

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17655

研究課題名(和文) 独自に誘導した膵癌幹細胞の免疫逃避機構の解明

研究課題名(英文) Immune evasion of uniquely induced pancreatic cancer stem like cells

研究代表者

松隈 聡 (Matsukuma, Satoshi)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：10634743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：独自のがん幹細胞誘導法を用いて、細胞株から膵がん幹細胞様細胞(P-CSLC)を得て、プロテオミクスによってP-CSLCに特徴的なタンパクとしてカルレティキュリン(CALR)とカテプシンB(CTSB)を同定した。P-CSLCからCALR高発現細胞をsortして解析した結果、CALR高発現細胞は低発現細胞と比較して、Sphere形成能、造腫瘍能が亢進し、HLAクラスI分子の発現が低下することが示された。また、P-CSLCにおいて高発現していた分泌タンパクCTSBの発現は、膵がん患者予後と相関することも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、膵がん幹細胞様細胞(Pancreatic cancer stem-like cell; P-CSLC)におけるカルレティキュリン(CALR)の細胞表面移行によってHLAクラスIの細胞表面発現も低下することが示され、P-CSLCにおける免疫逃避機構の存在が示された。また、P-CSLCに特徴的なバイオマーカーとして分泌タンパクであるカテプシンB(CTSB)を同定し、膵がんにおけるCTSB発現が膵がん患者予後と相関することが示され、本研究から学術的・社会的に意義のある成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Using a unique cancer stem cell induction method, pancreatic cancer stem cell-like cells (P-CSLCs) were obtained from cell lines, and calreticulin (CALR) and cathepsin B (CTSB) were identified as characteristic proteins of P-CSLCs by proteomics. The results showed that CALR-high expressing cells have enhanced sphere formation and tumorigenic potential, and decreased expression of HLA class I compared to CALR-low expressing cells. The expression of secreted protein CTSB, which was highly expressed in P-CSLCs, was also shown to correlate with the prognosis of patients with pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は、根治切除後の高い再発率と化学療法や放射線治療に対する抵抗性を特徴とする難治癌である。切除不能膵癌に対しては、多剤併用療法がおこなわれるが、生存期間中央値は 8.5-11.1 か月(Conroy T, et al. N Engl J Med 2011, Von Hoff DD, et al. N Engl J Med 2013) にとどまっている。近年の研究で、消化器癌の再発や遠隔転移に、癌幹細胞様細胞 (Cancer stemlike cell: CSLC) と呼ばれる細胞が関わっているという仮説が提唱されている (Clevers H, et al. Nat Med, 2011, Zhou BB, et al. Nat Rev Drug Discov, 2009)。CSLC は既存の抗癌剤や放射線治療に抵抗性を有しているといわれ、癌の根治のためには CSLC を標的とした治療を開発することが急務であると考えられる (図 1)。CSLC の発生には諸説あるが、近年では分化した細胞も CSLC に戻ることが可能 (可塑性) (Meacham CE and Morrison SJ, Nature, 2013) で、stem cell と non-stem cell は互いに行き来している (Kreso A, et al. Science, 2013) と考えられている (図 2)。教室では、膵癌細胞株および肝癌細胞株から、がん幹細胞誘導用培地を用いて、CSLC の表現型を伴う細胞の誘導に成功した (特願 2012-47433)。

