

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15491

研究課題名（和文）膵腫瘍-間質の相互作用におけるSTING経路の働き

研究課題名（英文）The role of STING pathway in pancreatic tumor-stroma interactions

研究代表者

佐藤 健（SATO, Takeshi）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：50806106

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌は5年生存率が10%に満たない予後不良な疾患である。膵癌は間質が極めて豊富であることが特徴とされる。間質構成成分の中で癌関連線維芽細胞(CAF)に着目し、癌細胞と間質の相互連関を担う因子として、核酸のセンサーであるSTING経路に焦点を当て、細胞バール・動物バールでの検討を行った。結果として、マウスの皮下移植バールにおいて腫瘍間質のCAFにおけるSTINGをアゴニストによって刺激することで、INF γ などのサイトカインの発現が亢進し、腫瘍抑制効果が得られた。一方で、アゴニスト以外にSTINGを活性化する因子の同定には至らず、STINGを治療標的とするためには課題が多い結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討で、膵癌の間質に豊富に存在する癌関連線維芽細胞(CAF)のSTINGを活性化することで腫瘍抑制効果が得られる可能性が示唆された。しかし、STINGアゴニスト以外にSTINGを活性化する因子を同定することが出来ず、またSTINGアゴニスト自体も腫瘍縮小効果を得るには腫瘍に直接投与する必要があるなど、STINGを膵癌の治療標的とするには課題が残る結果となった。STING経路の活性化はINF γ など腫瘍免疫を活性化するサイトカインの発現を亢進すると考えられ、何らかの方法でCAFのSTINGを活性化することが出来れば、治療標的としての道が開ける可能性があり、今後の検討課題と考える。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer is a disease with a poor prognosis with a 5-year survival rate of less than 10%. Pancreatic cancer is characterized by an extremely rich stroma. We focused on cancer-associated fibroblasts (CAF) in the tumor stroma, and focused on STING pathway, which is a nucleic acid sensor, as a factor responsible for the interaction between cancer cells and stromal cells. We investigated the role of STING pathway in pancreatic cancer stroma by in vitro and in vivo assays. It was suggested that STING agonist stimulated STING in CAF in the tumor stroma and enhanced the expression of cytokines such as INF γ and resulted in tumor suppression in a subcutaneous implantation model of mice. On the other hand, the factors other than STING agonist that activate STING in CAF have not been identified. As a result, there are still many issues to be STING pathway as a therapeutic target of pancreatic cancer.

研究分野：膵臓癌

キーワード：膵臓癌 癌関連線維芽細胞 STING

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌(膵癌)は悪性腫瘍の中でも近年増加傾向にある5年生存率10%に満たない予後不良な疾患である。膵癌では、癌細胞の数と比較して間質の量が非常に多く、線維芽細胞の増生が特徴的である。癌細胞や局所浸潤細胞から産生される因子により線維芽細胞が増殖すると考えられており、癌関連線維芽細胞(CAF: cancer-associated fibroblasts)と呼ばれる。CAFの働きについてはこれまで様々な報告があり、癌の抑制に機能するものか癌の進展に重要なものであるかの結論は出ていない。例えば、CAFはコラーゲンなどの多くの細胞外基質を産生し、癌組織を硬化させるが、その結果、血管を虚脱させることにより、抗癌剤の効率的な浸透を妨げることが報告されている。また、CAFは多くの増殖因子を産生して、癌細胞の増殖や浸潤を促進する機能や、抗腫瘍免疫応答の抑制にも関与すると報告されている。一方で、マウスの研究では、遺伝子操作によって間質を構成する線維芽細胞を形成できない膵癌マウスを作製すると、これらマウスの膵癌は増殖も速く、悪性化し、しかも死亡率も高くなることが明らかにされた(Rhim et al. Cancer Cell 2014)。以上から現在、多くの製薬企業がCAFを標的とした新規治療法の開発を目指しているものの、膵癌のCAFをターゲットとした治療については慎重に考えるべきであることが示唆される。

