

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15594

研究課題名（和文）膵癌間質中のERストレス応答に基づく化学療法抵抗性機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of chemoresistance mechanism based on ER stress response in pancreatic cancer stroma

研究代表者

遠藤 翔（ENDO, Sho）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20801749

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）：ヒト膵癌組織から樹立したPSC（活性化PSC）と非膵癌組織から樹立したPSC（非活性化PSC）の遺伝子発現解析を行ったところ、活性化PSCでは小胞体（ER）関連遺伝子群の発現が有意に高かった。そこで、PSCにおいてER関連遺伝子であるERAP2を抑制したところ、ERストレス応答の低下を介してPSCの活性化が抑制されることが分かった。さらに、マウスモデルを用いた治療実験では、PSCのERAP2を抑制することで腫瘍縮小と抗癌剤感受性上昇をもたらすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌において間質標的治療の有望性を示唆する報告は多数あるが、実臨床に向けての治療法はまだ確立されていない。これまでの報告の多くが癌細胞のストレス応答に関与するものであったが、本研究では膵癌に特徴的な豊富な間質細胞における小胞体ストレス反応経路が膵癌の進展や既存治療に対する抵抗性に寄与することを明らかにした点で学術的意義は大きい。また、膵癌における間質標的治療の新たなターゲットとしてERAP2を同定したことで、今後の膵癌新規治療法の開発の一助となる可能性もあり、新規治療法の開発が急務である膵癌治療において、本研究の果たす社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Gene expression analysis of PSCs established from human pancreatic cancer tissue (activated PSCs) and PSCs established from non-pancreatic cancer tissue (non-activated PSCs) revealed that the expression endoplasmic reticulum (ER)-related genes was significantly higher in activated PSCs than non-activated PSCs. Therefore, we targeted ERAP2, an ER-related gene, in PSCs and found that activation of PSCs was suppressed via inhibition of ER stress response. Furthermore, treatment experiments using mouse models suggested that suppression of ERAP2 in PSCs leads to tumor shrinkage and increased sensitivity to anticancer drugs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小胞体ストレス UPR 膵星細胞 ERAP2 膵癌 癌微小環境 PSC ERストレス

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、未だ根治不能な悪性腫瘍として君臨しており、その5年生存率は10%にも満たない。膵癌の低い生存率の原因の一つとして、強い化学療法抵抗性が挙げられる。膵癌組織は、豊富な細胞外基質を伴う desmoplasia が病理学的特徴とされており、豊富な癌間質は腫瘍の間質圧の増加と血管虚脱により、腫瘍細胞への薬剤到達を阻害することで、膵癌の治療抵抗性を高めている。このため、膵癌の微小環境で中心的な役割を果たしている膵星細胞(Pancreatic Stellate Cells; PSCs)を含め、間質の制御は既存治療の抵抗性の改善や新規治療法の開発に不可欠であると考えられる。

小胞体は生体恒常性維持に欠かせない細胞小器官(オルガネラ)であり、膜タンパク質や分泌タンパク質の翻訳後修飾や適正な折りたたみを担っている。細胞に内外から種々の刺激負荷がかかると小胞体内でのタンパク質折りたたみは障害され、折りたたみ不全の不良タンパク質が蓄積する小胞体ストレス状態となる。小胞体ストレスが生じると、細胞は状態を改善するためにUPR(unfolded protein response)を発動して不良タンパク質を排除しようと試みる。低酸素・グルコース飢餓といった代謝ストレスにさらされるがん微小環境中ではUPRが活性化していると報告されており、がん細胞の生存のみならず化学療法抵抗性の原因となりうるということが考えられてきた。一方、これまでの報告の多くが腫瘍細胞のストレス応答に關与するものであり、膵癌においてはその組織学的特徴から、間質細胞の小胞体ストレス反応経路が膵癌の進展や既存治療に対する抵抗性に寄与するメカニズムを解明すれば、膵癌の低い生存率、治療奏効率へのブレイクスルーに繋がるという発想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵星細胞における高い小胞体ストレス活性が、膵癌の進展及び化学療法抵抗性の獲得にどのように影響しているかを解明することである。膵癌は乏血性腫瘍として知られ、血液からの栄養や酸素供給が乏しい言わば微小環境ストレス状態にあっても高い増殖・転移能力を誇っている。このような特殊な環境への適応機構の一つが小胞体ストレス活性の変化と考えられる。膵癌を制御する革新的治療法がない今日、膵癌微小環境の特殊な代謝ストレス及びその適応機構を解明することで、化学療法抵抗性を示す膵癌の再発メカニズムの解明、及びこれを制御する治療法や既存の化学療法の奏効率向上が可能になると考えられる。

