

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10697

研究課題名(和文) K-ras/MMP-10シグナル伝達を標的とした抗癌剤耐性膵癌の新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel target therapy for K-ras/MMP-10 signaling pathway in chemotherapy-resistant pancreatic cancer

研究代表者

清水 一也 (Shimizu, Kazuya)

神戸大学・保健学研究科・保健学研究員

研究者番号：50335353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々が抗癌剤耐性の10人の膵癌患者から樹立したCD133陽性膵癌幹細胞(PCSC)を用いて癌遺伝子K-Ras/MMP-10シグナルの上流因子であるIntegrin-3とFGF-2、FGFR1と、下流因子のMMP-10に活性制御を受けるMMP-1の発現がGEMにより促進されることを明らかにした。マウスに移植したヒトPCSCが、PCSCを単離した患者と同じGEM耐性機能を示すことを明らかにした。さらに遠隔転移を伴った進行膵癌で血清MMP-10値が正常であれば化学療法を行えば予後が46.8ヶ月、MMP-10高値で予後が2ヶ月となり、血清MMP-10値がバイオマーカーになる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術・抗癌剤・放射線治療といった集学的治療の進歩にも関わらず、最新の膵癌の5年生存率は10%未満と依然として悪性腫瘍の中でもきわめて予後は悪い。抗癌剤は画期的な予後延長には程遠く、一旦奏効しても継続投与する間に大部分の臨床例で耐性を示す。我々は、抗癌剤耐性膵臓癌の治療法を開発する目的で、抗癌剤耐性になった膵癌患者より膵癌幹細胞(PCSC)を樹立し、マウスにそのPCSCを移植し得られた膵癌が抗癌剤耐性患者と同じ性状を有することを明らかにした。この系を用いることで抗癌剤耐性膵癌のバイオマーカーと新規治療薬のスクリーニングを開始することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：We established CD133-positive pancreatic cancer stem cell (PCSC) lines derived from 10 pancreatic cancer patients who resisted against chemotherapy. K-Ras/MMP-10 signaling pathway is enhanced by gemcitabine. In this study, we have clarified using the PCSC that gemcitabine enhances the expression of the upstream molecules of the K-Ras signaling pathway, Integrin-3, FGF-2 and FGFR1 and that of MMP-1 regulated by MMP-10. We also clarify that Xenograft of human PCSC in mice show the same gemcitabine-resistant mechanism as that of the patients from whom the PCSC was isolated. Furthermore, we find that the concentration of serum MMP-10 is related the prognosis of advanced pancreatic cancer with metastasis if chemotherapy is applied: normal levels of MMP-10, MST 46.8 months; abnormally high levels of MMP-10, 2 months.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 抗がん剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は癌死亡率の第4位にあり、早期診断が困難できわめて予後不良の疾患であり、発見時には多くの症例ですでに遠隔転移や癌性腹膜炎を伴っている。遠隔転移や癌性腹膜炎を伴った膵癌患者には Gemcitabine や多剤併用療法 FOLFIRINOX などの抗癌剤療法が行われているが、5年生存率は0%である。また遠隔転移がなく根治手術を行った場合でも5年生存率は20%には及ばない。このように外科的治療、化学療法、放射線療法による集学的治療の進歩にも関わらず死亡率や死亡数は増加傾向にあり、病因解明や新しい治療法の開発が急務である。

