

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591007

研究課題名(和文)膵癌の発癌進展過程を通じ高発現する膵癌特異的抗原の機能解析と臨床応用

研究課題名(英文)Functional analysis of pancreatic cancer-specific antigen highly expressed throughout the disease stage

研究代表者

伊地知 秀明(Ijichi, Hideaki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70463841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌発癌過程の早期から進行期までを通じ高発現している抗原PSCA(prostate stem cell antigen)は、膵癌の発癌機序の根幹に関わる可能性があり、治療標的かつ早期診断にも応用できる可能性がある。我々の樹立した遺伝子改変膵発癌マウスモデルでも、前癌病変に比べ進行癌でのPSCAの高発現がみられた。ヒト膵癌細胞株のPSCAをノックダウンすると、細胞増殖が著明に抑制されアポトーシスを生じており、PSCAの機能的な重要性が示唆された。しかしPSCAとTGF-beta-SMAD系を含む各種細胞内シグナルとの関係には有意な所見が見出されず、今後その分子機能とその機序の解明が必要である。

研究成果の概要(英文)：Prostate stem cell antigen (PSCA) is highly expressed throughout the early and advanced stage of pancreatic cancer (PCa) development. This suggests that PSCA might be associated with the essential mechanism of cancer initiation and progression. PSCA can also be useful for molecular targeting therapy and early diagnosis. Our genetically-engineered mouse PCa model (Kras activation and TGF-beta receptor II knockout) demonstrated significant upregulation of PSCA in the cancer cells compared to precancer cells. PSCA knockdown in human PCa cells dramatically inhibited cell proliferation with marked apoptosis, which suggested functional importance of PSCA. However, the relation of PSCA function and intracellular signalings including TGF-beta-SMAD pathway remained unclear. Detailed function of PSCA and the underlying mechanism should be further investigated.

研究分野：消化器内科学 膵癌

キーワード：膵癌 PSCA

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治癌の最たるものであり、その病態の解明・治療法の開発は急務である

現在膵癌は日本人の癌死の第4位となり近年増加傾向にある。その予後は最近でもまだ5年生存率7%程度と依然として極めて不良である。このように膵癌が難治癌の最たるものである理由の一つは早期診断の困難さにあり、診断時に既に転移や播種のある切除不能例が80%を占める。また外科的切除を受けた症例でも多くは1年で再発し、その5年生存率は20%に達しない(Warshaw and Fernandez-del Castillo, NEJM 1992; Bardeesy and DePinho, Nat Rev Cancer 2002; がん情報サービス・最新がん統計)。

我々は、以前より膵癌の化学療法に関わる臨床試験を複数行ってきた。そのうち、研究分担者である伊佐山が責任者である臨床試験は次の通りである(UMIN000000498 非切除進行膵癌に対する gemcitabine と gemcitabine/S-1 療法の比較試験, GEMSAP study; UMIN000002152 膵癌に対するジェムシタピン・カンデサルタン併用療法第1相試験; UMIN000005580 膵癌に対するジェムシタピン・カンデサルタン併用療法第2相試験)(本研究開始時)。

ヒト膵癌像を最もよく近似するマウス発癌モデル

膵癌の発癌および進展のメカニズムを理解するため、近年膵臓特異的な遺伝子改変マウスを用い、ヒトの膵癌をよく模倣する膵癌モデルが作成されてきた。その中でも、我々が樹立した恒常活性型 KrasG12D 発現と TGF- β II 型受容体(Tgfbr2)ノックアウトという組合せのマウスは、ヒトの膵癌と同様の臨床的症候を呈し、かつ著明な間質の増生を伴う分化型管状腺癌が得られ、既報のモデルの中で最もヒトの膵癌に似たモデルと考えられる(Ijichi et al., Genes Dev 2006)。一方、膵臓特異的な KrasG12D のみの発現では、前癌病変である PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia)が出現するが、浸潤癌は1年以上みられず、TGF- β シグナルのブロックにより膵発癌は劇的に加速されることがこのモデルの比較から明らかとなっている。

これまで、膵癌の in vivo モデルは、ヌードマウスを用いた xenograft モデルが主流であったが、xenograft と遺伝子改変モデルと実臨床の腫瘍組織像を直接比較すると、特に癌細胞周囲の間質像の相違により xenograft と実臨床には明らかな乖離がある一方で、遺伝子改変モデルと実臨床が非常に似た像を呈することが明らかとなった(Olive et al., Science 2009)。また、xenograft モデルでは、当然のことながら、発癌過程の研究を行うことは不可能である。

