

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19911

研究課題名(和文) 膵臓癌に対するIMiDsの癌抑制機構の解明および新規治療法の開発

研究課題名(英文) IMiDs enhanced the anti-tumor of chemotherapeutic agent on pancreatic cancer

研究代表者

春木 孝一郎 (Haruki, Koichiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60720894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：切除不能・再発膵臓癌に対する化学療法には、gemcitabine/nab-paclitaxel、FOLFIRINOXなどが現在推奨されている。しかし、抗癌剤自体が炎症性転写因子である nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)を活性化するため、効果が減弱される。我々は、thalidomideが消化器癌において NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することから、その誘導体である第三世代 IMiDsの pomalidomideを抗癌剤と併用し抗腫瘍効果が増強することを確認した。また、pomalidomideの膵臓癌細胞に対するアポトーシス誘導、細胞周期停止、血管新生抑制効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：Anticancer drug-induced nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) attenuates chemosensitivity. Gemcitabine and nab-paclitaxel is recommended for unresectable pancreatic cancer, however, the median survival time is only 8.5 months. Thalidomide suppresses NF- $\kappa$ B activation in digestive cancer, therefore, we hypothesized that pomalidomide, a third generation of IMiDs, also improve chemoresistance on pancreatic cancer cells. For both in vitro and in vivo, pomalidomide enhanced the antitumor effects of gemcitabine/nab-paclitaxel and gemcitabine/S-1. Especially, to the best of our knowledge, current study firstly demonstrated that pomalidomide enhanced p53 on pancreatic cancer cells. Pomalidomide also induced apoptosis, cell cycle arrest, and anti-angiogenesis on pancreatic cancer. This new regimen would be a new therapeutic approach.

研究分野：消化器外科学

キーワード：IMiDs 膵臓癌 NF- $\kappa$ B gemcitabine nab-paclitaxel アポトーシス 細胞周期停止 血管新生抑制

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は最も予後不良な消化器癌の一つである。近年、非切除例に対する塩酸ゲムシタビン/ナブパクリタキセル療法が従来療法と比して奏効率および生存期間が延長し注目されている。しかし生存期間中央値は8.5 か月と依然として予後不良であり新たな治療法の開発が待たれる。治療抵抗性の原因として抗癌剤による NF- $\kappa$ B の活性化が挙げられる。NF- $\kappa$ B は種々の癌細胞で増殖やアポトーシス抑制、抗癌剤耐性に働くという報告があり抗癌剤によっても活性化される。そのため NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することは抗癌剤抵抗性を改善すると考えられる。一方、ポマリドミドはサリドマイド誘導体の新規免疫調節薬であり、多発性骨髄腫において血管新生阻害作用やアポトーシス誘導作用が報告されている。サリドマイドは消化器癌において NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する働きがあり、ポマリドミドにも同様の作用が期待される。

### 2. 研究の目的

膵臓癌細胞に対して化学療法にポマリドミドを併用して抗腫瘍効果の増強作用を検討する。

### 3. 研究の方法

*In vitro* においては、ヒト膵臓癌細胞株 PANC-1 と MIA PaCa-2 を使い、コントロール群 (C 群)、ポマリドミド単剤 (P 群)、塩酸ゲムシタビンとナブパクリタキセルの2剤併用群 (GN 群)、塩酸ゲムシタビンとナブパクリタキセルにポマリドミドを併用した3剤併用群 (GNP 群) の4群に割り付け、NF- $\kappa$ B の活性化程度、アポトーシス、細胞増殖抑制効果などを種々のアッセイで確認した。*In vivo* では、PANC-1 を nude mouse の膵臓に接種し異種同所性膵臓癌モデルマウスを作製した。接種後4週で *in vitro* と同様の4群に割り付け、5週間治療を行った。MRI にて毎週腫瘍径を評価した。