最近、正常組織と同様に癌組織にも幹細胞の存在が報告されており、上皮系・非上皮系を問わず、様々な癌組織の幹細胞が同定されつつあり、癌幹細胞を標的とした新たな治療法開発が注視されている。これまでに、我々は正常の膵幹細胞を同定しこの膵幹細胞が幹細胞マーカーである CD133 を発現していることを明らかにした<sup>[1]</sup>。また、悪性度の高いヒト膵管状腺癌が幹細胞マーカー (CD133) を発現する一方、低悪性度の膵管内乳頭粘液性腫瘍が CD133 を発現しないことも明らかにした<sup>[2]</sup>。さらに、低酸素状態では hypoxia-inducible factor-1 依存性にヒト膵癌細胞が幹細胞様性質を獲得することで浸潤・転移能を増強することも明らかにした<sup>[3]</sup>。一方、我々は Gemcitabine に耐性をもつ進行膵癌患者の肝転移巣と癌性腹水、癌性胸水から CD133 陽性膵癌幹細胞株を10種類以上樹立する実験系の開発に成功し、この膵癌幹細胞が細胞外マトリックスを再構築して基底膜成分の細胞外マトリックスを増生することで自己複製能を獲得すること<sup>[4]</sup>、Gemcitabine によるヒストンアセチル化を介して K-Ras<sup>Val</sup>/MEK シグナル伝達機構を活性化して MMP-10 の発現を促進することを明らかにした<sup>[5]</sup>。さらに、CD133 陽性マウス膵幹細胞に CK4 と、p53 変異体、K-Ras<sup>Val</sup> を恒常的に発現させたマウス人工膵癌の作成に成功しており、この人工膵癌が Gemcitabine 耐性化で Gemcitabine 耐性ヒト膵癌幹細胞と同様に MMP-10 を発現することを明らかにしている (未発表データ)。

[1] Hori Y, Fukumoto M, Kuroda Y. Enrichment of putative pancreatic progenitor cells from mice by sorting for prominin1 (CD133) and PDGFR- Stem Cells. 26:2912-2920, 2008.

[2] Shimizu K, Itoh T, Shimizu M, Ku Y, Hori Y. CD133 expression pattern distinguishes intraductal papillary mucinous neoplasms from ductal adenocarcinomas of the pancreas. Pancreas 38:e207-e214, 2009.

[3] Hashimoto O, Shimizu K, Hori Y. Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner in pancreatic cancer cells. *Pathobiology* 78:181-192,2011.

[4] Shimizu K, Chiba S, Hori Y. Identification of a novel subpopulation of tumor-initiating cells from gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma patients. PLoS One. 21;8:e81283,2013.

[5] Shimizu K, Nishiyama T, Hori Y. Gemcitabine enhances Kras-MEK-induced matrix metalloproteinase-10 expression via histone acetylation in gemcitabine-resistant pancreatic tumor-initiating cells. Pancreas 46:268-275,2018.

## 2. 研究の目的

本研究ではヒト膵癌幹細胞株が Gemcitabine 耐性獲得により獲得した K-Ras<sup>Val</sup>/MEK/MMP-10 シグナル伝達機構を標的とした新規治療薬とバイオマーカーの開発を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では今回、我々が樹立した Gemcitabine 耐性ヒト膵癌幹細胞とマウス人工膵癌を用いて Gemcitabine により活性化される K-Ras<sup>Val</sup>/MEK/MMP-10 シグナル伝達機構を標的にした新規治療薬の開発と Gemcitabine 耐性を予測するバイオマーカーの開発を行う。その方法は、Gemcitabine 耐性マウス人工膵癌由来膵癌幹細胞株における K-Ras<sup>Val</sup>/MEK/MMP-10 シグナル伝達機構の解析、Gemcitabine 耐性マウス人工膵癌阻害薬の同定、マウス人工膵癌由来膵癌幹細胞株が Gemcitabine 耐性獲得により分泌するエクソソームの同定、Gemcitabine 耐性予測因子の同定である。

