

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20813

研究課題名（和文）Secretoglobin (SCGB) 3A2による抗腫瘍作用の機序の解明

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of anti-tumor activity by Secretoglobin (SCGB) 3A2.

研究代表者

中山 瞬 (Nakayama, Shun)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：30968110

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：膵癌CAFにおいてSCGB3A2がIFNARを介する経路でSTAT1の活性化を誘導するという仮説をたて、これを検証することとした。膵癌手術検体5例からのCAFの分離培養を行い細胞株を樹立し、不死化を行った。患者由来CAFにおいてshRNAを用いてIFNAR1ノックダウン細胞株を作成した。NOGマウスに患者由来CAFを膵癌細胞株(AsPC-1)と共に同所移植するOrthotopic xenograft modelを作成した。現在SCGB3A2蛋白の生成を進めており、これらのノックダウンモデルとマウスモデルに投与することで、SCGB3A2の抗腫瘍作用とIFNARの関連を検証する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内で肺発生における成長因子様作用、肺線維症における抗線維化作用、アレルギー性気道炎症に対する抗炎症作用など多彩な作用をもつサイトカイン様蛋白Secretoglobin (SCGB) 3A2は主に肺に特異的に発現する蛋白であり、肺腺癌においては抗腫瘍作用を有することが確認されているが、その機序については明らかになってはいない。

本研究は、消化器癌で最も難治性である膵癌において特に癌微小環境におけるSCGB3A2の作用を解明することで、新規治療薬として利用できる可能性を検証する足がかりとなった。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that SCGB3A2 induces STAT1 activation in pancreatic cancer CAFs via an IFNAR-mediated pathway. We established cell lines by isolation and culture of CAFs from 5 pancreatic cancer surgical specimens and immortalized them. We generated IFNAR1 knockdown cell lines using shRNA in patient-derived CAFs and created an orthotopic xenograft model in which patient-derived CAFs were transplanted orthotopically with a pancreatic cancer cell line (AsPC-1) in NOG mice. We are currently in the process of generating SCGB3A2 protein, which will be administered to these knockdown and mouse models to verify the association between the anti-tumor effects of SCGB3A2 and IFNAR.

研究分野：Cancer research

キーワード：pancreatic cancer CAFs SCGB3A2

1. 研究開始当初の背景

生体内で肺発生における成長因子様作用、肺線維症における抗線維化作用、アレルギー性気道炎症に対する抗炎症作用など多彩な作用をもつサイトカイン様蛋白 Secretoglobin (SCGB) 3A2 は主に肺に特異的に発現する蛋白であり、肺腺癌においては抗腫瘍作用を有することが確認されているが、その機序については明らかになってはいない。

2. 研究の目的

本研究では、消化器癌で最も難治性である膵癌において SCGB3A2 の作用を検証し、特に上皮間葉転換および癌微小環境における作用を解明することを目的としている。SCGB3A2 の抗腫瘍作用についてはこれまで報告はなく、その受容体を含めた作用機序が明らかになれば、新規治療薬として期待できる。当初は、膵癌細胞と CAF において SCGB3A2 が抗腫瘍作用を示すかを明らかにし、その機序を解明することを目的としていたが、実際には十分量の SCGB3A2 蛋白の合成及び精製に難航し、また、共同研究者からの SCGB3A2 抗体の入手が国際輸送の手配の不備等により大幅に遅れたことから、当初の計画を多少変更する必要性が生じた。

我々のグループはこれまでにマウス肺線維芽細胞において、SCGB3A2 は未知の経路で STAT1 を活性化することで、SMAD2/3 を介して TGF- β シグナルを抑制することを明らかにしている。STAT1 の活性化は、一般的には Interferon α/β Receptor (IFNAR) や Interferon γ Receptor (IFNGR) を介して誘導されるが、我々の過去の実験結果からはすでに IFNGR を介する経路は否定されている。一方 IFNAR を介する経路についてはこれまで検討されていない。また、膵癌においてはその下流にあたる SMAD2/3/4 の遺伝子変異が 50%程度の高頻度で報告されており膵癌細胞自体に対する SCGB3A2 の効果は限定的となる可能性があり、今回我々は癌関連線維芽細胞 (CAF) が治療のターゲットとなりえると考え、注目した。以上より、膵癌 CAF において SCGB3A2 が IFNAR を介する経路で STAT1 の活性化を誘導するという仮説をたて、これを検証することとした。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵癌手術検体からの CAF の分離