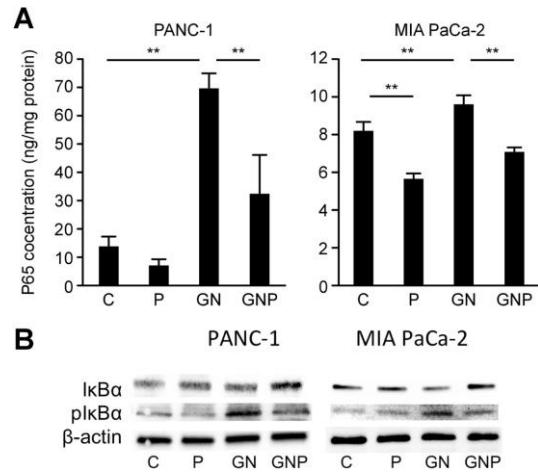
### 4. 研究成果

#### (1) *in vitro* における、ポマリドミドの NF- $\kappa$ B 活性化抑制作用

ヒト膵臓癌細胞株において NF- $\kappa$ B 活性を評価するため、核内抽出液における p65 の活性を ELISA 法を用いて調べた。また、膵臓癌細胞における I $\kappa$ B $\alpha$  の発現の程度をウエスタンブロット法にて評価した。PANC-1 と MIA PaCa-2 の NF- $\kappa$ B (p65) の活性は、塩酸ゲムシタビン/ナブパクリタキセル群 (GN 群) において有意にコントロール群 (C 群) よりも上昇しており ( $p < 0.01$ )、一方塩酸ゲムシタビン/ナブパクリタキセル/ポマリドミド併用群 (GNP 群) では有意に GN 群よりも抑制されていた ( $p < 0.01$ )。MIA PaCa-2 においては、NF- $\kappa$ B (p65) の活性は、ポマリドミド単剤 (P 群) においても C 群よりも抑制された

( $p < 0.01$ , Figure 1A)。核内 NF- $\kappa$ B 活性の程度と同様に、PANC-1 と MIA PaCa-2 とともに I $\kappa$ B $\alpha$  の発現は P 群で C 群よりも増加し、一方でリン酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  の発現は GNP 群で GN 群よりも低下していた (Figure 1B)。

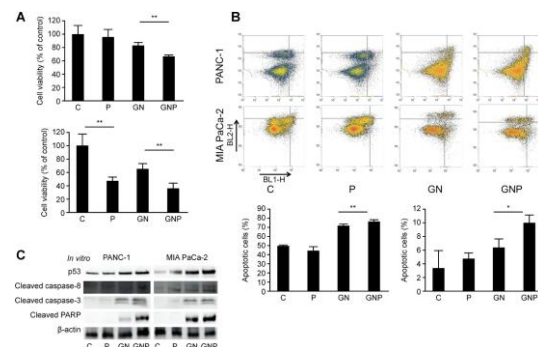
Figure 1



#### (2) ポマリドミドの抗腫瘍効果とアポトーシス誘導作用

ヒト膵臓癌における抗腫瘍効果を評価するため、細胞増殖の程度とアポトーシス細胞を調べた。MTT アッセイにて、MIA PaCa-2 の細胞生存率は、ポマリドミド単剤においても有意に抑制された ( $46.9 \pm 6.2\%$  vs.  $100 \pm 17.0\%$ ,  $p < 0.01$ )。PANC-1 と MIA PaCa-2 両者において、GNP 群では GN 群よりも細胞増殖が抑制された (PANC-1,  $67.0 \pm 1.6\%$  vs.  $83.2 \pm 4.3\%$ ,  $p < 0.01$ ; MIA PaCa-2,  $35.5 \pm 8.3\%$  vs.  $64.8 \pm 7.9\%$ ,  $p < 0.01$ , Figure 2A)。アネキシンアッセイにて、GNP 群では GN 群よりも有意にアポトーシス細胞が増加していることが示された (PANC-1,  $77.1 \pm 0.9\%$  vs.  $72.0 \pm 1.3\%$ ,  $p < 0.01$ ; MIA PaCa-2,  $10.0 \pm 1.1\%$  vs.  $6.44 \pm 1.2\%$ ,  $p < 0.05$ , Figure 2B)。アポトーシスに関連する各種シグナルをウエスタンブロットにて確認したところ、p53、cleaved caspase-8、-3、そして cleaved PARP いずれにおいても GNP 群で GN 群よりも発現が増加していた (Figure 2C)。