### 4. 研究成果

#### (1) Gemcitabine 耐性マウス人工膵癌の樹立

我々はこれまでに、マウス組織幹細胞に GFP、変異型 KRASG12D、変異型 p53、cyclin dependent kinase 4 を遺伝子導入してマウス人工膵癌細胞を作成している。この細胞は腫瘍形成能・転移能・抗がん剤感受性など様々な点で、臨床で遭遇するヒト膵癌組織と類似している(未発表データ)。初年度、この細胞をマウスに移植し、in vivo で腫瘍形成させたのちに GEM を長期投与して、一旦腫瘍が縮小効果を示したのちに再度増大傾向を示した腫瘍から GEM 耐性マウス人工膵癌細胞を樹立した。この耐性株は、in vitro でも in vivo でも親株と比較して明らかに GEM 耐性であることを確認した。さらに、親株と GEM 耐性マウス人工膵癌細胞を網羅的に解析するためマイクロアレイ解析を行った。しかし、当初、ヒト膵癌幹細胞からの類推で予想された MMP-10 の遺伝子発現やタンパク発現の明らかな増強を認めなかった。これらの結果から、変異型 KRASG12D を強制発現するマウス人工膵癌細胞が GEM に耐性能を獲得した場合は、GEM 耐性ヒト膵癌幹細胞と同様な K-Ras<sup>Val</sup>/MEK/MMP-10 シグナル伝達経路が活性化されないと考えた。そのため、GEM 耐性膵癌幹細胞の新規治療薬として、GEM 耐性マウス人工膵癌細胞を使用して、MEK 阻害剤とヒストンアセチル化阻害剤による KRas<sup>Val</sup>/MEK/MMP-10 シグナル伝達経路の阻害効果の評価は行わなかった。

#### (2) GEM 耐性予測因子の同定

マウス人工膵癌細胞親株と GEM 耐性マウス人工膵癌細胞の in vitro や in vivo における周囲間質のラミニンとコラーゲン IV の発現を免疫染色やリアルタイム PCR 法で測定したところ、GEM 耐性マウス人工膵癌細胞において発現の亢進を認めた。この結果よりコラーゲン IV が予後不良因子であることが推定された。この結果に基づき、手術不適切進行膵癌(膵癌取り扱い規約第7版[2016年])の患者8人を登録しコラーゲン IV 値(IV型コラーゲン・7S)とその予後について検討を行った。その結果、血清コラーゲン IV 値が高値である場合、抗癌剤投与を行っても正常値の患者と比較して予後の短縮が認められた(図1)。今後対象患者を広げて、臨床の場で抗癌剤の予後因子として使用できるか評価していくことが必要と考えた。さらに MMP-10 の血中濃度を測定できた肝転移か腹膜播種の合併が確認できた進行膵癌患者5症例を3年間追跡した。その結果、MMP-10 の血中濃度が正常範囲内であれば化学療法を行うことで予後が 46.8 ヶ月、MMP-10 が高値なら 2 ヶ月であることが明らかとなった。今後症例の積み重ねが必要であるが、血清 MMP-10 値もバイオマーカーになる可能性を明らかにした。

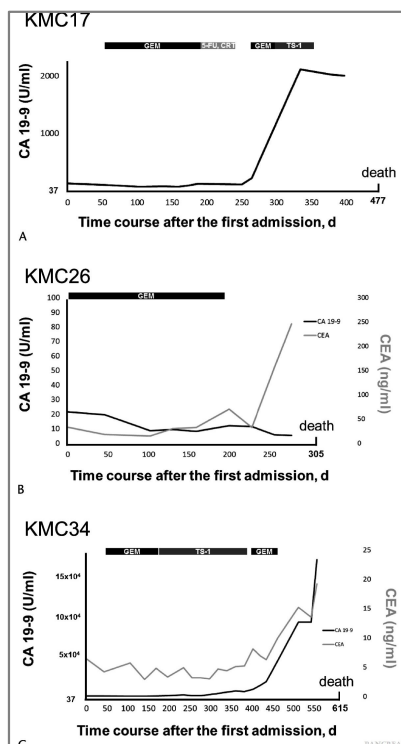
	年齢	性別	IV型コラーゲン	病期	生存期間(月)
1	77	F	5.9	Stage IVb	10

2	74	F	6.2	Stage IVa	2
3	44	M	3.1	Stage IVb	15
4	72	M	3.2	Stage IVb	46
5	84	M	5.1	Stage IVa	7
6	75	F	3.8	Stage IVb	24
7	70	M	4.1	Stage IVa	14
8	67	F	7.1	Stage IVb	12
9	70	F	3.8	Stage IVb	86

