

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07886

研究課題名（和文）後天的ゲノム修飾による膵腫瘍環境リモデリング機構の検証

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism in remodeling of pancreatic tumor microenvironment by epigenetic modification

研究代表者

中井 陽介（Nakai, Yousuke）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80466755

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）：膵臓癌では変異などの遺伝子異常のみならずエピジェネティクスと呼ばれる後天的な遺伝子修飾が重要な役割を持つことが報告されている。本研究では膵臓癌のエピジェネティクスを制御することによって免疫細胞や線維芽細胞といった癌をとりまく微小な環境にある細胞の性質が影響を受け、その結果膵臓癌の治療へつながるといった可能性について検討するため、患者由来のオルガノイドと呼ばれる三次元培養系を用いて薬剤スクリーニングを行った。その結果抗腫瘍効果を示す化合物を複数同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓癌におけるエピジェネティクスの重要性が示唆されているが、腫瘍進展における詳細な役割や治療標的としての可能性はまだ明らかになっていない。本研究で同定された化合物は患者由来の膵臓癌オルガノイドに対して広範な抗腫瘍効果を示しており、エピジェネティクスが膵臓癌の治療標的となる可能性が示唆された。今後さらに検討を進め、マウスへの移植実験等により免疫細胞や線維芽細胞といった腫瘍微小環境への影響やその意義について明らかにすることを目指す。

研究成果の概要（英文）：In pancreatic cancer, it is reported that in addition to genetic mutations, epigenetics is playing an important role. In this study, we conducted a drug screening test using patient-derived organoid culture system to investigate in the possibility that cells in tumor microenvironment surrounding tumor cells, such as immune cells and fibroblasts are affected by regulating epigenetic modification of cancer cells, thereby leading to a novel therapy of pancreatic cancer. As a result, we found four chemicals targeting epigenetic modification which show anti-tumor effects on pancreatic cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵臓癌 エピジェネティクス オルガノイド

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌においては変異などの遺伝子異常のみならず、その有利な遺伝子発現を誘導するために後天的なゲノム修飾ともいえるエピジェネティクスプロファイルが特異的に構築されている。

一方で特徴的な線維性間質による膵癌微小環境においては、癌随伴性線維芽細胞 (CAF) が膠原線維などの基質や増殖因子を産生し、免疫細胞とのせめぎあいの中で癌の進展や治療に対する抵抗性を誘導する。最近ではCAFに多様性があり抗原提示性をもつサブタイプも明らかにされ、腫瘍内相互応答の複雑性が示唆された。免疫細胞のプロファイルも腫瘍進展に直結するが、最近報告された膵癌細胞内オートファジー依存性MHC-1分子の分解による免疫回避など、未知の免疫応答機序が示唆され、CAFとの相互作用からもそのサブセットが動的に制御されている可能性がある。前研究で膵癌組織内CAFの活性化とエピジェネティクス制御について報告したが、免疫細胞プロファイルを含めた微小環境リモデリングの分子機構には未知の点が多い。本研究ではエピジェネティクス制御化合物によって生じる影響の解析を通して、多様なCAFおよび免疫細胞リモデリングの分子機構と腫瘍生物学的意義を検討する。

## 2. 研究の目的

エピジェネティクス制御とはDNAメチル化やヒストン修飾の総称であり、細胞分化、代謝状態や免疫応答と関連して多彩な機序で癌の性質に影響を及ぼしうる。実際にエピジェネティクス修飾酵素のゲノム変異が膵癌で見出され、その重要性が示唆されている[1]。血液腫瘍ではDNAメチル化阻害薬やHDAC阻害剤が臨床導入されているが、膵癌ではエピジェネティクス標的薬の有効性は未だ十分検討されていない。多くの論文で膵癌細胞自体のエピジェネティクス修飾やその意義が解析される一方、膵癌間質内のCAFや免疫細胞の腫瘍生物学的役割におけるエピジェネティクス制御の重要性については未解明のままである。研究者らはBET inhibitorによるCAFの活性化抑制を介した抗腫瘍効果を報告したが[2]、免疫細胞を含めた間質全体におけるエピジェネティクス制御の重要性は不明な点が多い。最近、膵癌細胞内のオートファジーでMHC-1分子が分解され免疫回避につながる機序が報告された[3]。これら膵癌細胞と免疫細胞との関係のみならず、CAFと免疫細胞とのクロストークについても未解明な点が多い。膵癌CAFにも樹状細胞様の役割を持つapCAFなど様々なクラスターが存在することが報告された[4]。これら腫瘍内の多様なCAFは相互に動的移行性を持つことから、細胞の可塑性に重要なエピジェネティクス機構がその多様性制御にも関連する可能性が想起される。しかしながら間質内でのCAFの多様性、腫瘍内免疫細胞プロファイル、腫瘍悪性度などとエピジェネティクス制御との関連は依然として未解明である。本研究では、膵癌組織におけるCAFサブタイプのプロファイルや免疫細胞サブセットの多様性をふまえ、その構築におけるエピジェネティクス制御の重要性について検討する。そのうえでCAF多様性のプロファイルと免疫細胞応答、腫瘍の生物学的特性、例えば浸潤能や転移能などの悪性度や、薬剤感受性における影響力を検討する。

