急性・重要度が高い。膵癌細胞周囲には膵星細胞(Pancreatic Stellate Cell; PSC)と呼ばれる間質細胞が豊富に存在しており、癌間質相互作用により癌細胞の浸潤、転移を促進、さらには細胞外基質を産生することにより乏血管組織を形成、薬剤送達性が低下し抗癌剤治療抵抗性を亢進している。我々は膵癌における間質標的治療として、抗線維化薬 pirfenidone による PSC 活性抑制や (Kozono et al. Cancer Research, 2013) 細胞内器質代謝機構であるオートファジーが PSC の活性化に関与することを同定、PSC のオートファジーを抑制することで膵癌の肝転移、腹膜播種を抑制することを報告した (Endo et al. Gastroenterology, 2017)。また最近では既存のオートファジー阻害剤であるクロロキンと ERK 阻害剤の併用で膵癌再発患者の肝転移が著明に抑制されることが示される (Kinsey et al. Nat Med. 2019) など、オートファジー阻害剤を用いた治療は臨床応用への段階に突入している。しかし、臨床効果発現にはクロロキンの必要量が多く副作用の懸念が残るため、治療応用にはより低濃度で高い効果をもつオートファジー阻害剤の開発が急務と考えられる。

2. 研究の目的

生体内により近い腫瘍微小環境を再現した 3D 培養モデルをベースにスクリーニングプラットフォームを開発し、PSC を制御することで既存の抗癌剤への治療抵抗性を打破することができる、膵癌における新規薬剤を開発することが本研究の目的である。

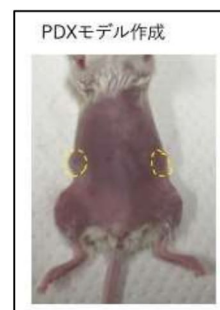
3. 研究の方法

- ヒト膵癌切除組織から PDX マウスを作成
- PDX マウスの腫瘍からオルガノイドを樹立
- PSC 細胞を用いたハイスループットスクリーニング
- スクリーニングでヒットした化合物の腫瘍微小環境への影響を検証

4. 研究成果

ヒト膵癌切除組織からの PDX マウスの作成

九州大学病院 臨床・腫瘍外科において切除された膵癌組織を、超免疫不全マウス (NSG マウス) の皮下に移植することで、患者腫瘍移植マウスモデル (PDX モデル) を作成した (右図)。これらの PDX モデルから樹立した膵癌組織をヒト検体と比較したところ、組織類似性が十分に保たれていることを確認した。



PDX マウスの腫瘍からのオルガノイド樹立

樹立した PDX マウス腫瘍から、スクリーニング用にオルガノイドの作成と PSC の樹立を試みた。しかし、PDX マウス腫瘍からの安定したオルガノイド樹立が困難であった、また、PSC の樹立も試みたが、マウス宿主由来の fibroblast も混在していることが疑われ、ハイスループットの薬剤スクリーニングに用いる PSC としては不適であると考えられた。そこで、当初の計画を変更し、ヒト膵癌切除標本から樹立した PSC を用いて薬剤スクリーニングを行うこととした。

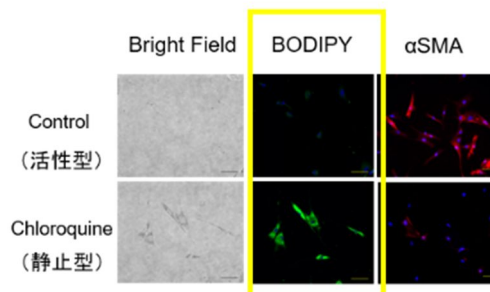
PSC 細胞を用いたハイスループット薬剤スクリーニング

当初の計画からは変更となったが、ヒト膵癌切除標本からは安定した PSC が樹立可能であり、同細胞株を用いて、PSC の休眠化を誘導する薬剤をハイスループット薬剤スクリーニングを用いて同定することとした。スクリーニング系としては、PSC が静止期になると細胞内に脂肪滴が蓄積することを利用し (右図)、既承認薬ライブラリ 3398 種類を用いて、BODIPY (脂肪滴の染色) の蛍光強度を指標にスクリーニングを行った (右下図)。

