

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08324

研究課題名（和文）膵癌間質の可塑性構築におけるエピゲノム制御と治療標的化

研究課題名（英文）Epigenetic regulation of pancreatic cancer stroma

研究代表者

佐藤 達也（Sato, Tatsuya）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60843753

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）：膵癌組織における癌随伴性線維芽細胞CAFに多様性と可塑性があることが明らかとなってきたが、その多様なプロファイルや相互の可塑性が癌の進展にどのように寄与するのかについては明らかになってはいない。この多様なCAFクラスターは相互に動的な移行性を持つと考えられ、細胞の可塑性に重要な役割を持つエピゲノム制御機構がその多様性制御にも関連し、同時に間接的に腫瘍自体の悪性度などにも寄与している可能性が想起される。本研究では、ヒト膵癌におけるCAFの機能的活性化のみならず、その多様性と相互の可塑性が腫瘍自体の悪性度に及ぼす影響について、エピゲノムによる遺伝子発現制御との関連とともに検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内の間質細胞や免疫細胞を含めた微小環境が癌細胞自体の増殖や悪性度に影響を及ぼし、例えばそれは薬剤による治療抵抗性などにも関連する。豊富な線維性間質によるDesmoplasiaをその病理学的特徴とする膵癌では、その腫瘍組織の大部分を占める活性化したCAFや免疫細胞などの間質系細胞と、産生される膠原線維や増殖因子が腫瘍促進的な微小環境を構成し、膵癌細胞自体の増殖や各種治療に対する抵抗性を誘導すると考えられてきた。本研究はその膵癌腫瘍組織の重要性におけるエピゲノム制御の関係を明らかにする学術的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Although it has become clear that cancer-associated fibroblast CAFs in pancreatic cancer tissue are diverse and plastic, it is not clear how their diverse profiles and mutual plasticity contribute to cancer progression. It is conceivable that these diverse CAF clusters are dynamically migratory to each other, and that epigenomic regulatory mechanisms that play an important role in cell plasticity may also be associated with the regulation of their diversity and indirectly contribute to the malignant potential of the tumors themselves. In this study, we investigated not only the functional activation of CAFs in human pancreatic cancer, but also the effects of their diversity and mutual plasticity on the malignant potential of the tumor itself, as well as their relationship with epigenomic regulation of gene expression.

研究分野：消化器病学

キーワード：膵癌

1. 研究開始当初の背景

癌の遺伝子変異は、周囲の間質細胞や免疫細胞を含めた腫瘍微小環境形成にも影響を及ぼすが、そのメカニズムや特性は癌種あるいは変異ごとに多彩であると考えられる。豊富な線維性間質によるDesmoplasiaをその病理学的特徴とする膵癌では、その腫瘍組織の大部分を占める活性化したCAFや免疫細胞などの間質系細胞と、産生される膠原線維や増殖因子が腫瘍促進的な微小環境を構成し、膵癌細胞自体の増殖や各種治療に対する抵抗性を誘導すると考えられてきた。近年の報告ではCAF自体にも様々な遺伝子発現の異なるサブタイプであるmyCAF、iCAF、apCAFなどが存在し、腫瘍内での異なる役割を果たしていることが明らかとなった (Cancer Discov 2019;9:1102)。同様の知見としてヒト肺癌組織においても間質細胞の単一細胞シーケンス解析により7種類のCAFクラスターが報告されている (Nature Med 2018;24:1277)。この多様なCAFクラスターは相互に動的な移行性を持つと考えられることから、細胞の可塑性に重要な役割を持つエピゲノム制御機構がその多様性制御にも関連し、同時に間接的に腫瘍自体の悪性度などにも寄与している可能性が想起される。しかしながらCAFの多様性と可塑性変化と遺伝子発現エピゲノム制御との関連、および腫瘍悪性度などとの関連について解析した報告は今のところない。また現時点でヒト膵癌組織における間質細胞プロファイルの多様性が、腫瘍の悪性度のみならず最終的な臨床経過にどう影響するかは必ずしも明らかではない。またその症例ごとの活性化CAFの多様性が生じる原因として、遺伝子変異や免疫細胞の多様性・不均一性、さらには疫学的な背景が関与しているのかどうかという点も十分検証されてはいない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト膵癌組織におけるCAFの多様性をまず実験的に可視化する。その上で様々なエピゲノム制御阻害薬を投与することで様々な分画のCAFの活性化、およびその腫瘍内での多様性の動的変化に及ぼす影響を解析する。さらには腫瘍自体の増殖や薬剤感受性との相関も合わせて解析することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト膵癌腫瘍組織における癌細胞と間質細胞を解析する実験系として約30ラインの患者由来膵癌ゼノグラフト(Patient-derived Direct Xenograft: PDX)モデルを樹立し、その過程でヒト膵癌CAFの培養系も樹立した。そのPDXは患者個々の原発巣で認められる豊富な間質構造を良く再現・維持していた。このPDXおよびCAFを用いて分子学的解析及び薬剤感受性などの生物学的解析を行う。前検討でBET阻害剤であるJQ1投与はSMA陽性CAFを減少させたが、CAF自体の生存率に影響を及ぼさなかった。そのことはCAFサブタイプの変化が誘導されている可能性を示唆すると考え、*in vitro* CAF培養系を用いてCAFの多様性の動的変化を検討する。また同時に膵癌治療薬であるGemcitabin, 5-FUなどの薬剤、さらにはBET阻害剤以外のエピゲノム阻害薬を投与することでそれぞれのマーカー発現が変化しうるかどうかを検討する。