### Cancer stem-like cells (CSLC)



図1. CSLCの治療抵抗性に伴う再発

### Cancer cell plasticity

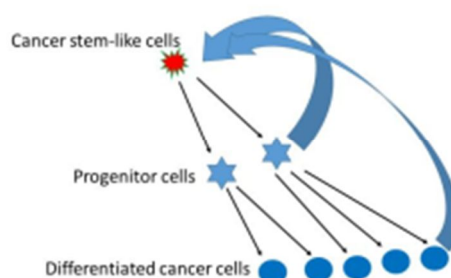


図2. 癌細胞の可塑性

誘導した CSLC は、CSLC 関連表面抗原を表出し、高い腫瘍原性と肝転移能を有し、stemness 遺伝子および Epithelial-Mesenchymal transition (EMT) 関連遺伝子の高発現も確認された。さらに細胞周期の休止、薬剤排出に関連する ABC transporter の発現亢進といった抗癌剤耐性も有していた (Watanabe Y, Matsukuma S, et al. Int J Oncol, 2014, Hashimoto N, et al. BMC Cancer, 2014, Nishiyama M, Matsukuma S, et al. Cancer Sci, 2018)。さらに、誘導した膵癌 CSLC (P-CSLC) 豊富な細胞集団と親細胞に発現している分子を Proteomics の手法で比較し、小胞体における分子シャペロンとして知られる Calreticulin (CALR) が、P-CSLC の細胞膜上で高発現していることを見出し、報告した (Matsukuma S, et al. Cancer Sci, 2016)。従来、P-CSLC は、CD24, CD44, ESA を同時に発現した細胞として定義され、同定にはこれら表面マーカーの同時測定が必要であった。一方、誘導した P-CSLC に含まれる CALR 陽性細胞は ABC transporter 活性が高く、CSLC に特徴的な高い薬剤耐性を有していた (Matsukuma S, et al. Cancer Sci, 2016)。一般的に、CALR の細胞膜表面への表出は、マクロファージにより認識され、貪食を促す "eat me signal" として知られており (Obeid M, et al. Nat Med, 2007)、理論的には CALR を表出した P-CSLC は自然免疫により排除されるはずである。我々の検討では、CALR 陽性細胞は、"anti-phagocytic signal" (Chao MP, et al. Sci Transl Med, 2010) として知られる CD47 を同時に表出 (Matsukuma S, et al. Cancer Sci, 2016) しており、マクロファージからの貪食を逃れている可能性が考えられた。最近、乳癌細胞株において、抗癌剤が hypoxia-inducible factors (HIFs) を介して CD47, CD73, PD-L1 の発現を誘導すると報告 (Samanta D, et al. PNAS, 2018) されているが、我々の誘導した CSLC においても HIFs の発現は亢進しており (Nishiyama M, Matsukuma S, et al. Cancer Sci 2018)、同様の機序で CD47 をはじめとした腫瘍免疫抑制シグナルを発現している可能性がある。これらは、免疫監視からの逃避機構の一部と考えられ、腫瘍微小環境に存在する免疫担当細胞との関連について、さらに検討が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、がん組織中に少数存在し、既存の抗がん剤治療や放射線治療に抵抗性を示して、がんの再発、転移に関わる癌幹細胞様細胞 (Cancer stem-like cells: CSLC) に対する新規治療法開発を最終目的とする。人体にはがん細胞を含む異物を排除する免疫機構が存在し、これによりがん細胞も排除されている。しかし、がん幹細胞は細胞表面に免疫細胞を抑制する分子の発現や免疫を抑制する液性因子を分泌することで、がん患者の体内で免疫から逃れることで長期生存していると考えられており、本研究では、P-CSLC の免疫逃避能の解明と合わせて、バイオマーカーの同定を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞株

ヒト膵がん細胞株として PANC-1 および YPK-2 を用いた。細胞は 10%FBS 含有 DMEM 培地にて 37℃, 5%CO<sub>2</sub>、湿潤条件下にて培養した。

#### (2) P-CSLC の誘導

既報に従って (Watanabe Y, et al. Int J Oncol. 2014; Matsukuma S, et al. Cancer Sci. 2018)、Sphere 誘導培地によって得られた浮遊 Sphere 細胞を回収し、ラミネンコートした培養器を用いてさらに培養した。

#### (3) タンパク発現解析

P-CSLC のタンパク質発現プロファイルを、二次元電気泳動、タンデム質量分析、ウェスタンブロットティング、フローサイトメトリー、免疫組織化学を用いて解析した。

#### (4) 造腫瘍能解析

免疫不全マウス NOD-Rag1<sup>null</sup> IL2r<sup>null</sup> double mutation (NRG マウス) の皮下に細胞を 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, または 10<sup>4</sup> 個注射し、100 日後の腫瘍計を評価した。

#### (5) Sphere 形成アッセイ

細胞 (1, 10, 100 細胞/100 μL の濃度) を 96 ウェル超低吸着プレートに播種し、スフィア培養液で培養した。7 日間培養後、各ウェルに形成された Sphere を数えた。