3. 研究の方法

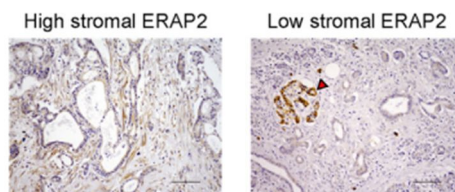
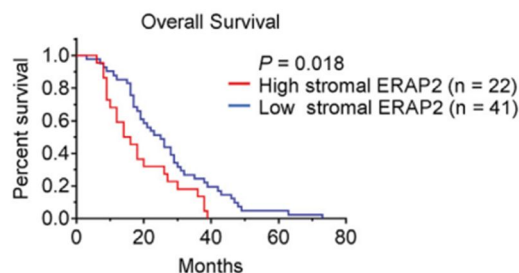
ヒト膵癌組織における小胞体ストレス関連遺伝子の発現評価
ERAP2 ノックダウン膵星細胞の作成
ER ストレス活性変化に伴う膵星細胞の活性化評価
マウスモデルを用いた治療実験

4. 研究成果

ヒト膵癌組織における小胞体ストレス関連遺伝子の発現評価

手術切除標本から得られたヒト膵癌組織由来の活性化ヒトPSC(M-PSC)と非膵癌組織由来の非活性化ヒトPSC(N-PSC)をマイクロアレイに提出して両者の遺伝子発現を比較したところ、M-PSCで小胞体関連遺伝子が有意に発現上昇していた。そこで、PSCの活性化に小胞体関連遺伝子が関与していると考え、その中でも特に著明に発現が変動していたERAP2に着目した。

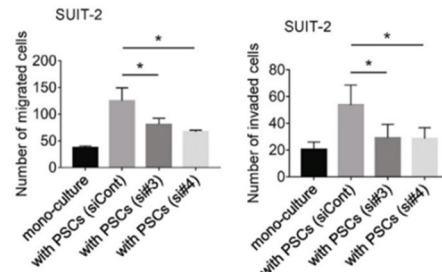
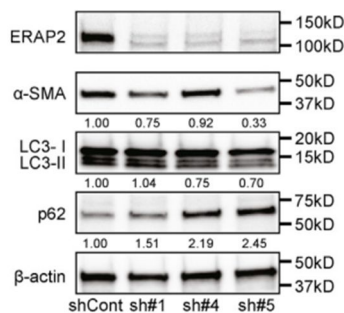
ヒト膵切除標本を用いてERAP2の免疫染色を行ったところ、正常膵と比較して膵癌組織では有意にERAP2の発現が上昇していた。さらに、ERAP2は間質に広く発現しており、ERAP2高発現群は、ERAP2低発現群と比較して有意に予後不良であった(右図)。



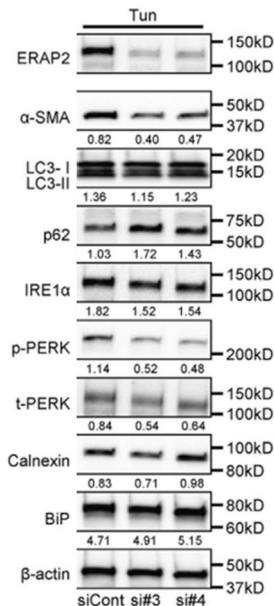
ERAP2 ノックダウン膵星細胞の作成

小胞体関連遺伝子であるERAP2が間質をターゲットとした治療の標的となりうるかを検証するために、ERAP2をshRNAを用いて抑制した細胞株であるPSC shERAP2を作成した。shERAP2では、コントロールと比較して、PSC活性化の指標であるSMAの発現が抑制されており、さらにはPSC活性化の重要なメカニズムであるオートファジー活性も抑制されていることが明らかに

なった(右図)。さらに、ERAP2 を抑制した PSC の癌細胞の影響を *in vitro* での共培養実験で検証したところ、ERAP2 抑制 PSC は、コントロールの PSC と比較して、癌細胞の遊走能・浸潤能促進を有意に低下させることが明らかになった(右図)。