Figure 2



(3) *in vivo*における検討

*in vivo*における腫瘍増殖は、GNP 群で GN 群よりも緩徐であった (Figure 3A)。摘出腫瘍の重量と体積はどちらも、GNP 群で GN 群よりも有意に減少した (重量,  $385.3 \pm 88.2$  mg vs.  $538.6 \pm 36.2$  mg,  $p < 0.05$ ; 体積,  $0.36 \pm 0.02$  cm<sup>3</sup> vs.  $0.76 \pm 0.04$  cm<sup>3</sup>,  $p < 0.01$ , 各  $n=4$ , Figure 3B)。一方で、各群で治療期間中の体重変化を認めなかった (Figure 3C)。GNP 群では、摘出腫瘍の Ki-67 陽性細胞数は、GN 群よりも有意に減少していた ( $40.7 \pm 3.2\%$  vs.  $63.3 \pm 7.7\%$ ,  $p < 0.01$ )。加えて、P 群では C 群よりも有意に Ki-67 陽性細胞数が減少していた ( $67.1 \pm 2.4\%$  vs.  $74.8 \pm 3.8\%$ ,  $p < 0.05$ , Figure 3D)。摘出腫瘍の TUNEL 染色において、GNP 群のアポトーシス細胞の数は、GN 群よりも有意に増加していた ( $107 \pm 2.6$  vs.  $63.0 \pm 1.0$ ,  $p < 0.01$ , Figure 3E)。摘出腫瘍の核内 NF- $\kappa$ B 活性を ELISA 法にて、I $\kappa$ B $\alpha$  発現をウエスタンブロット法にて調べた。NF- $\kappa$ B (p65) 活性は、GN 群で C 群よりも有意に上昇していた ( $p < 0.05$ ) が、GNP 群では GN 群で有意に低下していた ( $p < 0.05$ , Figure 4A)。NF- $\kappa$ B 活性の変化と同様に、I $\kappa$ B $\alpha$  発現の程度は P 群で C 群よりも上昇しており、一方でリン酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  の発現は GNP 群で GN 群よりも低下していた (Figure 4B)。アポトーシス関連タンパクに関しても、*in vitro*と同様に、p53、cleaved caspase-8、-3、ならびに cleaved PARP の発現が GNP 群で GN 群よりも増加していた (Figure 4C)。

Figure 3

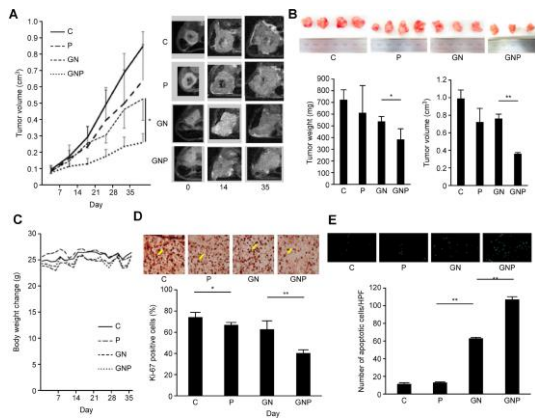
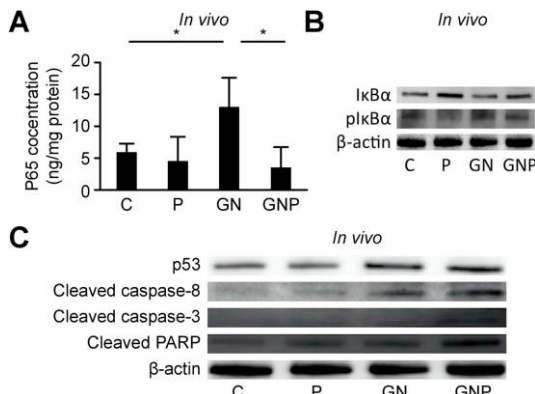


