

令和元年5月28日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16570

研究課題名(和文)慢性炎症におけるALDH1陽性細胞分画拡大を介した膵癌進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) To verify the molecular mechanism of pancreatic cancer progression related with chronic inflammation via cancer stem cell expansion.

研究代表者

有馬 浩太 (ARIMA, Kouta)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：10792616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症は様々な癌において発癌・増殖因子であり、抗腫瘍免疫や癌幹細胞など様々な細胞に影響を与えるが、治療薬開発など臨床応用にまでは至っていない。本研究では、慢性炎症において重要な役割を担う膵癌幹細胞マーカーを同定し、膵癌幹細胞分画の拡大を介して腫瘍増殖をきたす新規メカニズムを同定した。さらに慢性炎症などの影響でプロスタグランジンE2が蓄積した膵癌症例には白血病で既に治療薬として用いられているATRA(全トランスレチノイン酸)が有効な可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は最も難治性の消化器癌の一つであり、有効な抗がん剤治療は数少なく効果も乏しいのが現状である。本研究では、慢性炎症に起因したATRAの枯渇を介した膵癌増殖の新規メカニズムを明らかにした。ATRAが白血病治療薬として使用されるようになってから白血病治療は劇的に進化したが、固形癌においては未だ有効な効果が得られた癌腫はない。本研究で明らかにしたようなメカニズムの影響が強い膵癌症例に限定することで、ATRAが膵癌に対して有効な新規治療薬なり得る。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation which has affected a lot of cells, such as immune cell and cancer stem cell (CSC), is a risk factor of many cancers, however, they have not been applied clinical application yet due to complicated interactions. The current study showed to identify the critical CSC marker in pancreatic cancer and new tumor -progressing mechanism via expanding CSC fraction. In addition, we found that ATRA (all-trans retinoic acid) could be a therapeutic reagent for the patients whose tumor is accumulated prostaglandin E2 due to chronic inflammation.

研究分野：消化器外科学

キーワード：慢性炎症 癌幹細胞 全トランスレチノイン酸 膵臓癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は膵癌をはじめとした様々な癌の risk factor である。我々は炎症マーカーの一つである好中球リンパ球比が膵疾患において悪性腫瘍と関与することを見出した (Arima et al. J Gastrointest Surg 2015, Int J Clin Oncol 2016)。慢性炎症の結果、活性化するシグナルは腫瘍の増殖を促進することが知られている。アラキドン酸カスケードの主要経路は、細胞膜を構成するリン脂質由来のアラキドン酸がシクロオキシゲナーゼ (COX) によってプロスタグランジン類を産生する代謝経路であるが、これらの代謝産物は高い生理活性作用を有している。COX 阻害を行うことで抗炎症薬として作用する NSAIDs は各種癌に対して癌関連死亡を減少させることが報告された (Rothwell et al. Lancet 2011)。多くのプロスタグランジン類の中でもプロスタグランジン E₂ (PGE₂) は最も炎症に関する生理活性作用が強く、PGE₂ が癌の増殖進展や癌免疫抑制と関与することが報告されている。

癌は階層性を有する多様な細胞集団であり、中でも階層性の頂点にいる自己複製能と多分化能を有する癌幹細胞は、癌の再発・転移や抗癌剤耐性に強く関与するとされている。近年、PGE₂ が正常組織における造血幹細胞分画の拡大に関与することが報告された (North et al. Nature 2007)。また PGE₂ の分解酵素である 15-PGDH ノックアウトマウスを用いて、細胞内 PGE₂ の蓄積によって組織幹細胞分画が拡大して組織修復能を促進することも報告された (Zhang et al. Science 2015)。しかし、癌において幹細胞様の性質を持つ癌幹細胞分画における PGE₂ 活性化意義は明らかでは無い。

