

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16419

研究課題名（和文）膵癌における抗体医薬耐性機序の解明 補体制御蛋白に着目してー

研究課題名（英文）Mechanisms of Antibody Drug Resistance in Pancreatic Cancer: Focus on Complement Regulatory Proteins.

研究代表者

鈴木 玲 (Suzuki, Rei)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80590546

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究助成により次の研究成果を得た。まず、膵癌細胞にC3ARが発現しリガンドであるC3a添加により細胞の増殖能や浸潤遊走能が亢進する事を明らかにした。次に膵癌細胞質C3が発現し上皮間葉転換に関与している事を報告した。また、膵癌微小環境におけるC3AR発現が膵癌に与える影響についても併せて検討し、C3ARが膵癌組織内に発現するC3ARが各種免疫細胞、特にM2マクロファージや制御性T細胞の腫瘍内浸潤を促進している事が分かった。C3ARは新規免疫チェックポイント分子である可能性があり、治療標的となり得るか検討する余地がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌細胞に発現する補体C3や受容体C3ARとEMTに関する報告はなく新規性高い報告となった。新規の抗がん薬開発が進まない膵癌治療において、C3ARは新たな治療標的となる可能性がある。また、抗腫瘍免疫応答において免疫抑制的に作用するM2マクロファージの発生においてもC3ARが関連している可能性がある事は大変興味深い。C3ARを標的とする治療が膵癌細胞のEMTを抑制できるだけでなく、同時に免疫抑制細胞の作用を減弱させる抗腫瘍免疫応答増強にも寄与できる可能性があると考えた。

研究成果の概要（英文）：Our findings include the followings. First, we found that C3AR (complement component 3a receptor) is expressed in pancreatic cancer cells. Adding its ligand, C3a, enhances cell proliferation and invasion. Second, we also identified the presence of C3 protein within the cytoplasm of pancreatic cancer cells, which is involved in epithelial-mesenchymal transition, a process associated with cancer metastasis. Finally, we found that C3AR expression promotes the infiltration of immune cells, particularly M2 macrophages and regulatory T cells. 4) C3AR is involved in M2 macrophage polarization, known to suppress anti-tumor immune responses. Decreased C3AR expression inhibits M2 polarization and promotes the activation of cytotoxic T cells. These findings highlight the significance of C3AR in pancreatic cancer progression and suggest its potential as a target for reversing immune suppression and enhancing anti-cancer immune responses.

研究分野：消化器内科

キーワード：膵癌 補体 C3a受容体

## 1. 研究開始当初の背景

切除不能膵癌の予後は極めて不良であるが、有効な化学療法の開発は滞っている。新薬の開発には莫大な予算と時間を要するため、既存の殺細胞性抗がん薬や抗体医薬に対する耐性機序を解明し、治療へ応用するという発想の転換が必要である。申請者は、これまでの研究で殺細胞性抗がん薬に対する耐性機序の解明に取り組み、膵癌間質やオートファジーが抗がん薬耐性に関係していることを明らかにしてきた (Clin Cancer Res 2016, J Mater Chem B 2014, Anticancer Res 2014, 他)。現在、膵癌間質やオートファジーを標的とした治療法の実用化が進んでおり、今後の発展が期待される。抗体医薬に対する耐性機序については、がんにおける多様な免疫逃避機序が関連していると考えられており、近年、がんが発現する補体制御蛋白 (CRPs: complement regulatory proteins) がその一因として注目されている。CRPs は細胞において補体の不適切な活性化から自己を防御するために存在する。一方、CRPs はがん患者血清中やがん組織で発現が亢進しており、補体による直接的な細胞障害に対して保護的に作用する。さらにモノクローナル抗体による、補体依存性細胞障害、抗体依存性細胞障害、細胞障害性 T 細胞の遊走阻止による免疫抑制作用を持つ可能性が報告されている (Front Immunol 2019, Immunol Res 2012)。抗体医薬に感受性の高いがん (悪性リンパ腫、乳癌、大腸癌等) において CRPs は薬物耐性に関与しており、抗体医薬耐性の膵癌においてはより関与が強いことが推測される。

