

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20800

研究課題名（和文）弱酸性腫瘍間質液のpH制御による抗癌剤治療効果の検討

研究課題名（英文）Drug sensitivity regulated by pH of tumor interstitial fluid

研究代表者

砂川 真輝（Sunagawa, Masaki）

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：50892709

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は弱酸性細胞外液によって誘導される癌細胞の抗がん剤耐性獲得メカニズムの解明に基づく新規バイオマーカーや治療法の開発を目的とした。我々は弱酸性細胞外液による抗がん剤耐性メカニズムとしてCD133が関与していることを明らかにした。また、癌細胞を弱酸性培養液で培養することで特徴的な遺伝子発現パターンを同定することができた。しかし、我々が注目したFAM111Bは明らかな癌遺伝子とはならない可能性が示された。in vivoにおいては腫瘍周囲にpH中和製剤を投与することで、抗がん剤の感受性を高めることが示唆されたが、そのメカニズムは不明であり、今後も検討を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんは予後不良の難治がんであり、新規バイオマーカーおよび新規薬物療法の開発が喫緊の課題である。我々は、腫瘍微小環境の構成要素である腫瘍間質液に着目した。癌代謝および低酸素・低栄養を伴う腫瘍微小環境によって腫瘍間質液は弱酸性を示しており、低pHが癌幹細胞マーカーの1つであるCD133を発現し、癌細胞の抗がん剤耐性を誘導していることを明らかにした。今回着目した遺伝子は直接的に癌遺伝子とは考えにくい。中和製剤により腫瘍微小環境のpHを制御することで、抗がん剤の抗腫瘍効果を増強させることができ、新規治療法として期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the cancer cell mechanism of acquired resistance to anticancer drugs through weakly acidic tumor extracellular fluid, with the goal of developing new biomarkers and novel treatment methods. We investigated that CD133 is involved in cancer cell resistance to anticancer drugs via acidic extracellular fluid. Moreover, culturing cancer cells in weakly acidic culture medium allowed us to identify characteristic gene expression patterns. Furthermore, in in vivo model, administration of a neutralizing agent (NaHCO<sub>3</sub>) around the tumor suggested an increased sensitivity to anticancer drugs. However, the exact mechanism remains unknown and requires further investigation in the future.

研究分野：膵臓癌

キーワード：膵臓癌 癌代謝 弱酸性環境 Acidemia 低pH

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は癌細胞と豊富な細胞外マトリックスから構成される難治性癌の1つである。膵臓癌における腫瘍微小環境の重要性は認識されており、その構成細胞である癌関連線維芽細胞、腫瘍随伴性マクロファージ、サイトカイン・ケモカインに着目し、多くの研究が進められている。我々は癌細胞および腫瘍微小環境に存在する細胞群の間に介在する腫瘍間質液(Tumor interstitial Fluid; TIF)に着目した。癌細胞は酸素や栄養状態が不十分な生育環境において、嫌気性代謝経路を利用する古典的ワールブルグ効果により最終代謝産物である乳酸を細胞外に分泌している。この乳酸がTIF内で溶解することで水素イオンを解離することでTIFのpHが弱酸性に傾くことは報告されている(Cancer Research, 2019)。近年では腫瘍の進展を促進することも報告されるようになった(J Mol Med, 2020)。さらに水素イオンはタンパク質の物性を大きく変えることからin vitroでの実験系とは大きく異なるタンパク質変性が弱酸性TIFによって誘導されている可能性が高い。したがって、実臨床における抗がん剤耐性能と基礎実験における抗がん剤耐性能は異なることが示唆される。

これらから微小環境の構成要素であるTIFは、癌の生育に関し重要と考えられるが多くが明らかになっておらず、弱酸性TIFの癌細胞に対する影響、特に抗癌剤耐性獲得能については十分に検討されていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、弱酸性TIFが癌細胞の抗がん剤耐性効果を増強させることを確認し、メカニズムを明らかにすることである。さらに腫瘍微小環境のpHを中和製剤が中性化し、抗がん剤耐性効果を減弱させることができることを検証し、微小環境における弱酸性TIFの制御を伴う膵臓の新規治療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

ヒト膵臓癌細胞株(Panc1、KLM1、KP4)を弱アルカリ性の細胞培養液を乳酸と重炭酸を用いてpHを調整した(弱アルカリ性、弱酸性)培地で培養した後に抗がん剤を投与し、抗腫瘍効果を検討する。弱アルカリ性培地と弱酸性培地で培養した後のTotal RNAを抽出し、次世代シーケンサーを利用してトランスクリプトーム解析を行う。発現変動遺伝子およびクラスター分析を行うことで、抗癌剤耐性関連遺伝子の候補を複数同定する。同定した遺伝子を保有する膵臓癌由来細胞株(KLM1、Panc1)にsiRNAを用いてノックダウンさせた細胞株を作成し、Gemcitabine、5-FU、Nab-Paclitaxelを投与し、増殖能(WST-1アッセイ)、細胞死誘導能(Apoptosisアッセイ)を用いて抗癌剤耐性能を検討する。最後に腫瘍皮下移植モデルに抗がん剤と中和製剤を併用投与し、腫瘍微小環境のpHを制御することで癌細胞の抗がん剤感受性を増強させるかを検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 弱酸性培養液抗がん剤耐性能の変化