#### (6) 統計解析

2 群間の差の検定にはフィッシャーの確立検定、Welch の t 検体を用いた。生存分析には Kaplan-Meier 曲線と log rank 検定を用いた。P < 0.05 を統計的な有意とみなした。

### 4. 研究成果

ラミネンコートを用いた長期 P-CSLC 誘導系により得られた PANC-1-Lm は、親細胞 PANC-1 と比較して、細胞表面の CALR 陽性およびサイドポピュレーションフラクションの割合が増加していた (図 3)。また、PANC-1-Lm 細胞は、PANC-1 細胞と比較して、異種移植による腫瘍増殖とスフィア形成の頻度が高いことがわかった。さらに、PANC-1-Lm から選別された CALR<sup>high</sup> 細胞は、試験した細胞の中で最も高いスフィア形成頻度を示した (表 1)。さらに、PANC-1-Lm から選別された CALR<sup>high</sup> 細胞は、試験した細胞の中で最も高い球形形成頻度を示した (表 2)。興味深いことに、CALR<sup>high</sup> 細胞の PD-L1 陽性細胞数は増加し、HLA クラス I 陽性細胞数は減少していた (図 4)。これらの結果は、P-CSLC における細胞表面で CALR の高発現は、がん幹細胞としての性質に加え、免疫監視の回避と関連している可能性が示された。

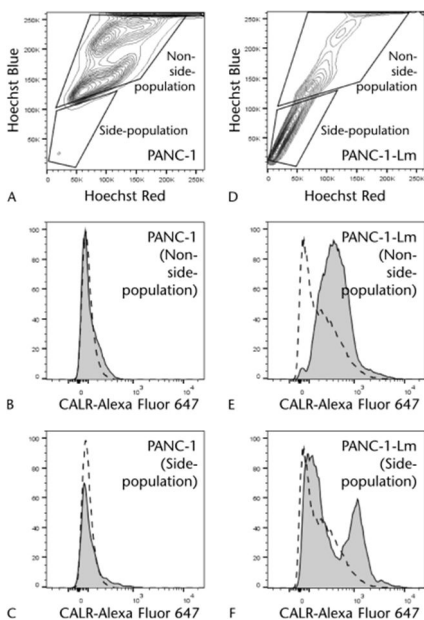


図 3. Side-population of P-CSLC.

TABLE 1. Frequencies of Tumor Formation

Cells	Frequency (%)	
	PANC-1	PANC-1-Lm
10 <sup>2</sup>	0/6 (0.0)	2/6 (33.3)
10 <sup>3</sup>	0/7 (0.0)	3/7 (42.9)
10 <sup>4</sup>	3/6 (50.0)	4/6 (66.7)

Represented number of cells were injected subcutaneously in NRG mice, and then the tumor formation was counted at day 100.

TABLE 2. Sphere Formation Frequencies of P-CSLCs

Cells	Frequency (%)			
	PANC-1	PANC-1-Lm	CALR <sup>low</sup>	CALR <sup>high</sup>
1	0/20 (0.0)	0/26 (0.0)	0/27 (0.0)	0/26 (0.0)
10	0/20 (0.0)	0/28 (0.0)	0/25 (0.0)	6/25 (24.0)
100	1/20 (5.0)	12/26 (46.2)	0/25 (0.0)	25/25 (100.0)

Sphere formation frequencies of cells with represented numbers were counted in 96-well plates. CALR<sup>low</sup> and CALR<sup>high</sup> cells were sorted from PANC-1-Lm cells.