## 2. 研究の目的

CRPs が抗体医薬耐性に関与していると推測されるが、膵癌においてどのように CRPs の発現が調整され、耐性にどの程度かかわっているかは未解明である。本研究では、膵癌微小環境における CRPs 発現亢進機序を解明し、抗体医薬の耐性を克服するための新たな治療法が確立し得るか検討することを目的とした。

また、研究の過程で膵癌における補体 C3a 受容体 (C3AR) や細胞内発現補体 C3 と EMT との関連が示唆され、膵癌微小環境における補体 C3 系の役割についても併せて検討した。

## 3. 研究の方法

CRP と抗体医薬耐性について

### 1) 膵癌における CRPs 発現の確認:

The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースにより膵癌における CRPs の発現情報を確認する。更に膵星細胞、脂肪細胞、マクロファージの多寡と各種 CRPs の発現との相関を検討し、CRPs 発現に関連する細胞を推定する。

### 2) 膵癌微小環境の構成細胞による CRPs 発現機序の解明:

膵星細胞などの膵癌微小環境を構成する細胞が膵癌細胞における CRPs 発現に与える影響について、各種細胞培地上清あるいは共培養系を用いた実験により明らかにする。

### 3) モノクローナル抗体の補体障害性細胞障害及び抗体依存性細胞障害の検証:

CRPs の発現を CRISPR-Cas9 や shRNA 等で改変し、モノクローナル抗体による補体依存性細胞障害や抗体依存性細胞障害活性の変化を確認する。

膵癌微小環境における C3 及び C3AR の機能解析

### 1) 血中及び組織に発現する補体と臨床像との関連:

膵癌患者並びに対照群血清中補体 C3 及び C3a を ELISA で測定し、膵癌組織アレイによる C3AR 発現をスコア化した。各補体関連因子の発現レベルと臨床像との関連を検討した。

### 2) C3AR 系の生理作用についての検討:

C3AR を発現するヒト膵癌細胞株 (Panc-1, MiaPaca-2) へ C3a 及び C3AR 阻害薬を添加し細胞への影響を検討した。

膵癌細胞内 C3 の機能解析:

### 1) 膵癌に発現する C3 と臨床像の関連についての検討:

膵癌組織アレイにより、C3 発現の多寡と臨床像の関連を検討した。また、各種細胞株 (ヒト膵管上皮細胞株 HNPE、膵癌細胞株 Panc-1, MiaPaca-2, BxPC-3) を用い、C3 発現の局在を免疫細胞染色で評価した。

### 2) 補体 C3 発現の影響についての検討: BxPC-3 へ C3 shRNA を添加し細胞への影響を検討した。

## 4. 研究成果

CRP と抗体医薬耐性について

### 1) The Cancer Genome Atlas project (TCGA) データベースの 2 次情報から代表的な CRP である CD46, CD55, CD59 と膵癌微小環境構成因子に関する遺伝子発現の相関を検討した。結果、

CD46 に関しては相関する因子は明らかではなかったが、CD55 は脾星細胞と NK 細胞、CD59 は単球、Treg、骨髄由来抑制細胞の発現と正の相関があり、これらの細胞との相互作用がある可能性が考えられた。

- 2) CD55 の発現は脾星細胞との共培養で増強し、PGE2 が関連していることが示唆された。また、CD59 発現に対する単球系の働きを検討するため、PMA 誘導ヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 を用い、単球系由来サイトカイン (IL-6, TNF-) が CD59 発現を増強することを明らかにした。以上の結果より CRP 発現は脾癌微小環境中に複数の因子によって発現が調整されている可能性が示唆された。
- 3) モノクローナル抗体の補体障害性細胞障害及び抗体依存性細胞障害に対する CRP の影響を細胞実験により検証した。脾癌細胞における CRP 発現を RNAi により減弱させ、モノクローナル抗体 cetuximab の細胞障害作用について検討した。しかしながら、CRP 発現減弱による cetuximab の細胞障害作用の増強は確認できず、CRP 発現を標的としたアプローチでは本研究に主目的であった抗体医薬耐性の克服は困難と結論するに至った。