ER ストレス活性変化に伴う膵星細胞の活性化評価
 さらに ERAP2 を抑制した際の UPR 関連遺伝子の変化を検証した。ER Stressor である Tunicamycin を投与した際に、コントロールの PSC では著明に UPR 遺伝子群の発現が上昇するのに対し、ERAP2 を抑制した PSC では UPR 遺伝子の発現上昇が見られず、SMA も抑制されていた(右図)。以上のことから、ERAP2 を抑制することで ER ストレス応答を抑制し、さらには PSC の活性化をも抑制することが示唆された。

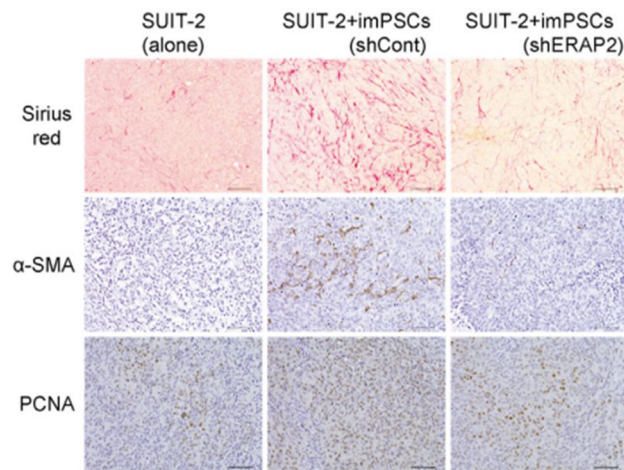


マウスモデルを用いた治療実験
 最後に、PSC の ERAP2 を標的とした治療が、実際に間質相互作用を抑えることで腫瘍縮小効果、抗癌剤への感受性増強効果をもたらすかを、*in vivo* マウスモデルで検証した。

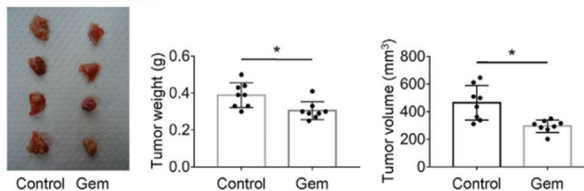
Nude マウス (BALB/c-nu) にヒト膵癌細胞 SUI-2 とヒト PSC shCont / shERAP2 をそれぞれ膵臓に共移植した膵同所移植モデルを用いて形成された腫瘍内の間質を解析した。結果は、PSC shERAP2 を共移植した腫瘍は、PSC shControl を共移植した腫瘍と比較して腫瘍の SMA, PCNA の発現が著明に低下しており、また Sirius red による

染色でも間質増生が抑制されていることが示唆された(左図)。さらに、同様のモデルに対して Gemcitabine を投与して抗癌剤感受性を比較したところ、PSC shControl を共移植した腫瘍と比較して、PSC shERAP2 を共移植した腫瘍は有意に Gemcitabine への感受性が良好であることが明らかになった(右下図)。

以上の結果から、ER ストレス応答が PSC の活性化に関与していることを明らかにし、ER 関連遺伝子である ERAP2 を標的とすることで、癌間質相互作用を抑制し、化学療法への感受性を向上させる可能性があることが示唆された。



SUI-2+imPSC shERAP2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Guan Weiyu, Nakata Kohei, Sagara Akiko, Iwamoto Chika, Endo Sho, Matsuda Ryota, Matsumoto Sokichi, Ikenaga Naoki, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Onishi Hideya, Ohuchida Kenoki, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 22
2. 論文標題 ERAP2 is a novel target involved in autophagy and activation of pancreatic stellate cells via UPR signaling pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 9~19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pan.2021.09.012	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sheng Nan, Koji Shindo, Kenoki Ohuchida, Tomohiko Shinkawa, Taiki Moriyama, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 The functions of TAK1+CAF in pancreatic cancer microenvironment
3. 学会等名 JDDW2022(第30回日本消化器関連学会週間)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohei Nakata, Toshiya Abe, Noboru Ideno, Naoki Ikenaga, Yusuke Mizuuchi, Kenoki Ohuchida, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 Investigation of the mechanism of PSC activation and development of high-throughput drug screening detecting compounds targeting PSC
3. 学会等名 第53回日本膵臓学会大会・第26回国際膵臓学会（IAP・JPS2022）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Mochida, Kenoki Ohuchida, Nobuhiro Torata, Tomohiko Shinkawa, Toshiya Abe, Noboru Ideno, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 Single-cell RNA sequence-based evaluation of the mechanism of CAF-related chemo-resistance of PDAC
3. 学会等名 第53回日本膵臓学会大会・第26回国際膵臓学会（IAP・JPS2022）（国際学会）
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
---------	---------