またマウス膵癌モデルを用いて膵癌組織における免疫細胞プロファイルと悪性進展度、予後との相関につき検討する。

申請者の所属研究室では、マウス膵癌モデルを用いて膵癌組織における免疫細胞プロファイルと悪性進展度、予後との相関につき検討した経験を有する(下図例 Oncogenesis. 2019 Jan

18;8(2):8) によって同様の手法を膵癌患者の臨床組織検体コホートに応用し、免疫細胞の表面マーカー発現を免疫組織学的に症例ごとに検討する。免疫細胞のプロファイルに差異が認められた場合には、膵癌 Big4 遺伝子以外に免疫機序に影響を与えうる分子学的異常としての BRCA1, BRCA2, MSI, ARID 変異などについても解析を行う。また生存期間、治療感受性などの臨床学的因子についても同時に評価する。

4. 研究成果

樹立した CAF の表現型に影響を及ぼす化合物をスクリーニングした。エピゲノム制御阻害薬のひとつである BET 阻害薬 JQ1 は *In vitro* の検討で CAF 活性化マーカーの一つ SMA の発現を抑制し、COL1A1 などの基質マトリックス遺伝子の発現を抑制した。これらの知見は膵癌の CAF 活性化に遺伝子発現のエピゲノム制御が重要であることを示していた。一方で PDX モデルに JQ1 を投与したところ SMA 陽性 CAF を減少させたが、CAF 自体の生存率に影響を及ぼさなかった。そのことは CAF サブタイプの変化が誘導されている可能性を示唆すると考えられた。よって JQ1 が CAF の遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析するために RNAseq を行い、CAF サブタイプを規定する遺伝子群のみならず、影響される遺伝子の ontology 解析を行いつつ、JQ1 は Gemcitabine との併用で、その抗腫瘍活性を上昇させた。このことは CAF の遺伝子プロファイルが膵癌の治療効果に影響する可能性をも示唆していた。

膵癌患者の臨床組織検体を用いた免疫組織学的検討については、多施設共同による約 1000 例以上のコホートを集積した。この病理切片を用いて、細胞の表面マーカー発現の検討を進めている。具体的に染色している分子は各種 CD 抗原などの免疫細胞マーカー（例: CD3, CD4, CD8 および Foxp3, CTLA4, PD-1, CD45R など）、CAF の活性化マーカーであり、また MAPK などの細胞内シグナルの活性化もリン酸化抗体を用いて評価する。併せて膵癌の不活性型遺伝子変異のサロゲートとして P16 や SMAD4 の欠損、あるいは P53 異常蓄積についても引き続き検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Kato Hiroyuki, Tateishi Keisuke, Tatsuya Sato, et al.	4. 巻 162
2. 論文標題 MX1-HNF1B Axis Is Indispensable for Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm Lineages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1272 ~ 1287.e16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2021.12.254	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 Suzuki Yukari, Saito Kei, Nakai Yousuke, Oyama Hiroki, Kanai Sachiko, Suzuki Tatsunori, Sato Tatsuya, Hakuta Ryunosuke, Ishigaki Kazunaga, Saito Tomotaka, Hamada Tsuyoshi, Takahara Naminatsu, Tateishi Ryosuke, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Early skeletal muscle mass decline is a prognostic factor in patients receiving gemcitabine plus nab-paclitaxel for unresectable pancreatic cancer: a retrospective observational study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Supportive Care in Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00520-023-07659-w	査読の有無 無
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 Tsuyoshi, Oyama Hiroki, Nakai Yousuke, Sato Tatsuya, Tateishi Keisuke, Ushiku Tetsuo, Hasegawa Kiyoshi, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical Outcomes of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms With Dilatation of the Main Pancreatic Duct	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cgh.2023.01.032	査読の有無 無
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	立石 敬介 (Tateishi Keisuke) (20396948)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員 (12601)	

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