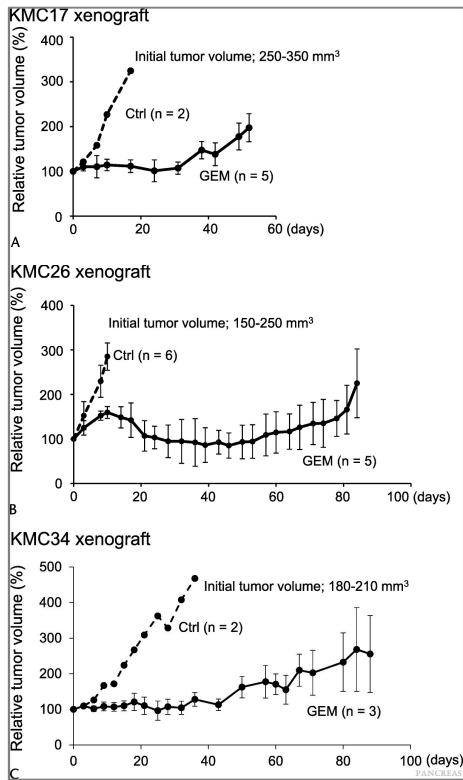
(図1) IV型コラーゲン・7Sの正常値(5 ng/mL)の症例は、3、4、6、7、9である。それ以外(1、2、5、8)は高値である。

### (3) ヒト膵癌幹細胞を用いたモデル系の確立

研究成果(1)の結果より、我々が樹立したヒト膵癌幹細胞株に立ち戻り、GEM依存性に発現が促進される因子の再検索をおこなった。その結果、ヒト膵癌幹細胞株でK-Ras/MEK/MMP-10シグナル伝達の上流と下流の因子と報告されているMMP-1とintegrin 3、FGF-2、FGFR1の因子を候補として同定した。MMP-1はMMP-10により活性化され、膵癌の悪性度と予後不良因子として報告されている。またintegrin-3とFGF-2、FGFR1は、K-Ras/MEKシグナルの上流因子として報告されている。さらに、マウスに移植したヒト膵癌幹細胞が、膵癌幹細胞を単離した患者と同じGEM耐性機能を示すことを明らかにした<sup>[6]</sup>(図2、3)。今後はこのモデル系を使用することで、新規抗癌剤とバイオマーカーの開発を行うこととした。



(図2) ヒト膵癌幹細胞が樹立できた3症例の臨床経過



(図3) ヒト膵癌幹細胞由来移植したマウスに対して GEM 投与をおこない、Xenograft に対する GEM の効果を評価した。3 症例とも患者と同様に GEM を投与することで耐性化を獲得し増大傾向となることが示された。

[6] Machinaga A, Hori Y, Shimizu K, Okahara K, Yanagita E, Miyoshi M, Itoh T, Sasai K. Xenografts derived from patients' ascites recapitulate the gemcitabine resistance observed in pancreatic cancer patients. *Pancreas* 48: 1294-1302. 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shimizu K, Nishiyama T, Hori Y	4. 巻 46
2. 論文標題 Gemcitabine Enhances Kras-MEK Induced Matrix Metalloproteinase-10 Expression Via Histone Acetylation in Gemcitabine-Resistant Pancreatic Tumor-initiating Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 268 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000000744	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 -