膵発癌過程の劇的な進行に関与すると考えられる分子 PSCA

上記のように、膵特異的遺伝子改変マウスの結果から、変異型 Kras 発現により前癌病変が出現し、加えて Tgfbr2 がノックアウトされると全例で劇的に浸潤癌まで進行し、生後8週程度で癌死してしまうことが明らかとなった。そこで我々は、膵癌の発癌進展機序にアプローチするために、変異型 Kras のみ発現した PanIN 組織から前癌病変 PanIN 相当の細胞を、変異型 Kras 発現 + Tgfbr2 ノックアウトによる膵癌組織から膵癌細胞をそれぞれ分離し、in vitro の培養系を樹立した(Ijichi et al., Genes Dev 2006)。そしてこの膵癌細胞と PanIN 細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにて比較解析し、膵癌細胞において特徴的な発現増強もしくは減弱のみられる遺伝子群を見出した。発現が増強した遺伝子群の中で、我々は PSCA (prostate stem cell antigen) という分子に着目した。

PSCA は幾つかの癌種との相関がいわれているが、その機能および惹起する細胞内シグナルはいまだ不明である

PSCA は、前立腺幹細胞の抗原と名付けられており、前立腺癌では悪性度・病期を示す Gleason score と PSCA の発現量が正の相関を示すことが知られている。また近年、ゲノムワイド関連解析の発展に伴い、PSCA 遺伝子多型が膀胱癌やスキルス胃癌の高危険群と相関することも報告された(Ye et al., Nat Genet 2009; Sakamoto et al., Nat Genet 2008)。但し膀胱癌では PSCA は過剰発現、スキルス胃癌では発現低下と癌種により全く逆の発現パターンになっている。PSCA 蛋白は細胞膜にアンカーし細胞外に存在する糖蛋白であるが、その機能については全く不明であり、そのリガンドや惹起される細胞内シグナルについてもわかっていない。

PSCA は膵癌及び膵前癌病変で高発現しており、PSCA 中和抗体による膵癌の臨床試験が進行中である

膵癌においては、PSCA は高発現していることが報告され(Argani et al., Cancer Res 2001)、前立腺癌同様に癌に促進的に作用する分子であることが推測されている。また膵癌の前癌病変とされる膵管内乳頭粘液性腫瘍においても PSCA の高発現の報告があり(Siveke et al., Cancer Cell 2007)、我々の結果も併せると、PSCA は膵発癌過程において、早期から進行時期にわたり高発現し、膵癌の進展に寄与していることが示唆される。一方で、PSCA の機能的解析は進んでいないものの、膵癌の特異的抗原としてこれに中和抗体を投与する臨床試験が実際に進行中であり、膵癌の標準治療薬 gemcitabine 単独に比べ、gemcitabine + PSCA 中和抗体 AGS-1C4D4 の6カ月生存期間が有意に高かったことが2011年の世界消化器癌会議にてスペインのグループから報告された。

2. 研究の目的

上記のように PSCA は、膵癌の発癌過程において早期から進行期までを通じ高発現していると考えられ、膵癌の発癌機序の根幹にかかわっている可能性があると共に、治療標的であり、かつ早期診断にも用いることが出来る可能性がある。本研究では、この PSCA という分子の膵癌細胞における機能解析を行うことを目的とした。発現パターンの相違から、膵癌における PSCA の機能は、スキルス胃癌でのそれとは全く異なることが示唆される。ヒト及びマウスの膵癌細胞において PSCA の発現をノックダウンし、一方でマウス PanIN 細胞においては PSCA の恒常発現株を作製し、PSCA 発現の変化による主要な細胞内シグナル伝達系の変化、また細胞生物学的な表現型の変化（増殖能等）を検討することにより、PSCA の機能に対する知見を得、PSCA 発現に伴う膵癌の発癌進展メカニズムの理解を得ようと試みた。

3. 研究の方法

我々の樹立した膵発癌マウス（膵臓特異的 Kras 活性化 + Tgfr2 ノックアウト、遺伝子型 Ptf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tgfr2^{flox/flox}）は、ヒト膵癌の組織像をよく近似し、一方 Ptf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+} というマウス（膵臓特異的 Kras 活性化）は前癌病変 PanIN に留まるモデルとなる。それぞれから分離した膵癌細胞と PanIN 細胞の遺伝子発現プロファイルの変化から、膵癌細胞で特異的に発現が増強している分子 PSCA に着目し、この分子の機能解析を行う。

(1) PSCA を膵癌細胞においてノックダウン、恒常発現し、in vitro、in vivo における細胞の表現型の相違を検討する。

(2) PSCA の惹起する細胞内の主要なシグナル伝達系への影響を解析する。

4. 研究成果

(1)-1 Kras 活性化 + Tgfr2 ノックアウトのマウス膵癌組織から樹立した膵癌細胞株 K375, K389, K257, K688, K399 と Kras 活性化マウスの前癌病変 PanIN 組織から樹立した PanIN 細胞株 K512, K518 において定量 RT-PCR を行い、膵癌細胞株で有意に PSCA が高発現していることを確認した。また複数のヒト膵癌細胞株における PSCA 発現を定量 RT-PCR にて検討し、SU8686, Capan-1, CFPAC-1, BxPC-3 ではこの順に高発現を示し、KP-4, MIAPaca-2, Panc-1 では低発現であることが確認された。