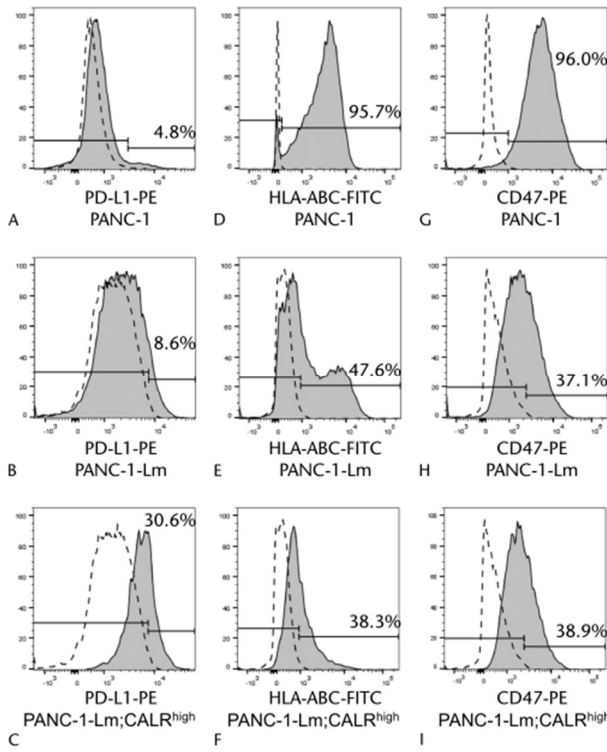


図 4. Expressions of PD-L1, HLA class I, and CD47 in P-CLSCs.

(図 3, 4, 表 1, 2 は Fujiwara Y, et al. Pancreas. 2021; 50: 405-413 より)

本研究では、P-CLSC のバイオマーカーを同定することを目的とした。二次元電気泳動解析によって P-CLSC 高発現タンパクと同定されたりソソームのシステインプロテアーゼであるカテプシン B (CTSB) は、P-CLSC である YPK2-Lm では親細胞と比較して著しく発現が上昇することをウェスタンブロッティングにより確認した (図 5)。また、YPK2-Lm は親細胞と比較して、CTSB 分泌量が増加していた (図 6)。さらに、69 例の腫瘍切除標本における CTSB の発現を評価したところ、CTSB 高発現は患者の臨床病理学的特徴および Overall survival と関連していた (図 7)。今回の結果から、CTSB は膵臓がん患者の生存率を低下させるバイオマーカーであり、P-CLSC と関連している可能性があることが示唆された。

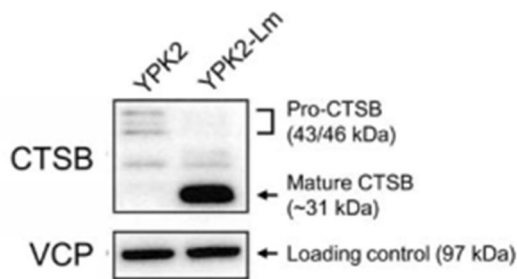


図 5. Expression of CTSB.

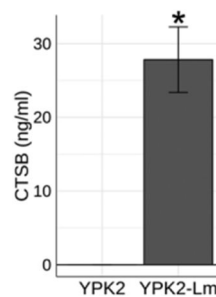


図 6. Concentrations of CTSB.

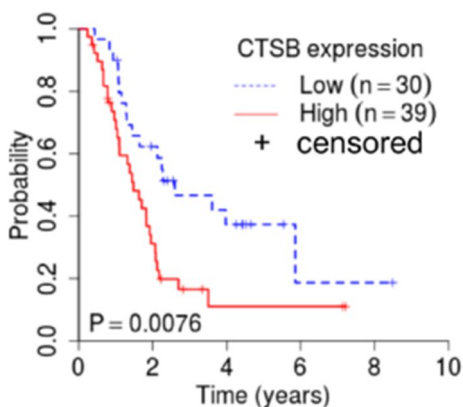


図 7. A Kaplan-Meier curve for CTSB expression in patients with pancreatic cancer.

