

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22797

研究課題名（和文）腫瘍内神経を介した膵臓癌進展機序におけるTGFβシグナルの役割

研究課題名（英文）The role of TGFβ signaling in pancreatic cancer progression via nerve signaling

研究代表者

高橋 良太（Takahashi, Ryota）

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：80647660

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は膵特異的に変異型Krasを発現しTGFβ受容体をノックアウトした膵臓癌マウスモデル(PKFマウス)を用いて腫瘍内神経に対するTGFβシグナルの影響について解析した。PKFマウスの膵腫瘍では交感神経の増加が見られたが、癌細胞における神経栄養因子の発現はp53変異型の膵癌細胞とは異なっておりTGFβシグナル経路による影響と考えられた。一方PKFマウスにアドレナリンβ2受容体阻害薬を投与したところ明らかな治療効果は認められなかったことから、PKFマウスの膵臓癌はp53変異型膵臓癌と比較してアドレナリンβ2シグナル阻害に対する耐性が高いと考えられたが、その機序は今後の検討課題であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓癌における腫瘍内神経を介した腫瘍促進機序は膵臓癌の治療標的となる可能性があると考えられる一方、実際の膵臓癌で高頻度に認められるTGFβシグナルの異常と腫瘍内神経との関連はこれまで明らかになっていない。本研究によってその一端が明らかになり、癌細胞の持つ遺伝子変異により腫瘍内神経の性質や神経シグナル阻害治療への感受性が影響を受けている可能性が示唆された。一方その詳細な機序や、神経シグナルへの介入が有効な腫瘍が持つ特徴を明らかにすることなどは今後の検討課題と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the effect of TGFβ signaling on nerves in pancreatic cancer microenvironment using a mouse model of pancreatic cancer with pancreas-specific expression of oncogenic Kras and knockout of TGFβ receptor type 2. We observed increased number of sympathetic nerves within pancreatic cancer from PKF mice. The expression pattern of neurotrophins in tumor cells of PKF mice was distinct from that of the mice with oncogenic Kras and mutant p53. On the other hand, when we treated PKF mice with either an antagonist of adrenergic β2 receptors (ADRB2) or vehicle, we did not observe a significant therapeutic effect. These results suggested that pancreatic cancer in PKF mice has higher resistance to ADRB2 blockade, although the mechanism needs to be elucidated in future studies.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵臓癌 TGFβ 神経

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は最も予後不良な癌の一つである。日本における膵臓癌による死者数は、癌死の中で4番目に多く、年々増加している。

膵臓癌は豊富な間質を持ち、そこに含まれる免疫細胞、線維芽細胞などの細胞が腫瘍細胞との相互作用を介して腫瘍を進展させていると考えられている。研究代表者らは膵臓癌の微小環境における神経の役割に注目して研究を進めており、これまで膵特異的に変異型 Kras 及び変異型 p53 遺伝子を発現する膵臓癌マウスモデル(1)(KPC マウス)を用いて、交感神経アドレナリンシグナルが神経栄養因子 Nerve Growth Factor (NGF)を介して膵癌を進展させる機序や、副交感神経ムスカリンシグナルを介して腫瘍を抑制する機序について解明して来た(2)(3)。

膵臓癌において認められる遺伝子変異のうち、Kras、p53 に加えて TGFβシグナルの異常は膵臓癌において最もよく認められる遺伝子異常の一つである。TGFβは神経系の形成に重要な役割を果たすことが知られており、膵臓癌においても腫瘍内の神経形成に TGFβシグナルが重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。膵特異的に変異型 Kras を発現し、TGFβの2型受容体をノックアウトした膵臓癌マウスモデル(4)(PKF マウス)は膵臓癌において TGFβシグナルの役割を検討するための有用かつ独自性が高いツールであり、これまで得られなかった新たな知見が得られるものと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、膵臓癌における TGFβシグナルと神経栄養因子やアドレナリン・ムスカリンシグナルの相互作用を明らかにし、膵臓癌における神経の制御機構を明らかにすることである。

腫瘍内神経を介した膵臓癌の進展に寄与する要因の理解を深め、微小環境における神経の制御を介した膵臓癌の予防・治療を目指す。

### 3. 研究の方法

まず膵臓癌微小環境における TGFβシグナルの異常が神経に与える影響を明らかにするため広く用いられている膵臓癌モデルマウスである TGFβ2 型受容体欠損による Ptf1a-Cre/Kras<sup>G12D</sup>/Tgfbr2<sup>flox/flox</sup> (PKF)マウスの膵腫瘍を用いて、末梢神経・交感神経・副交感神経の免疫染色を行いこのマウスモデルにおける腫瘍内神経を評価する。またこのマウスモデルから樹立した膵臓癌細胞株におけるアドレナリン受容体やムスカリン受容体の発現について qRT-PCR で解析し、交感神経及び副交感神経シグナルの標的やその下流因子について検討する。

次に TGFβ異常を伴う膵臓癌における神経標的療法の効果を検討するためこのマウスモデルに対してアドレナリン2型受容体の阻害剤を投与し、その効果を検討することで、TGFβシグナルの異常を伴う膵臓癌においても p53 変異による膵臓癌と同様に神経を標的とした治療が有効であるかを検討する。アドレナリン受容体阻害剤の投与による腫瘍サイズや生存期間の変化に加えて、腫瘍細胞の増殖や細胞死、免疫細胞浸潤、線維芽細胞について免疫組織学的に検討する。