(1)-2 PSCA を高発現しているヒト膵癌細胞株 SU8686, CFPAC-1 の PSCA を恒常的にノックダウンした細胞株を作成した。ノックダウン細胞株では、in vitro における細胞増殖が著明に抑制された。劇的な細胞増殖抑制の結果から、PSCA の機能的な重要性が示唆

された。

(1)-3 これと並行して PSCA 発現ベクターをデザインし、ノックダウン株に強制発現したが、細胞増殖の抑制は十分には回復されなかった。これはウイルスベクターによる PSCA 発現量が不十分であったことが考えられた。

(1)-4 最もノックダウン効率の高い SU8686 株（88%ノックダウン）では細胞が継代できず死んでしまうため、テトラサイクリン誘導性に PSCA ノックダウンを誘導する系を用い SU8686 の PSCA ノックダウン誘導株を樹立した。対照株として GFP ノックダウンベクターを組み込んだ細胞も樹立した。実際にテトラサイクリンを添加しノックダウンを誘導すると PSCA ノックダウン誘導株では、増殖抑制と細胞死が生じ、フローサイトメトリーにてアポトーシスが增加していることが確認された。Sub-G1 population は 10.1% から 37.7% に増加した。一方対照群の GFP ノックダウンベクター導入株もテトラサイクリン添加により細胞増殖の抑制がみられ、対照群としては不適当な結果であった。

(1)-5 SU8686/PSCA 恒常的ノックダウン細胞は、増殖抑制が劇的でありアポトーシスを生じるため、in vitro の migration assay など他の表現型の評価が困難であった。

(1)-6 マウス膵癌細胞株 K375 にてテトラサイクリン誘導性 PSCA ノックダウン株を樹立した。この細胞では、テトラサイクリン添加により PSCA は 29% までノックダウンされたが、in vitro の細胞増殖および migration には有意な変化がみられなかった。

(1)-7 C57BL/6 マウスにおける in vivo での腫瘍増殖・進展を検討しようとしたが、皮下移植および尾静脈投与肺転移モデル、脾注肝転移モデルとも生着せず評価不能であった。（将来的に PSCA 中和抗体を用いて免疫系を介した抗腫瘍効果を検討することを念頭に、ヌードマウスではなく免疫系正常のマウスを用いた。）

(2)-1 この経過中 PSCA ノックダウン細胞（恒常的およびテトラサイクリン誘導性）における MAPK, PI3K, STAT3 シグナルの変化を Western blot にて検討したが、有意な変化は見られなかった。

(2)-2 膵癌マウスモデルにおいて、Tgfr2 がノックアウトされることにより前癌病変から進行癌へと急激に進行し、かつ PSCA 発現も増強しているため、TGF-beta シグナルと PSCA 発現との関係について検討した。Panc-1 細胞における SMAD4 ノックダウン株と対照株での PSCA 発現を定量 RT-PCR で比較したところ、SMAD4 ノックダウン株で PSCA の発現レベルがやや高い傾向があった。両細胞株を TGF-beta で刺激したところ、対照株で TGF-beta 刺激により PSCA 発現が低下する傾向であった。いずれも TGF-beta シグナルの喪失による PSCA 発現増強という発癌マウスの経過と一致する結

果ではあったが、統計学的有意差は得られなかった。

以上から、膵癌において PSCA は進行癌では前癌病変よりも有意に発現が増強していることが確認され、そのノックダウンにより劇的に細胞増殖が抑制され細胞死が誘導されたことから、腫瘍促進的に作用しており、そのインパクトが大きいことが示唆された。しかし、PSCA が惹起する細胞内シグナル伝達の変化についてはまだ不明瞭であり、in vivo での機能についても評価できていない。

その一因として、ヒト PSCA には transcript variant (TV) 1, 2 が存在し、TV2 が non-coding RNA として TV1 の decoy として作用している可能性があること、またマウス PSCA 蛋白を評価できる抗体が得られなかったことなどが挙げられる。

しかしながら、PSCA は中和抗体による治療が検討されていることもあり、膵癌の病態解明および実臨床への応用という点で非常に有力な標的分子であると考えられ、今後より一歩踏み込んだ検討を行っていくべきものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

伊地知秀明, マウスモデルから臨床を見据えた膵癌基礎研究の展開, 日本消化器病学会雑誌, 査読有, 111 巻, 2014, 1561-1569

〔学会発表〕(計 1 件)

Ijichi H, Pancreatic cancer and the tumor microenvironment by using genetically-engineered mice, International Pancreatic Research Forum 2013, Sendai

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

http://gastro.m.u-tokyo.ac.jp/about/research03_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊地知 秀明 (IJICHI, Hideaki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70463841

(2) 研究分担者

伊佐山 浩通 (ISAYAMA, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 70376458