#### 脾癌微小環境における C3 及び C3aR の機能解析

- 1) 非がん対象患者と比較し脾癌患者血清中の補体 C3 及び C3a の濃度は有意の高値であり、脾癌症例では転移例で各々が高値であった。また、脾癌組織中 C3aR 発現は正常組織と比較し増強しており、脾癌転移症例でより発現が増強していた。また、正常脾管上皮細胞株 HPNE と比較し、脾癌細胞株では C3aR の発現が高値であった (Figure 2A-C)。
- 2) 補体 C3a を脾癌細胞株に添加すると遊走・浸潤能が増強され、C3aR 阻害薬 (SB 290157) により C3a の作用は減弱した (Figure 2D)。

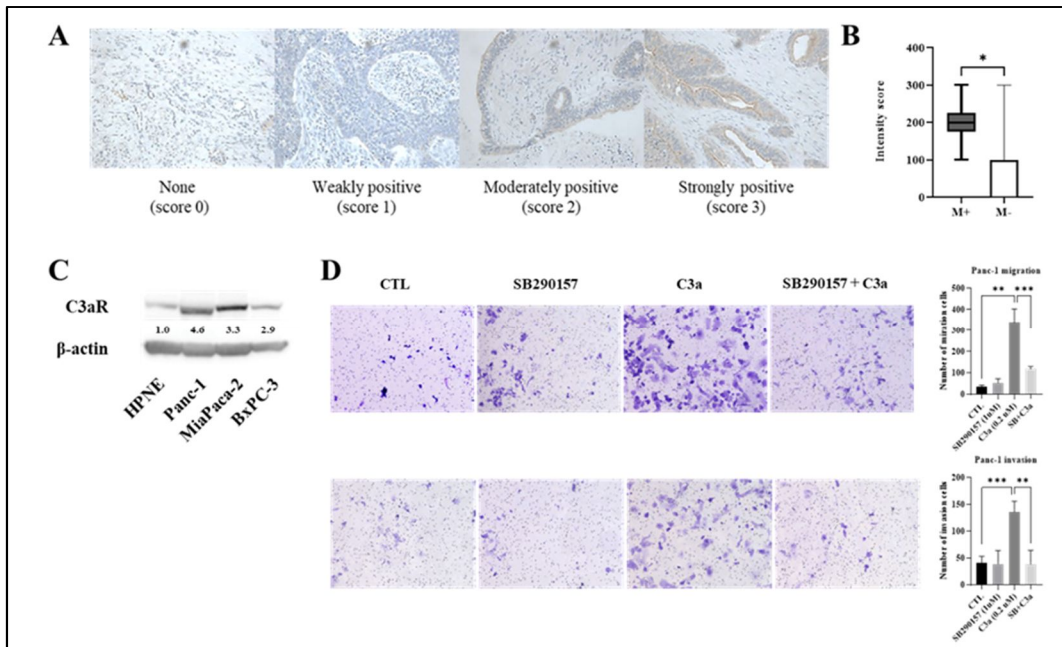


Figure 1. C3aR expression in pancreatic cancer. (A&B) Tissue microarray revealed higher C3aR expression in pancreatic cancer tissue compared with normal adjacent tissue, especially in metastatic cases (M+). (C) Pancreatic cancer cell lines showed higher C3aR expression than normal ductal cell (HPNE). (D) C3aR blockage ameliorated C3a-induced migration and invasion of Panc-1 cell line.