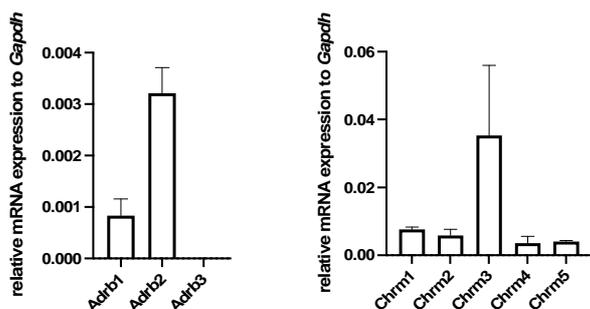
### 4. 研究成果

膵特異的な変異型 Kras 発現及び TGFβ 2 型受容体ノックアウトによる膵臓癌マウスモデル (PKF マウス)の腫瘍組織及び腫瘍から樹立した細胞株を用いて、腫瘍細胞における神経栄養因子と交感神経・副交感神経シグナルの受容体発現を qRT-PCR で評価したところ、アドレナリン2型受容体及びムスカリン3型受容体の発現が他のものよりも高い発現を示した(図1)。同じ細胞株における神経栄養因子の発現を解析したところ、特に nerve growth factor (NGF)及び brain-derived neurotrophic factor (BDNF)の発現上昇を認めた(図2)。最も多く発現していたのは BDNF であり、この結果はヒト膵臓癌細胞における傾向と一致していた。一方これは変異型 Kras 及び変異型 p53 を持つマウス膵臓癌細胞では NGF が最も多く発現していることとはやや異なる結果であり、腫瘍が持つ遺伝子変異により神経栄養因子の発現が影響を受けており、さらに腫瘍内神経の浸潤や機能の違いをもたらしている可能性が示唆された。

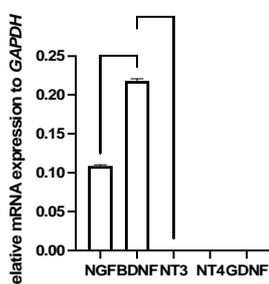
腫瘍組織内における神経浸潤について各種神経マーカーの発現を免疫染色で評価したところ、tyrosine hydroxylase 陽性交感神経の増生が認められた。また膵臓癌組織においても腫瘍細胞におけるアドレナリン2型受容体の発現を確認した。これらの結果により、腫瘍細胞における TGFβシグナルの異常は BDNF を中心とした神経栄養因子の増加を介して腫瘍内交感神経の増生に寄与している可能性、さらに交感神経シグナルが腫瘍増大に寄与している可能性が示唆された。TGFβシグナルの異常は膵臓癌の大部分で認められるため、p53 の変異がない腫瘍においても TGFβシグナルの異常を伴うものは腫瘍内神経が治療標的となる可能性があると考えられた。

TGFβシグナルが生体内で膵臓癌の腫瘍内神経に与える影響について引き続き解析を進めた。PKF マウスが8週齢になったところでアドレナリン2型受容体(ADRB2)阻害薬である ICI118,551 単剤もしくは PBS を投与してマウスの生存期間及び腫瘍サイズを解析したところ、生存期間・腫瘍サイズ共に有意な差は認められなかった(図3)。次に得られた膵腫瘍を免疫組織学的に解析したところ、腫瘍における増殖マーカーの発現や細胞死、腫瘍間質における各種免

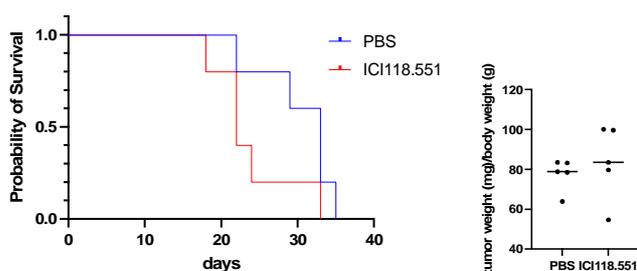
疫細胞浸潤や線維芽細胞の活性化の指標である SMA の発現に明らかな差は認められなかった。変異型 Kras 及び変異型 p53 を発現する膵臓癌マウスモデルである Kras<sup>G12D</sup>/Trp53<sup>R172H</sup>/Pdx1-Cre (KPC)マウスに対して同様の治療を gemcitabine と併用して行った際は生存期間の延長などの治療効果が見られていた(2)ことから、TGF $\beta$  シグナル経路の不活化変異を持つ、もしくは p53 野生型の膵臓癌においては、p53 変異型の膵臓癌と比較して腫瘍進展に対する ADRB2 シグナル阻害治療への耐性が増加している可能性があると考えられた。一方その機序は神経栄養因子の発現調節機構や腫瘍内神経の制御機構を含めて不明であり、今後の検討課題であると考えられた。その他の可能性として、PKF マウスの膵臓癌は KPC マウスと比較して間質が豊富な腫瘍であり、drug delivery が低下している可能性も考えられたため、他の抗癌剤等との併用効果についても今後の検討課題と考えられた。



(図 1)qRT-PCR によるアドレナリン・ムスカリン受容体発現解析



(図 2)qRT-PCR による神経栄養因子発現解析



(図 3)マウス生存期間(左) 腫瘍重量(右)

#### <引用文献>

1. Hingorani SR, Wang L, Multani AS et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*. 2005; 7(5): 469-83.
2. Renz BW, Takahashi R, Tanaka T et al.  $\beta$ 2 Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(1):75-90.
3. Renz BW, Tanaka T, Sunagawa M et al. Cholinergic Signaling via Muscarinic Receptors Directly and Indirectly Suppresses Pancreatic Tumorigenesis and Cancer Stemness. *Cancer Discov*. 2018;8(11):1458-1473.

4. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE et al. Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev.* 2006;20(22): 3147–60.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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