5 例の膵癌手術検体から得られた CAF と正常線維芽細胞を outgrowth 法により初代培養し、Lenti/SV40 virus を用いて SV40T 抗原を遺伝子導入して不死化を行った。コントロールとして膵癌細胞株 (AsPC-1) と膵星細胞株 (PSC) を用いて、RT-qPCR により膵癌患者由来 CAF のマーカーの発現を確認した。

(2) 膵癌患者由来 CAF 細胞株におけるインターフェロン投与による STAT1 活性化

CAF に Recombinant IFN α 2 (10ng/ml) を投与し、STAT1 の活性化を p-STAT1 の Western blotting で確認した。

(3) shRNA を用いた IFNAR の knock down

2 種類の shRNA を用いて IFNAR1 を knock down した CAF 細胞株を作成した。

(4) 患者由来 CAF を用いた Orthotopic xenograft model の作成

8 から 13 週齢のオスの NOG マウスの脾臓に、 1×10^5 個の AsPC-1 もしくは CAF 細胞を Matrigel とともに計 10ml となるように調整して注入することで同所移植し、投与後 28 日の腫瘍を採取した。

(5) SCGB3A2 蛋白、SCGB3A2 マウスモノクローナル抗体の作成

再構成型無細胞タンパク質合成システム(PUREfrex)を用いて、SCGB3A2 蛋白の合成を行った。すでに作成済みの SCGB3A2 のマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを米国の共同研究者より入手し、それを用いて抗体を精製した。

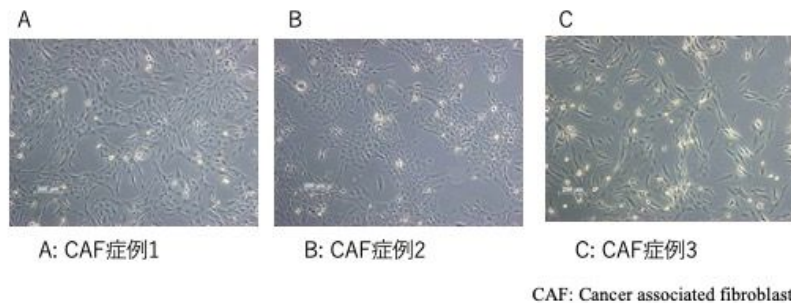
(6) 脾癌手術検体を用いた免疫組織学的検討

脾癌手術検体（約 100 例）を用いて CAF マーカー（ α SMA など）、IFNAR、SMAD4、TGF- β 、EMT マーカーなどの免疫染色を行い癌細胞および間質での発現を評価し、臨床病理学的検討を行う。

4．研究成果

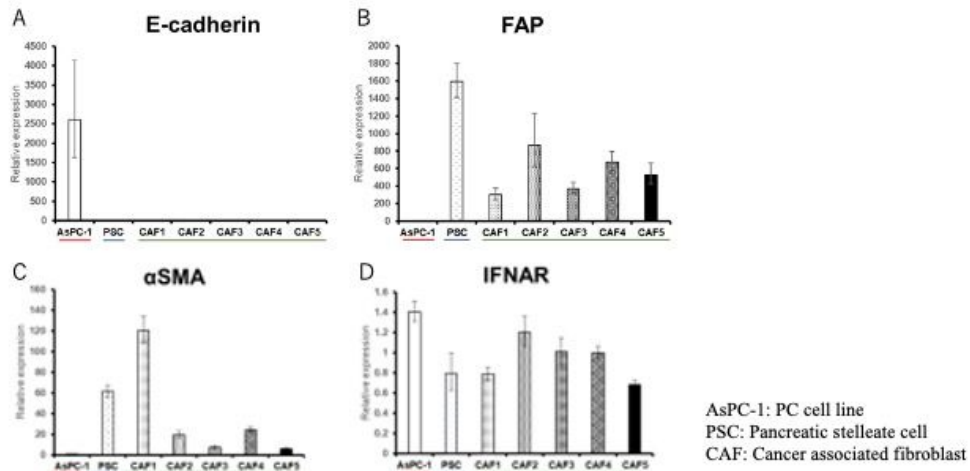
脾癌手術検体 5 例からの CAF の分離培養を行い細胞株を樹立し、SV40T 抗原を遺伝子導入し、不死化を行った(図 1)。

図1:脾癌患者由来CAF細胞株の顕微鏡写真



それぞれの脾癌患者由来 CAF において上皮マーカー(E-cadherin)の発現がないこと、CAF マーカー(FAP、 α SMA)、IFNAR の発現を確認した(図 2)。