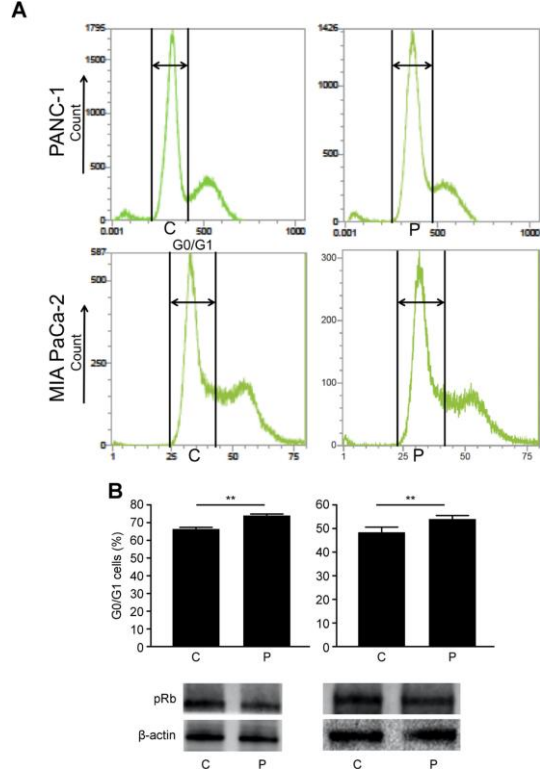
Figure 4



(4) G0/G1 期における細胞周期停止効果

膵臓癌細胞に対するポマリドミドの細胞周期停止効果を確認するため、フローサイトメトリーを使用して G0/G1 期の細胞の割合を調べた。P 群では C 群よりも G0/G1 期の細胞の割合が有意に増加していた (PANC-1,  $74.0 \pm 1.0\%$  vs.  $66.3 \pm 1.0\%$ ,  $p < 0.01$ ; MIA PaCa-2,  $54.2 \pm 1.4\%$  vs.  $48.6 \pm 2.2\%$ ,  $p < 0.01$ , Figure 5A)。加えて、細胞周期の進行に参与するリン酸化 Rb (Ser 780) の発現は、P 群では C 群よりも PANC-1 と MIA PaCa-2 両者において低下していた (Figure 5B)。本実験では、塩酸ゲムシタピンもナブパクリタキセルもそれぞれ細胞周期を停止する効果があることから、ポマリドミド単剤のコントロール群に対する評価を行った。