(図 5-7 は Fujimoto T, et al. Oncology Letters. 2021; 21: 30 より)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsui Hiroto, Hazama Shoichi, Nakajima Masao, Xu Ming, Matsukuma Satoshi, Tokumitsu Yukio, Shindo Yoshitaro, Tomochika Shinobu, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Yoshino Shigefumi, Ueno Tomio, Oka Masaaki, Nagano Hiroaki	4. 巻 70
2. 論文標題 Novel adjuvant dendritic cell therapy with transfection of heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatocellular carcinoma: a phase I/II prospective randomized controlled clinical trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 945 ~ 957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02737-y	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 Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Matsukuma Satoshi, Matsui Hiroto, Nakajima Masao, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Hoshii Yoshinobu, Nagano Hiroaki	4. 巻 406
2. 論文標題 Hepatic artery resection and reconstruction using the right gastroepiploic artery during pancreaticoduodenectomy in advanced pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langenbeck's Archives of Surgery	6. 最初と最後の頁 2075 ~ 2080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00423-021-02120-0	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 Fujimoto Takuya, Tsunedomi Ryouichi, Matsukuma Satoshi, Yoshimura Kiyoshi, Oga Atsunori, Fujiwara Nobuyuki, Fujiwara Yasuhiro, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Suzuki Nobuaki, Kobayashi Shogo, Hazama Shoichi, Eguchi Hidetoshi, Nagano Hiroaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Cathepsin B is highly expressed in pancreatic cancer stem like cells and is associated with patients' surgical outcomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12291	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 Fujiwara Yasuhiro, Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Matsukuma Satoshi, Fujiwara Nobuyuki, Nishiyama Mitsuo, Kanekiyo Shinsuke, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Pancreatic Cancer Stem-Like Cells With High Calreticulin Expression Associated With Immune Surveillance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 405 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001772	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 Satoshi Matsukuma, Kiyoshi Yoshimura, Ryouichi Tsunedomi, Shoichi Hazama, Hiroaki Nagano	4. 巻 67
2. 論文標題 An invited review following the Soujinkai Young Investigator Award: Calreticulin Is Highly Expressed in Pancreatic Cancer Stem-Like Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Bulletin of the Yamaguchi Medical School	6. 最初と最後の頁 19-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤本拓也、松隈聡
2. 発表標題 CathepsinB は膵癌 stem like cells に高発現し、治療切除後の予後と関連している
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村祐太、松隈聡
2. 発表標題 肝癌細胞株から誘導したがん幹細胞様細胞の免疫逃避能に関する研究
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中上裕有樹、松隈聰
2. 発表標題 免疫染色と CyTOF による切除可能な肝細胞癌に対する 新規術前ペプチド + 免疫アジュバント併用療法施行症例の治療前生検と 切除標本のTIL解析
3. 学会等名 第18回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 碓彰一、松隈聰
2. 発表標題 新しいがん免疫療法 - Cold tumor を Hot tumor に -
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木伸明、松隈聰
2. 発表標題 進行消化器癌患者を対象とした新規複合免疫 ・ ペプチドワクチン療法の第 1 相臨床試験
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島正夫、松隈聰
2. 発表標題 肝細胞癌に対する新規がんワクチン療法による 腫瘍微小環境の改変と複合免疫療法の提案
3. 学会等名 第57回日本肝癌研究会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 恒富亮一、松隈聡
2. 発表標題 肝転移能亢進を示す肝癌幹細胞における免疫逃避
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徐明、松隈聡
2. 発表標題 大腸癌肝転移に関する癌細胞由来マイクロ RNA の同定と 制御するメカニズムの解明
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 恒富亮一、松隈聡
2. 発表標題 治療抵抗性肝癌幹細胞様 Sphere 細胞における RAB3B の役割
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島正夫、松隈聡
2. 発表標題 肝細胞癌に対する新規がんワクチン療法による 腫瘍微小環境の改変と複合免疫療法の提案
3. 学会等名 第34回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 藤原康弘、松隈聡
2. 発表標題 肺癌幹細胞様細胞の細胞表面における免疫関連分子の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新藤芳太郎、松隈聡
2. 発表標題 肺癌術後の早期再発予測因子の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村祐太、松隈聡
2. 発表標題 肝がん細胞株から誘導した Cancer stem-like cell におけるNK 細胞からの逃避能亢進
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 恒富亮一、松隈聡
2. 発表標題 自然免疫抵抗性肝癌幹細胞様 Sphere 細胞におけるエクソソーム分泌
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 恒富亮一、松隈聡
2. 発表標題 がんの進展・浸潤に關与する肝癌幹細胞様 Sphere 細胞における RAB3B の役割
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022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. 本研究に關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
---------	---------