#### 脾癌細胞内 C3 の機能解析

- 1) 脾癌組織アレイにより脾癌組織中の補体 C3 は脾癌細胞自体に高発現しており、特に転移を有する症例で発現が亢進していた (Figure 2A)。各種細胞株の内、BxPC-3 で C3 の発現が強く、細胞免疫細胞染色より細胞質内に C3 が局在している事が分かった (Figure 2B-C)。
- 2) C3 shRNA による C3 発現減弱に伴い、BxPC-3 の遊走・浸潤能は著明に減弱した。関連する細胞シグナル伝達系として Akt や Smad の関係が示唆された。

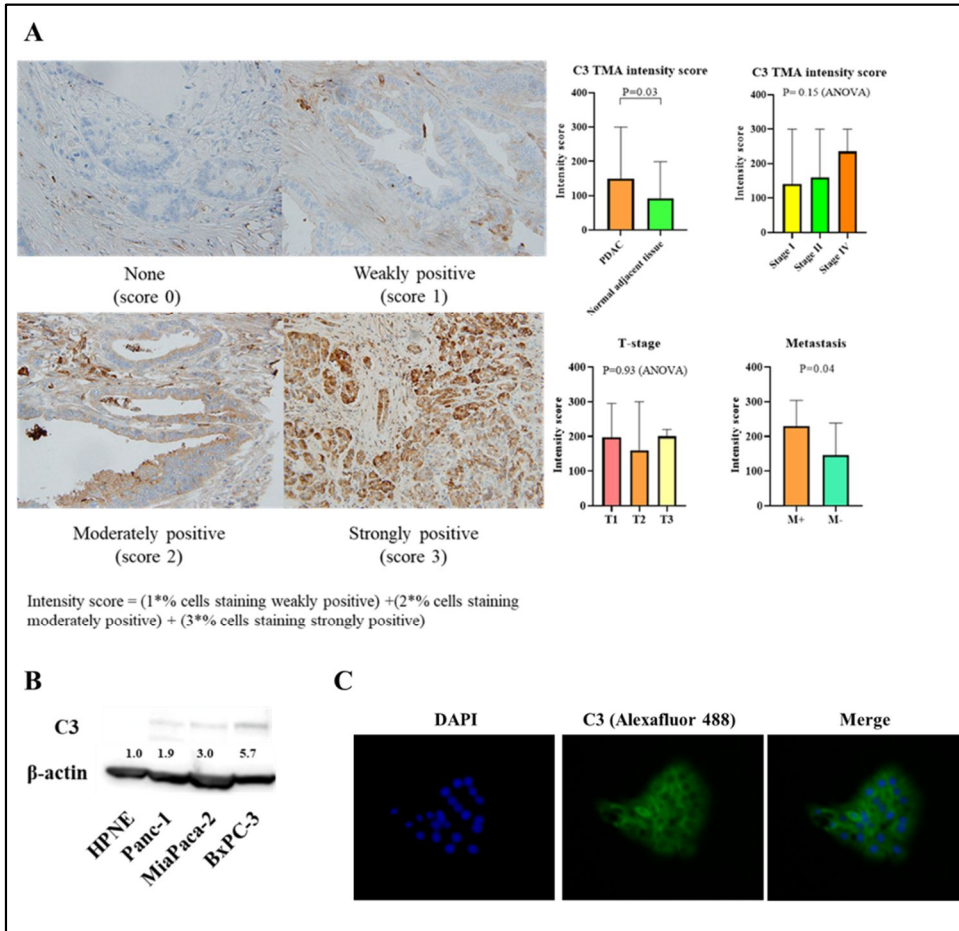


Figure 2. C3 expression in pancreatic cancer. (A) Tissue microarray revealed higher C3 expression in pancreatic cancer tissue compared with normal adjacent tissue, especially in metastatic cases (Stage IV). (B) Pancreatic cancer cell lines showed higher C3 expression than normal ductal cell (HPNE). (D) C3 expression was observed in cytoplasm of the BxPC-3 cell line.