スクリーニングの結果、3398 種類の既承認薬から 32 種類の薬剤を同定することができた。

我々は、これらの薬剤の中には、同様の機能を持つ類似した薬剤が複数含まれていることに着目

静止状態のPSCの特徴:脂肪滴の蓄積

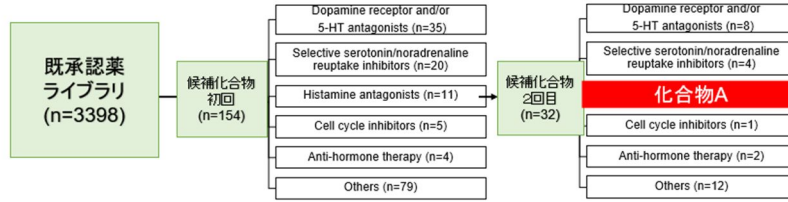
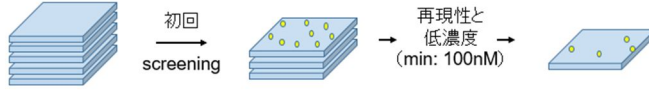


し、32 種類の Hit 化合物を、作用機序別に 6 つのグループに分類することができた。

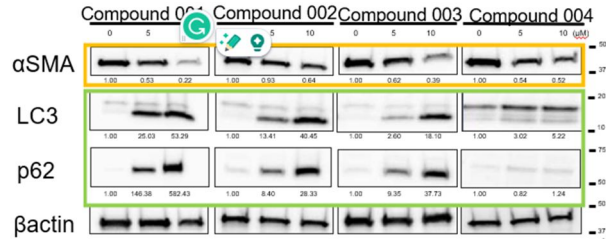
その中から、われわれは「化合物 A」を含む薬剤群に着目した(右図)。

スクリーニング

の妥当性を検証するため、これらの Hit 化合物が実際に PSC の静止化を誘導するか、in vitro で確認したところ、これらの化合物は SMA の発現を減少させ、さらには PSC のオートファジーをも抑制することが明らかとなり、有望な間質標的治療薬となりうる可能性があることが示唆された(右図)。

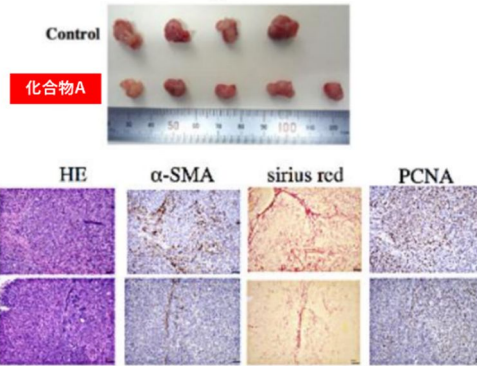


(候補化合物)

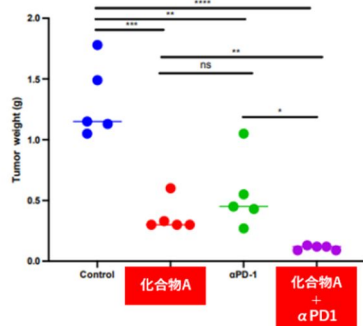
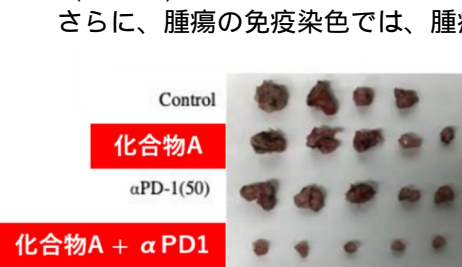