これまで膵癌幹細胞マーカーについては複数の候補が検討されていたが、最も臨床的意義を有したマーカーは明らかにされていない。我々は膵癌において当教室で切除を行った症例サンプルを用いて、これまで膵癌幹細胞マーカーとして報告されている CD44、c-Met、ALDH1 (Chenwei et al. Cancer Res 2007, Gastroenterology 2011, Rasheed et al. J Natl Cancer Inst 2011) の発現と予後との関連を評価したところ、ALDH1 のみが全生存期間、無再発生存期間と有意に相関を認めた。また ALDH1 のみが腫瘍径との有意な相関を認めた ALDH1 陽性癌幹細胞分画におけるプロスタグランジン活性化の意義および ALDH1 発現が予後を悪化させる分子メカニズムを明らかにすることで、癌幹細胞に対する治療標的の確立の礎となりうる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌における癌幹細胞マーカー ALDH1 と PGE₂ シグナルの相互関係を明らかにし、癌幹細胞特性を制御しうる分子メカニズムを明らかにすることである。また PGE₂ 蓄積を制御し得る癌微小環境との関係を明らかにすることである。さらに治療標的となりうる分子を同定し、新規治療法の開発に寄与することである。

3. 研究の方法

➤ *in vitro* 実験による機能解析

1. PGE₂ 刺激による膵癌癌幹細胞発現および癌幹細胞分画変化、増殖能・sphere 形成能の評価
2. 15-PGDH 阻害薬による PGE₂ 蓄積量、癌幹細胞分画変化の評価
3. 15-PGDH 阻害薬による PGE₂ 下流代謝物、ATRA 関連代謝物の測定
4. ATRA 投与による膵癌細胞株の増殖能・sphere 形成能の評価

➤ *in vivo* 実験による表現型解析

1. 膵腫瘍モデルマウスである膵特異的 *Kras* 変異マウスへ 15-PGDH 阻害薬投与を行った際の表現型変化の評価
2. 15-*Pgdh* 遺伝子欠損マウスを作製し、膵腫瘍モデルマウスである膵特異的 *Kras* 変異マウスと交配させた際の表現型変化の評価
3. 形成した膵腫瘍に対し ATRA 投与を行った際の表現型変化の評価

➤ 臨床検体を用いた解析

熊本大学消化器外科学教室の所有する浸潤性膵管癌切除検体を対象に、免疫染色における 15-PGDH 発現および CD163 陽性マクロファージ浸潤数の評価を行い、癌幹細胞マーカー発現との相関、臨床病理学的因子との関連を解析した。

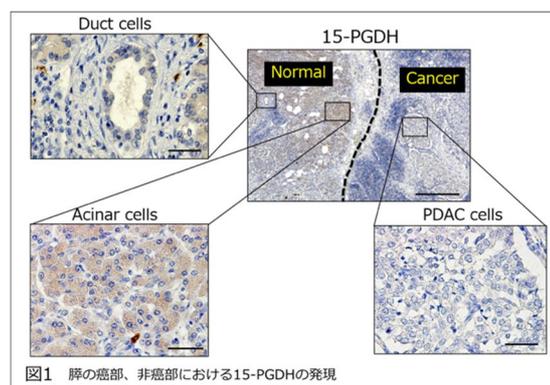


図1 膵の癌部、非癌部における15-PGDHの発現

4. 研究成果

PGE₂ の分解酵素として注目を集めている 15-PGDH の浸潤性膵管癌における膵癌幹細胞マ-

カーとの発現の関連を解析した。15-PGDH は正常膵管、腺房細胞と比較して膵癌細胞において発現が低下していた (図 1)。また 15-PGDH の発現抑制をおこなったところ、有意に細胞増殖能が更新した。

一方、膵微小環境に注目すると、ヒト膵癌組織において CD163 陽性マクロファージと 15-PGDH 発現は逆相関することがわかった (図 2)。同様に in vitro においても、マクロファージとの直接共培養を行うことによって膵癌細胞株の 15-PGDH 発現が低下することがわかった。