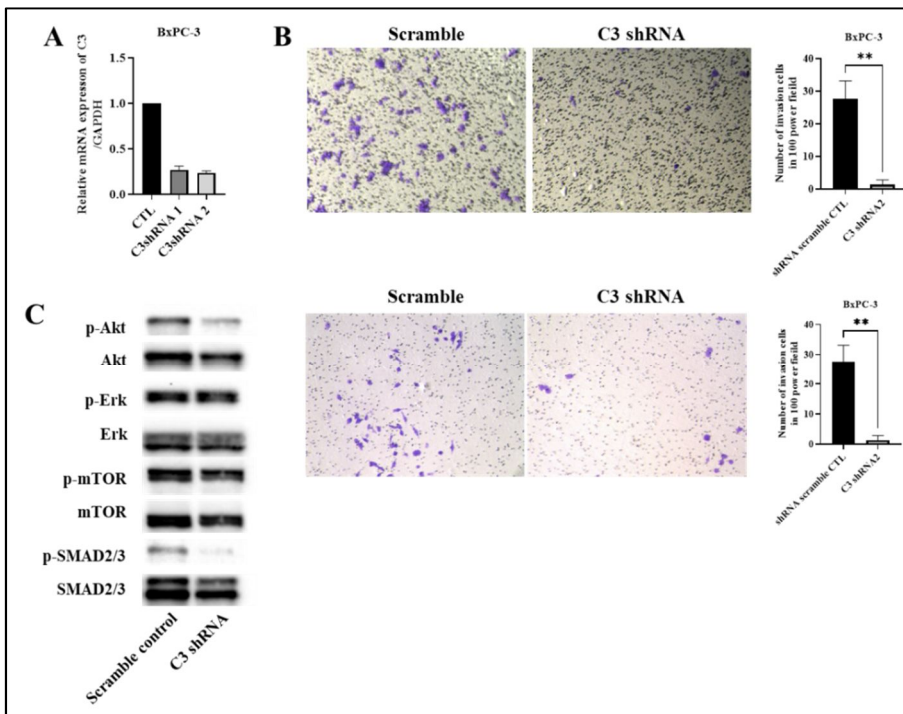


Figure 1. Effect of C3 expression in BxPC-3 pancreatic cancer cell line. (A) C3 expression was knocked down by siRNA. (B) C3 knockdown significantly reduced migration and invasion capacity of BxPC-3. (C) The effect of C3 knockdown might owe reduced expression of p-Akt and p-Smad2/3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 SUZUKI REI, OKUBO YOSHINORI, TAKAGI TADAYUKI, SUGIMOTO MITSURU, SATO YUKI, IRIE HIROKI, NAKAMURA JUN, TAKASUMI MIKA, KATO TSUNETAKA, HASHIMOTO MINAMI, KOBASHI RYOUICHIRO, HIKICHI TAKUTO, OHIRA HIROMASA	4. 巻 42
2. 論文標題 The Complement C3a - C3a Receptor Axis Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Activating the ERK Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1207 ~ 1215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15587	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 REI, TAKAGI TADAYUKI, SUGIMOTO MITSURU, SATO YUKI, IRIE HIROKI, YOMOGIDA YUKI, OHIRA HIROMASA	4. 巻 42
2. 論文標題 Intracellular C3 Modulates EMT<i>via</i>the Akt/Smad Pathway in Pancreatic Cancer Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5743 ~ 5750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16081	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 Irie Hiroki, Suzuki Rei, Okubo Yoshinori, Asama Hiroyuki, Konno Naoki, Noguchi Yuki, Watanabe Ko, Shibukawa Goro, Imamura Hidemichi, Takagi Tadayuki, Sugimoto Mitsuru, Sato Yuki, Nakamura Jun, Kato Tsunetaka, Hashimoto Minami, Yanagita Takumi, Hikichi Takuto, Ohira Hiromasa	4. 巻 23
2. 論文標題 Clinical benefit of subsequent chemotherapy after drug-induced interstitial lung disease in pancreatic cancer patients: a multicenter retrospective study from Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-023-10781-x	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 0件）

1. 発表者名 鈴木 玲
2. 発表標題 膵癌細胞内補体 C3 の意義に関する検討
3. 学会等名 第52回 日本膵臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 玲
2. 発表標題 補体C3a/C3aR axisはMAPK/Erk signaling pathwayを介して肺癌上皮間葉転換を制御する
3. 学会等名 第63回 日本消化器病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 玲、高木忠之、大平弘正
2. 発表標題 肺癌微小環境における補体C3aの働きに関する検討
3. 学会等名 第62回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 玲、高木忠之、大平弘正
2. 発表標題 肺癌免疫回避機構における補体C3受容体C3ARの役割
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------