## 3. 研究の方法

倫理委員会承認のもと、内視鏡的生検検体から患者微量検体を増幅培養し、その特性および腫瘍内多様性を維持したまま解析可能なオルガノイドとゼノグラフトシステムを構築した。それらは原発巣の性質を良く再現・維持し、既報通り *in vitro* オルガノイド培養も原発巣の腺管構造を維持していた。このシステムは患者各々の膵癌組織の解析を可能とした。前検討では、このヒト膵癌オルガノイド培養系3ラインを用いて、約100種類のエピゲノム阻害化合物の抗腫瘍効果のスクリーニングを行った。大部分の化合物は濃度200nMの検討では単独での増殖抑制効果を示さなかったものの、3ラインでいずれも抑制効果を認める4化合物を同定し、それらがJQ1 (BET inhibitor), THZ1 (CDK7 inhibitor) と二種類のHDAC inhibitorであることを明らかにした。

本研究では、まずこれらの化合物を作用させることで、膵癌細胞自体のみならず間質内細胞プロファイルに対してどのような影響を与えるかを解析する。具体的には、上記4化合物をヒト膵癌腫瘍組織から樹立したCAFの *in vitro* 培養系、マウスの膵癌モデル、およびヒト膵癌ゼノグラフトモデルに投与することで、CAFや免疫細胞のプロファイルおよび腫瘍自体の進展への影響を検討する。

## 4. 研究成果

膵癌においては変異などの遺伝子異常のみならず、エピジェネティクス環境が特異的に構築されている。エピジェネティクス制御とはDNAメチル化やヒストン修飾の総称であり、細胞分化、代謝状態や免疫応答と関連して多彩な機序で癌の性質に影響を及ぼしうる。実際にエピジェネティクス修飾酵素のゲノム変異が膵癌で見出され、その重要性が示唆されている。膵癌の特徴的な線維性間質による微小環境においては、癌随伴性線維芽細胞 (CAF) が膠原線維などの基質や増殖因子を産生し、免疫細胞とのせめぎあいの中で癌の進展や治療に対する抵抗性を誘導する。免疫細胞のプロファイルも腫瘍進展に直結するが、最近報告された膵癌細胞内オートファジー依

存性 MHC-1 分子の分解による免疫回避など、未知の免疫応答機序が示唆される。前研究で膵癌組織内 CAF の活性化とエピジェネティクス制御について報告したが、免疫細胞プロファイルを含めた微小環境モデリングの分子機構には未知の点が多い。本研究ではエピジェネティクス制御化合物によって生じる影響の解析を通して、多様な CAF および免疫細胞リモデリングの分子機構と腫瘍生物学的意義を検討する。倫理委員会承認のもと、内視鏡的生検検体から患者微量検体を増幅培養し、その特性および腫瘍内多様性を維持したまま解析可能なオルガノイドとゼノグラフトシステムを構築した。それらは原発巣の性質を良く再現・維持し、既報通り *in vitro* オルガノイド培養も原発巣の腺管構造を維持していた。このシステムは患者各々の膵癌組織の解析を可能とした。前検討では、このヒト膵癌オルガノイド培養系 3 ラインを用いて、約 100 種類のエピゲノム阻害化合物の抗腫瘍効果のスクリーニングを行った。その結果抗腫瘍効果を示す 4 化合物を同定した。さらに *in vivo* モデルにおける検討を進めている。

- 1 Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M, Li Y, Wilson GW, Connor AA, *et al.* A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature* 2016;**538**:378-82.
- 2 Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Hoshikawa M, Tanaka M, Nakatsuka T, *et al.* Stromal remodeling by the BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses the progression of human pancreatic cancer. *Oncotarget* 2016;**7**:61469-84.
- 3 Yamamoto K, Venida A, Yano J, Biancur DE, Kakiuchi M, Gupta S, *et al.* Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature* 2020;**581**:100-5.
- 4 Elyada E, Bolisetty M, Laise P, Flynn WF, Courtois ET, Burkhart RA, *et al.* Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov* 2019;**9**:1102-23.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

1. 著者名 Hamada Tsuyoshi, Oyama Hiroki, Nakai Yousuke, 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 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 Kato Hiroyuki, Tateishi Keisuke, Iwadate Dosuke, Yamamoto Keisuke, Fujiwara Hiroaki, Nakatsuka Takuma, Kudo Yotaro, Hayakawa Yoku, Ijichi Hideaki, Otsuka Motoyuki, Kishikawa Takahiro, Takahashi Ryota, Miyabayashi Koji, Nakai Yousuke, Hirata Yoshihiro, Toyoda Atsushi, Morishita Shinichi, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 114
2. 論文標題 HNF1B driven three dimensional chromatin structure for molecular classification in pancreatic cancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1672 ~ 1685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15690	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 Tatsunori, Masugi Yohei, Inoue Yosuke, Hamada Tsuyoshi, Nakai Yousuke, THasegawa Kiyoshi, Kitago Minoru, Takahashi Yu, Fujishiro Mitsuhiro, for the GTK Pancreatic Cancer Study Group in Japan	4. 巻 113
2. 論文標題 KRAS variant allele frequency, but not mutation positivity, associates with survival of patients with pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3097 ~ 3109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15398	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 Kato Hiroyuki, Tateishi Keisuke, Yousuke Nakai, et al.	4. 巻 162
2. 論文標題 MNX1-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 -

〔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)	
研究分担者	高橋 良太  (Takahashi Ryota)  (80647660)	東京大学・医学部附属病院・助教   (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
---------	---------