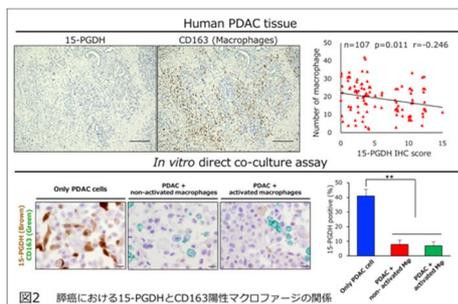


図2 膵癌における15-PGDHとCD163陽性マクロファージの関係

膵癌細胞株とマクロファージの直接共培養を行ったのち、炎症性サイトカインである IL-1 β の発現を FACS で評価すると、マクロファージにおいて IL-1 β が上昇していること、また膵癌細胞株に IL-1 β 投与を行うと 15-PGDH 発現が低下することが確認できた (図 3)。以上より、マクロファージが IL-1 β を介して 15-PGDH 発現を抑制している可能性が示唆された。

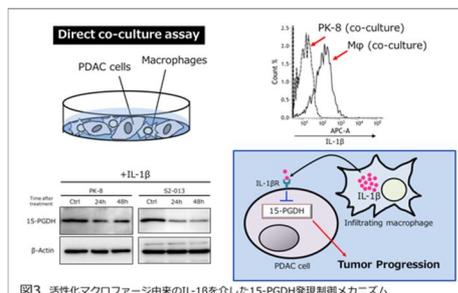


図3 活性化マクロファージ由来のIL-1 β を介した15-PGDH発現抑制メカニズム

次の Question として、15-PGDH 発現低下がどのように腫瘍の増殖進展を生じるかを検討した。2015 年の Science に正常組織において「15-PGDH を抑制することで、組織幹細胞分画を拡大させて組織修復能を促進させる」という報告が出ていたため、我々は「15-PGDH 発現低下によって癌幹細胞分画が拡大し、膵癌進展を促進させる」という仮説をたて、検証をおこなった。

15-PGDH 発現は膵癌幹細胞マーカーのうち ALDH1 のみ逆相関関係を認めた ($r=-0.381$, $p<0.001$) (図 4 上)。また ALDH1 高発現症例のみが全生存期間、無再発生存期間において予後不良であった (図 4 下)。

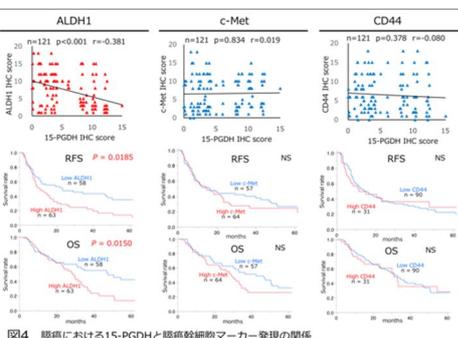


図4 膵癌における15-PGDHと膵癌幹細胞マーカー発現の関係

次に、15-PGDH および ALDH1 の機能解析を行った。15-PGDH 阻害剤投与を行うと、膵癌細胞内の PGE₂ が蓄積し、ALDH1 陽性細胞分画が拡大した (図 5)。それに伴い、増殖能・sphere 形成能が亢進することがわかった。またこれらの変化は ALDH1 発現を siRNA を用いてノックダウンを行うことで recover された。

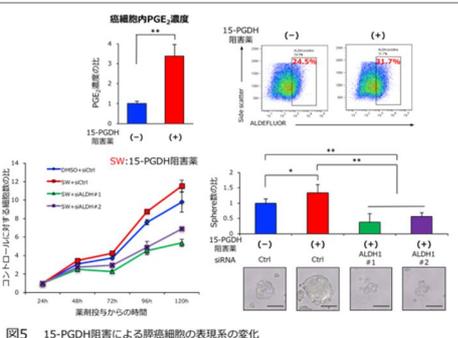


図5 15-PGDH阻害による膵癌細胞の表現系の変化

また、15-PGDH 阻害剤投与による PGE₂ 蓄積は ALDH1 発現を増加させるが、EP2 および EP4 受容体阻害剤投与を行うと ALDH1 発現が低下することを示した (図 6)。以上より 15-PGDH 阻害により癌細胞内に PGE₂ が蓄積し、EP2/4 受容体を介して ALDH1 発現を上昇させるメカニズムを同定した。