癌組織において腫瘍細胞とCAFの相互作用の重要性はさまざまな報告により明らかになりつつある。例えば、TGF- β 1はそれを担う因子の一つであり、このシグナルを阻害すると血管新生および癌の増殖が抑制されることが報告されている(Hosein et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2020)。しかしながら、その全貌が明らかにされたとは言えない。近年報告されている相互作用の中にDamage-associated molecular patterns (DAMPs)がその相互作用を担う因子の一つであると考えられている。具体的には膵癌細胞の壊死により細胞外へ放出された物質であるが、膵癌では低酸素状態や化学療法によりきわめて多くの死細胞が認められる。CAFは癌細胞からシグナルを受け取り、さまざまな反応をすると考えられるが、DNAやRNAなどの核酸もDAMPsとして重要な因子であり、癌細胞-間質の相互連関を担う因子として解析を行う興味深い対象であると考えた。細胞が核酸をシグナルとして認識するシステムとして主に細菌やウイルス核酸の認識システムとしていくつか報告されている。例えば、TLR3, TLR9, NOD1, STINGなどが報告されているが、その中でもSTINGはウイルスDNAや細胞内DNAにより感作され、IFN誘導経路およびNF- κ B経路を活性化する分子として近年注目されている分子である。また、血球系細胞における解析では腫瘍免疫を担う重要な経路として、治療の分子ターゲットとなっている。発癌に関してはサイトカイン発現を介して腫瘍増殖を促進する報告(Takahashi A et al. Nat Commun 2018)がある一方で、腫瘍由来DNAを検出し、腫瘍に対するT細胞応答を促進することにより、STINGが獲得免疫応答を誘導して腫瘍退縮をもたらすことが報告されている(Corrales L et al. Cell Rep 2015)。膵癌においても同様の作用が考えられるが、膵癌では血球系細胞の浸潤が他の癌に比較して少ないこと、間質そしてCAFが極めて豊富であることから、多臓器とは異なる機能を発揮するのではないかと考えられた。Preliminaryな解析ではSTINGはCAFに発現しており、その働きが想定された。しかしながら膵癌におけるSTINGの発現が生体内で核酸を認識しているのか、悪性化、浸潤、転移そして治療抵抗性に直接的に関与しているのかは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌においてCAFの相互連関における核酸認識を行う因子であるSTINGに着目し、その役割の検討及び治療標的の可能性を探ることであった。そのため、(1)膵癌マウスモデルにおけるSTINGの役割の検討(2)CAFにおけるSTING機能の細胞レベル、動物レベルでの検討。(3)臨床検体におけるSTING発現、活性化との関連性の検討(4)新たな治療戦略の提唱を行っていくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)膵癌動物モデルにおけるSTINGの機能解析

ノックアウトマウスの検討:膵癌マウスは膵特異的にKrasを発現させるマウス(Ptf1a-cre/LSL-KrasG12D/+、以下KC)およびさらにTP53を欠損させたマウス(Ptf1a-ERcre/LSL-KrasG12D+/TP53 f/f、以下KPC)を用いた。また、膵癌におけるSTINGの影響を検討するため、KPCマウスとSTINGノックアウトマウス(STING-/-)(Takashima K et al. BBRC 2016)を交配し、Ptf1a-ERcre/LSL-KrasG12D+/TP53 f/f/STING-/- (KPCS)を作成し、病理組織学的な検討を行った。

皮下移植モデルによる検討:KPCSよりマウス由来の膵癌細胞株を樹立し、STINGがノックアウトされた膵癌細胞株(STINGKO膵癌細胞株)を得た。この細胞株は同様の遺伝背景マウス(C57/BL6)に容易に生着するため、同細胞株を野生型マウス(WT)およびSTING-/-に皮下移植し検討を行った。また、腫瘍間質にはCAFの他に血球系の細胞も多く入り込んでいるため、より詳細な検討を行うため、WTおよびSTING-/-にそれぞれSTING-/-およびWTの骨髄を移植した、骨

髄キメラマウスを作成した。多くの検討で STING アゴニスト(5,6-Dimethyl-9-oxo-9H-xanthene-4-acetic acid :DMXAA)は腫瘍免疫を賦活化し、腫瘍を抑制することが報告されており、これらの皮下移植モデルを用いて、アゴニストを投与することによる腫瘍形成への影響を検討した。

膵臓モデルマウスでの DMXAA 投与による治療効果の検討：KPC に DMXAA 単剤の腹腔内投与を行うことにより、予後延長効果があるかを検討した。

(2)細胞レベルの検討

CAF を用いた検討：12 ヶ月齢の KC より樹立した CAF は STING を発現し、DMXAA により活性化することは確認できていたため、研究に用いた。STING 活性化を起こす機構の解析のため、腫瘍細胞からの DAMPs によるものと仮説を立て検証した。KC より樹立した膵臓細胞株を使用し、その上清や Freeze and thaw による壊死物質の添加、放射線照射などの各種刺激により、CAF の STING が活性化するかを検証した。活性化を起こす因子が同定された場合には、CAF 内で起こる変化を RNA seq 解析にて網羅的に遺伝子発現変化の解析を行う予定とした。

(3)膵臓癌臨床検体からの膵臓細胞株/CAF の樹立と阻害剤の応用

当研究室で膵臓癌臨床検体から 3 次元オルガノイドおよび CAF の作成に成功しており、これらのヒト細胞系を用いて、マウス細胞で得られた現象が再現できるかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1)膵臓動物モデルにおける STING の機能解析