化合物 A の腫瘍微小環境への影響を検証

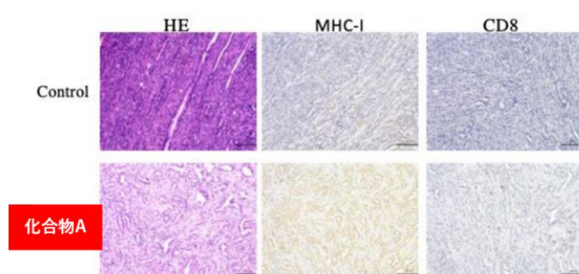
同定した化合物 A の腫瘍微小環境への影響を検証するため、マウス腭同所移植モデルを用いて in vivo の実験を行った。まず、Nude マウス(BALB/c-nu)にヒト膵癌細胞を同所移植して腫瘍の増殖と、腫瘍内の間質成分の解析を行ったところ、化合物 A の投与により腫瘍は縮小し、さらに免疫染色では SMA, Sirius red, PCNA の陽性率が低下しており、化合物 A の癌間質相互作用の抑制効果が示唆された(右図)。



さらに、近年、CAF を中心とした膵癌間質と、腫瘍免疫細胞の関連が明らかにされつつあるため、化合物 A が腫瘍免疫微小環境にどのような影響を及ぼすかを、KPC マウス(膵癌自然発癌マウス)由来膵癌細胞を B6 マウス(C57BL/6)に移植した腭同所移植モデルを用いて検証した。化合物 A を、免疫チェック阻害剤である anti-PD1 と併用したところ、Control 群、単剤投与群と比較して、併用群では著明な腫瘍縮小効果を認められた(左下図)。



さらに、腫瘍の免疫染色では、腫瘍内浸潤 CD8+細胞の数が有意に増加していることに加え、MHC-1 の発現が化合物 A の投与により有意に増加していることが明らかになった(右下図)。つまり、化合物 A は癌間質相互作用を抑制することに加え、間質を標的とすることで腫瘍内への CD8+細胞の浸潤を促進させることで、免疫チェックポイント阻害剤との併用効果をもたらすことが示唆された。さらに、化合物 A は癌細胞の MHC-1 の発現を上昇させる可能性が示唆され、これも免疫チェックポイント阻害剤の採用を増強させるメカニズムの一つであると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinkawa Tomohiko, Ohuchida Kenoki, Mochida Yuki, Sakihama Kukiko, Iwamoto Chika, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Mizuuchi Yusuke, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Subtypes in pancreatic ductal adenocarcinoma based on niche factor dependency show distinct drug treatment responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-022-02301-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sagara Akiko, Nakata Kohei, Matsumoto Sokichi, Guan Weiyu, Shinkawa Tomohiko, Iwamoto Chika, Ikenaga Naoki, Ohuchida Kenoki, Nakamura Masafumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Repositioning of duloxetine to target pancreatic stellate cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.13005	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kohei Nakata, Toshiya Abe, Noboru Ideno, Naoki Ikenaga, Yusuke Mizuuchi, Kenoki Ohuchida, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 Investigation of the mechanism of PSC activation and development of high-throughput drug screening detecting compounds targeting PSC
3. 学会等名 第53回日本膵臓学会大会・第26回国際膵臓学会（IAP・JPS2022）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、小山虹輝、林昌孝、松本泰吉、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 分化型膵癌は癌関連線維芽細胞由来の微小環境因子に依存して分化度を保持している
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 膵癌における癌関連線維芽細胞由来の微小環境因子が腫瘍分化度に与える影響についての検討
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsumoto S, Nakata K, Ikenaga N, Date S, Guan W, Sagara A, Ohuchida K, Ohtsuka T, Nakamura M
2. 発表標題 Efficient Targeted Therapy for Pancreatic Cancer Using Nanosystem and Focusing on the Suppression of Pancreatic Stellate Cell Activation
3. 学会等名 14th World Congress of International Hepeto-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2020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	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	仲田 興平 (NAKATA Kohei) (30419569)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	岩本 千佳 (IWAMOTO Chika) (10752842)	九州大学・医学研究院・特任助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	水内 祐介 (MIZUUCHI Yusuke) (20849088)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	藤田 逸人 (FUJITA Hayato) (40611281)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	中山 宏道 (NAKAYAMA Hiromichi) (80866773)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

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