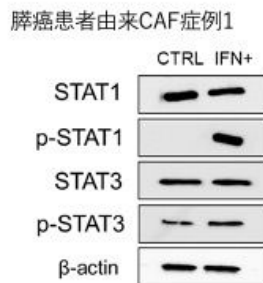
図2: 膵癌細胞株(AsPC-1)と膵星細胞株(PSC)、膵癌患者由来CAF細胞株(5症例)における各マーカーの発現 (RT-qPCR)



膵癌患者由来CAF細胞株(5症例)において、A: 上皮マーカー(E-cadherin)の発現がないこと、および、B,C: CAFマーカー(FAP、αSMA)、D: IFNARの発現を確認した。

CAF に IFN を投与して、p-STAT1 が誘導されることを確認した(図 3)。また、CAF において shRNA を用いて IFNAR1 のノックダウンを行い、mRNA 発現の低下を確認した(図 4)。

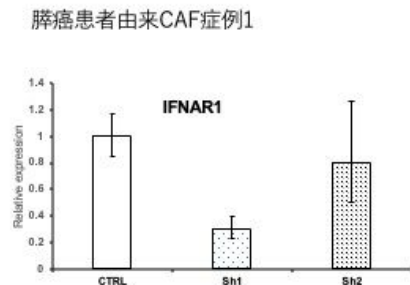
図3: インターフェロン投与によるSTAT1活性化(Western blotting)



CTRL: control

膵癌患者由来CAF症例1においてIFN投与でSTAT1の活性化を確認した

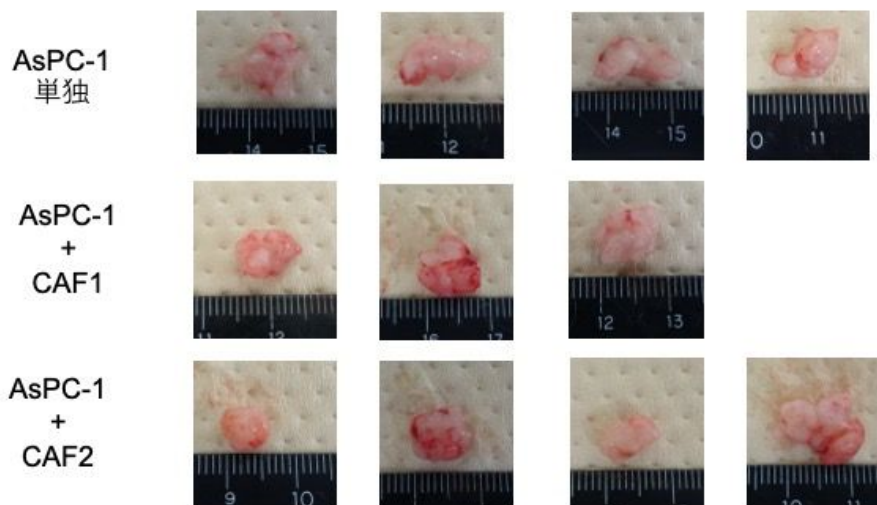
図4: IFNAR1 Knock down CAFの作成(RT-qPCR)



膵癌患者由来CAF症例1において2種類のshRNAを用いてIFNAR1のノックダウンを行い、mRNA発現の低下を確認した

CAF を NOG マウスの膵臓に膵癌細胞株(AsPC-1)と共に同所移植したところ、腫瘍の形成を認めた(図 5)。CAF を共に移植することで、AsPC-1 単独と比べて腫瘍の増大傾向を認めたが、容量や重量に有意な差は得られなかった。

図5: 膵癌細胞株と膵癌患者由来CAF細胞株の同所移植モデルの作成 (摘出した腫瘍の写真)



NOGマウスの膵臓に膵癌患者由来CAFを膵癌細胞株(AsPC-1)と共に同所移植した。
腫瘍の容量や重量には有意な差は認めなかった。

また、SCGB3A2 マウスモノクローナル抗体の精製を行った。

現在、膵癌手術検体を用いた免疫組織化学を行っている途中である。さらに SCGB3A2 蛋白の生成を進めており、今後、十分量の SCGB3A2 蛋白が得られたら、これらのノックダウンモデルとマウスモデルに投与することで、SCGB3A2 の抗腫瘍作用と IFNAR の関連を検証する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------