ノックアウトマウスの検討：

KPC および KPCS において病理組織学的な検討を行った。免疫組織学的には、KPCS において KPC と比較し、有意に CD8a+陽性細胞数が減少し、CD4+陽性細胞数が増加することは確認されたが、膵臓形成の程度に差は認められなかった。KPC における蛍光免疫染色では、CAF のマーカーである SMA 陽性細胞において、STING が共発現していることが確認できたが、STING のリン酸化はほとんど観察されず、自然経過では STING の活性化がほとんど起きていないことが、表現型に差を認めなかった原因として推定された。

皮下移植モデルによる検討：

STINGKO 膵臓細胞株を WT・STING-/-および骨髓キメラマウス (BMT1: WT に STING-/-の骨髓を移植 = 血球系の STING はノックアウトされており、腫瘍間質では主に CAF にのみ STING が発現しているモデル; BMT2: STING-/-に WT の骨髓を移植 = 血球系でのみ STING を発現しているモデル)の皮下に移植し、皮下移植モデルを作成し、DMXAA を腫瘍内の直接投与したところ、STING-/-では腫瘍抑制効果を認めなかったが、WT・BMT1・BMT2 のいずれにおいても腫瘍縮小効果が認められた。皮下腫瘍組織を用いた qRT-PCR での検討においては WT・BMT1・BMT2 のいずれにおいても INF γ の発現上昇が認められた。BMT1 においても腫瘍縮小効果が認められたことは、CAF の STING 活性化によっても抗腫瘍効果が得られることを示唆する結果と考えられた。

膵臓モデルマウスでの DMXAA 投与による治療効果の検討：

KPC に対して、DMXAA 単剤を腹腔内に 3 回投与行った膵臓を単離して解析したところ、皮下移植マウスと同様に qRT-PCR において INF γ の発現上昇しており、さらに細胞障害性 T 細胞が標的細胞を攻撃する際に放出されるパーフォリンやグランザイム B の発現上昇が認められ、短期的には DMXAA が腫瘍免疫を増強させている可能性が示唆された。しかしながら KPC に DMXAA を生後 10 週より週一回連続的に投与してマウスの生存期間を観察したところ、コントロール群と比較し予後延長効果は認められなかった。DMXAA が長期的に腫瘍免疫にどのような影響を与えるかは解明できておらず、今後の検討課題となった。

(2)細胞レベルの検討

CAF を用いた検討：DMXAA を用いて刺激を行うと、STING が活性化され、マクロファージを刺激した時と同様に INF γ を産生した。KPC から樹立した膵臓細胞株では、DMXAA の投与を行っても INF γ の産生は起こらず、腫瘍細胞自体が STING を介して免疫に影響を与えている可能性は低いと考えられた。Western blot を行うと、マクロファージと同様に STING の下流にある TBK1 や IRF3 の活性化を介して、INF γ や各種サイトカインを産生することが確認された。また、細胞遊走キットを用いて、STING を活性化させた CAF は活性化型 T 細胞の遊走を促進させることも確認した。一方で、膵臓細胞株の上清や Freeze and thaw による壊死物質の添加、放射線照射などを用いて CAF を刺激し、DMXAA 以外を用いた刺激によって STING を活性化する因子を探したが、検討した範囲内では CAF の STING を活性化する因子を同定することが出来なかった。

In vivo での検討として、KPC に放射線照射および放射線照射 + ゲムシタピン (抗がん剤) の投与を行い、組織内の STING がリン酸化されるかを観察したが、やはり CAF の STING を活性化する因子を見出すことは出来なかった。

(3)膵臓癌臨床検体からの膵臓細胞株/CAF の樹立と阻害剤の応用

上述のように、皮下移植モデルにおいて、CAF の STING を活性化させることにより腫瘍縮小効果が得られることは示すことができたが、in vivo, in vitro のいずれにおいても DMXAA 以外を用いた刺激による STING の活性化する因子を見出すことは出来なかった。また、膵臓マウスモデルにおいても DMXAA 単剤での予後延長効果を示すことが出来なかった。これらの検討に時間を要したため、ヒト臨床検体を用いた検討に十分に着手することができず、STING を治療標的とす

るには課題が多い結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 良優、佐藤 健、金丸 雄志、中森 義典、小野寺 翔、岩田 悠里、飯塚 千乃、須江 聡一郎、佐藤 博紀、鈴木 悠一、池田 礼、池田 良 輔、入江 邦泰、金子 裕明、前田 慎
2. 発表標題 マウスでの膵腫瘍形成における STING の役割
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 鈴木良優、佐藤健、杉森慎、金丸雄志、中森義典、小野寺翔、佐藤博紀、鈴木悠一、池田礼、池田良輔、飯塚千乃、稲垣尚子、金子裕明、須江聡一郎、入江邦泰、前田慎
2. 発表標題 膵癌関連線維芽細胞におけるSTINGの活性化は、細胞障害性T細胞の遊走を介して抗腫瘍効果を発揮する
3. 学会等名 JDDW2023
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
---------	---------