ヒト膵臓癌細胞株を乳酸と重炭酸製剤を用いていくつかのpHを調整した DMEM 培地で培養した。48 時間後に培養した膵臓癌細胞の CD133 陽性細胞率をフローサイトメーターで評価したところ、pH が低下することで CD133 陽性細胞率が増加することを明らかにした (図 1)。また弱酸性培地で 48 時間の培養後に抗がん剤 (Gemcitabine) で抗がん剤の効果を WST-1 assay で細胞の生存率を評価したところ、弱酸性培地で培養した膵臓癌細胞の抗がん剤耐性獲得能が亢進することを明らかにした (図 2)。

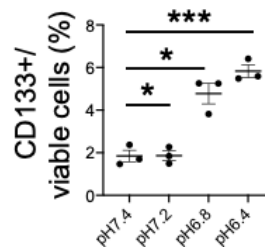


図 1

##### (2) 弱酸性培養液により誘導される遺伝子発現解析

弱酸性培地がどのような遺伝子の発現変化を認めるのかを検討するためヒト膵臓がん細胞株 (KLM1、KP4、Panc1) を用いて弱酸性培養液と弱アルカリ性培養液 (コントロール) でそれぞれ 48 時間培養後、total RNA を抽出、次世代シーケンサーを用いて、遺伝子発現の差を比較・検討した (図 3)。その結果 CYP24A1、CNFA1、NOTCH3、ZNF488、ZNF618、FAM111B の発現が大きく増加していた。FAM111B は肺腺癌や悪性黒色腫などで癌悪性化の促進因子であり、予後不良因子としての報告を認めていた。

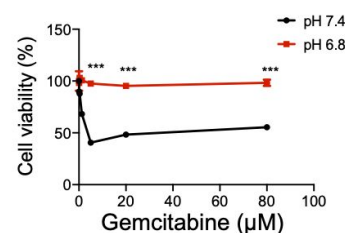


図 2

FAM111B に着目し、siRNA を用いて膵癌細胞株の発現をノックダウンした。FAM111B の発現による細胞増殖能を WST-1 assay を用いた評価を行った。しかし、明らかな細胞増殖能に有意な差を認めなかった。また、抗がん剤耐性能を評価するために抗がん剤投与後の癌細胞生存率を評価したが、差異を認めなかった。

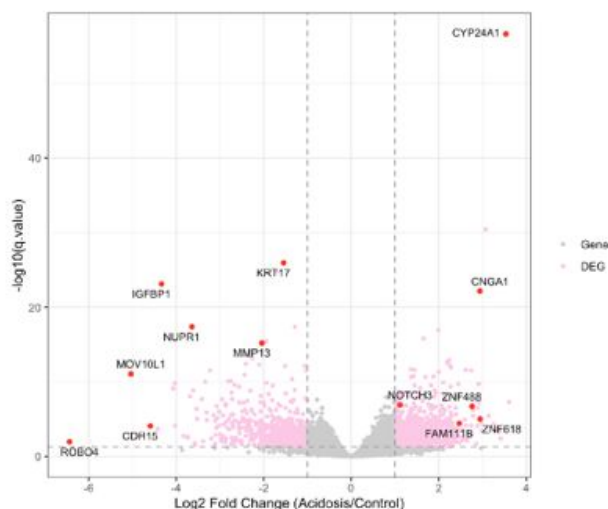


図 3

##### (3) 腫瘍皮下移植モデルを用いた中和製剤を併用することによる腫瘍増大抑制効果の検討

マウス皮下にマウス膵癌細胞株を皮下投与した 2 週間後、皮下腫瘍周囲に重炭酸製剤を投与し、その後抗がん剤 (Gemcitabine) を腹腔内投与した。コントロール群と比べて重炭酸製剤併用投与群では有意に腫瘍形成を抑制することを明らかにした (図 4)。マウス皮下腫瘍の組織学的検討において FAM111B の発現率に差を認めなかった。しかし、組織学的に重炭酸製剤併用群では癌細胞周囲の線維化が抑制されており腫瘍微小環境そのものを変化させる可能性が示唆された。

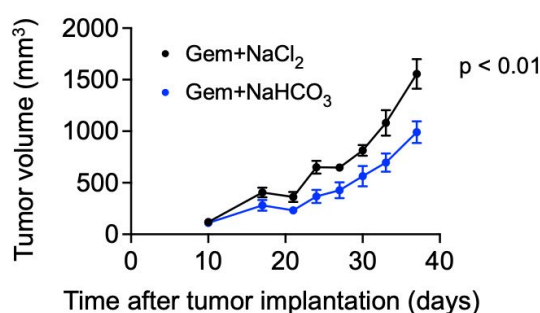


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>砂川真輝  |
| 2. 発表標題<br>pH regulation might increase drug sensitivity in pancreatic ductal adenocarcinoma |
| 3. 学会等名<br>第81回日本癌学会   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|