1. 著者名 Machinaga A, Hori Y, Shimizu K, Okahara K, Yanagita E, Miyoshi M, Itoh T, Sasai K.	4. 巻 48
2. 論文標題 Xenografts derived from patients' ascites recapitulate the gemcitabine resistance observed in pancreatic cancer patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 1294-1302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001438	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15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 鶴田大生、清水一也、梅本陵平、角井祐介、竹垣普惠、西村綾乃、三好真琴、赤城剛、笹井研、堀裕一
2. 発表標題 抗がん剤Gemcitabine耐性マウス膵癌細胞の樹立とその解析
3. 学会等名 第49回日本膵臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅本陵平、清水一也、鶴田大生、角井祐介、竹垣普惠、西村綾乃、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 抗がん剤Gemcitabine耐性マウス膵癌細胞の樹立とその解析
3. 学会等名 第50回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihito Mochinaga, Yuichi Hori, Kazuya Shimizu, Kyohei Okahara, Makoto Miyoshi, Tomoi Itho, Ken Sasai
2. 発表標題 Ascites-derived-PDX models effectively recapitulate the gemcitabine-resistance observed in pancreatic cancer patients.
3. 学会等名 AACR special conference on Pancreatic Cancer: Advances in Science and Clinical Care (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Kadoi, Kazuya Simizu, Yukie Takegaki, Ayano Nishimura, Makoto Miyoshi, Tsuyoshi Akagi, Ken Sasai, Yuichi Hori
2. 発表標題 Establishment of novel gemcitabine-resistant mouse pancreatic cancer cell line
3. 学会等名 アメリカ膵臓学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ayano Nishimura, Kazuya Shimizu, Yusuke Kadoi, Yukie Takegaki, Makoto Miyoshi, Yuichi Hori
2. 発表標題 Gemcitabine Enhances Kras-MEK-induced Matrix Metalloproteinase-10 Expression in Gemcitabine-resistant Pancreatic Tumor-initiating Cells
3. 学会等名 アメリカ膵臓学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yukie Takegaki, Kazuya Shimizu, Yusuke Kadoi, Ayano Nishimura, Makoto Miyoshi, Tsuyoshi Akagi, Ken Sasai, Yuichi Hori
2. 発表標題 Oncogene transduced mouse pancreatic stem/progenitor cells show phenotypes similar to tumor-initiating cells
3. 学会等名 アメリカ膵臓学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 角井祐介、清水一也、竹垣普惠、西村綾乃、三好真琴、赤城剛、笹井研、堀裕一
2. 発表標題 抗がん剤Gemcitabine耐性マウス膵癌細胞の樹立と解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村綾乃、清水一也、角井祐介、竹垣普惠、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 抗がん剤耐性膵癌細胞ではヒストンアセチル化を介したKras-MEK-Matrix Metalloproteinase-10シグナルがGemcitabine投与で増強する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹垣普惠、清水一也、角井祐介、西村綾乃、三好真琴、赤城剛、笹井研、堀裕一
2. 発表標題 がん遺伝子を導入したマウス膵臓組織幹細胞はがん幹細胞様の表現型を示す
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高嶋宏滋、清水一也、鶴田大生、梅本陵平、寺田夢、脇田美音、大下彩、三好真琴、味木徹夫、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは肝転移を亢進する
3. 学会等名 第50回日本膵臓学会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 脇田美音、清水一也、鶴田大生、梅本陵平、寺田夢、大下彩、高嶋宏滋、宮下久美子、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは肝転移を亢進する
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴田大生、清水一也、梅本陵平、大下彩、寺田夢、高嶋宏滋、脇田美音、宮下久美子、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは遠隔転移を亢進する
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅本陵平、清水一也、鶴田大生、大下彩、高嶋宏滋、寺田夢、脇田美音、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 抗がん剤耐性の膵臓癌に対する脂質メディエーターの効果
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺田夢、清水一也、鶴田大生、梅本陵平、脇田美音、大下彩、高嶋宏滋、宮下久美子、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは遠隔転移を亢進する
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大下彩、清水一也、鶴田大生、梅本陵平、寺田夢、高嶋宏滋、脇田美音、宮下久美子、三好真琴、堀裕一
2. 発表標題 ヒト肝癌細胞由来エクソソームは肝転移を亢進する
3. 学会等名 第27回JDDW
4. 発表年 2019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
研究分担者	三好 真琴  (Miyoshi Makoto)  (50433389)	神戸大学・保健学研究科・助教   (14501)	
研究分担者	堀 裕一  (Hori Yuichi)  (80248004)	神戸大学・保健学研究科・教授   (14501)	