Figure 5

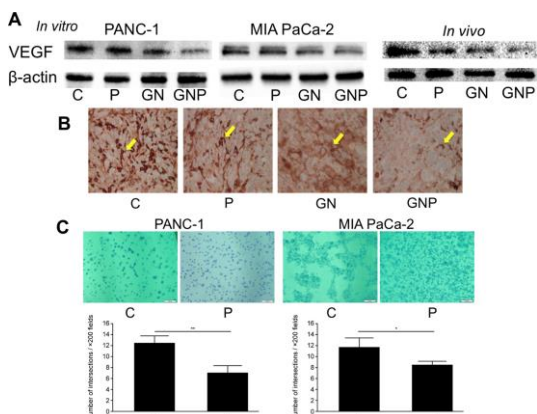


(5) 膵臓癌細胞に対するポマリドミドの血管新生抑制効果について

ポマリドミドの血管新生抑制効果を、VEGF の発現量をウエスタンブロットにて確認した。*In vitro* と *in vivo* 両者において、GNP 群では GN 群よりも VEGF の発現量が低下していた (Figure 6A)。*in vivo* 検体の VEGF 染色では、GNP 群では GN 群よりも VEGF 陽性細胞の数が少ないことが確認された (Figure 6B)。血管新生アッセイにより細胞の結合能を評価したところ、P 群では C 群よりも有意に細胞の結合能が低下していることが確認された (PANC-1,  $7.1 \pm 1.3$  vs.  $12.5 \pm 1.3$ ,  $p < 0.01$ ; MIA PaCa-2,  $8.4 \pm 0.6$  vs.  $11.8 \pm 1.6$ ,  $p < 0.05$ , Figure 6C)。本実験も、GN 群と GNP 群を比較するには適していないため、

ポマリドミド単剤のコントロールに対する効果を比較した。

Figure 6



## 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 3 件)

① Shirai Y, Saito N, Uwagawa T, Shiba H, Horiuchi T, Iwase R, Haruki K, Ohashi T, Yanaga K. Pomalidomide promotes chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of NF- $\kappa$ B. *Oncotarget*. 2018; 9(20): 15292-15301.

DOI: 10.18632/oncotarget.24577. 査読有.

② Saito N, Shirai Y, Uwagawa T, Horiuchi T, Sugano H, Haruki K, Shiba H, Ohashi T, Yanaga K. Pomalidomide enhanced gemcitabine and nab-paclitaxel on pancreatic cancer both in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2018; 9(21): 15780-15791.

DOI: 10.18632/oncotarget.24608. 査読有.

③ Haruki K, Shiba H, Shimada Y, Shirai Y, Iwase R, Fujiwara Y, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity plays a key role in the antitumor effect of nafamostat mesilate in pancreatic cancer cell. *Ann Gastroenterol Surg*. 2018; 2(1): 65-71.

DOI: 10.1002/ags3.12025. 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

① 齊藤庸博, 矢永勝彦, 白井祥睦, 菅野宏, 堀内 堯, 春木孝一郎, 柴 浩明, 宇和川 匡, 大橋十也, 大木隆生. 免疫調節薬併用による塩酸ゲムシタピン/ナブパクリタキセル療法の膵臓癌に対する抗腫瘍効果の増強作用の検討. 第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年.

② 齊藤庸博, 白井祥睦, 菅野 宏, 堀内 堯, 春木孝一郎, 柴 浩明, 宇和川 匡, 大橋十也, 矢永勝彦. 免疫調節薬併用による塩酸ゲムシタピン/ナブパクリタキセル療法の膵臓癌に対する抗腫瘍効果の増強作用の検討. 第 71 回日本消化器外科学会総会, 2016 年.

③ 春木孝一郎, 嶋田洋太, 堀内 堯, 白井祥睦, 岩瀬亮太, 藤原佑樹, 古川賢英, 柴浩明, 宇和川匡, 三澤健之, 大橋十也, 矢永勝彦. 膵臓癌の PP2A による GSK3 活性制御がメシル酸ナファモスタットの抗腫瘍効果に及ぼす影響. 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 2016 年.

④ Saito N, Shirai Y, Horiuchi T, Sugano H, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Shiba H, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. Pomalidomide enhanced antitumor effect of gemcitabine and nab-paclitaxel for pancreatic cancer cells. 102th American College of Surgeons Annual Clinical Congress, 2016.

⑤ Saito N, Shirai Y, Horiuchi T, Sugano H, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Shiba H, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. Pomalidomide enhanced antitumor effects of gemcitabine and nab-paclitaxel in pancreatic cancer cells. 12th Annual Academic Surgical Congress, 2017.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

春木 孝一郎 (HARUKI, Koichiro)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60720894

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

齊藤 庸博 (SAITO, Nobuhiro)  
白井 祥睦 (SHIRAI, Yoshihiro)