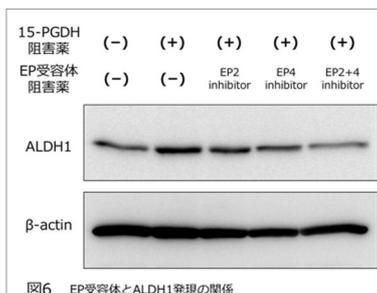


図6 EP受容体とALDH1発現の関係

またこれまでの報告で、がん組織における ALDH1 発現は全トランスレチノイン酸 (ATRA) によって抑制されることが知られている (Young et al. Carcinogenesis 2015)。そこで我々は「PGE₂ 蓄積によって ATRA を枯渇させることで ALDH1 の発現を上昇させる」との仮説を立て研究を進めた。まず膵癌細胞株に ATRA の投与を行ったところ ALDH1 発現が低下し、増殖能・sphere 形成能が低下することが確認できた (図 7)。

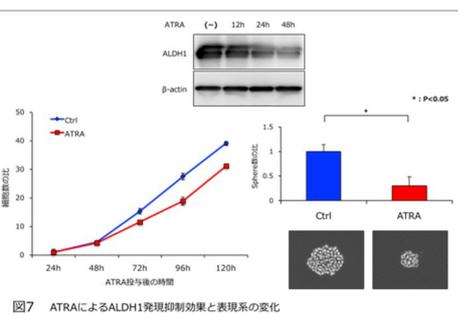


図7 ATRAによるALDH1発現抑制効果と表現系の変化

次に 15-PGDH 阻害剤投与を行った際の癌細胞内の ATRA 濃度を測定すると、ATRA が著明に減少することがわかった (図 8)。また、ATRA は 9-cis RA および 4-oxo ATRA に分解されることが報告されており (Nelson et al. Curr Top Med Chem 2013) 15-PGDH 阻害剤投与後の癌細胞内のそれぞれの代謝物濃度を

測定すると、9-*cis* RA では変化はなかったが、4-oxo ATRA は 15-PGDH 阻害剤投与によって蓄積することが確認できた。さらに ATRA を 4-oxo ATRA に分解する酵素として CYP26A1 という酵素が報告されており、15-PGDH 阻害剤投与後の発現を評価したところ、CYP26A1 の発現が上昇していた。またこれら一連の反応は EP2 および EP4 阻害剤投与を行うと cancel されることが確認できた。以上より、15-PGDH 阻害により、CYP26A1 の発現が上昇し、ATRA を 4-oxo ATRA へ分解促進が生じることで ALDH1 発現が上昇する新規メカニズムを同定した。

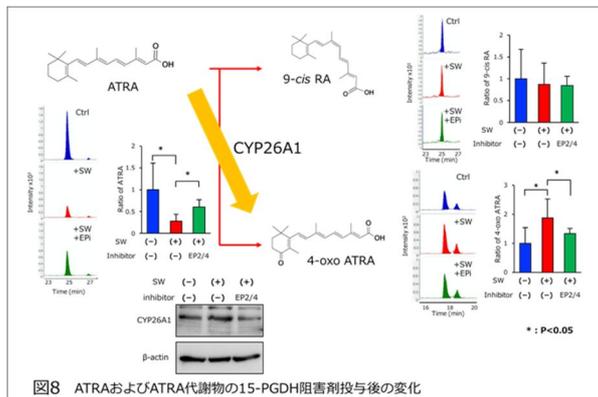


図8 ATRAおよびATRA代謝物の15-PGDH阻害剤投与後の変化

次に *in vitro* で明らかにしたメカニズムの生体内での検証を行った。腭特異的 *Kras* 変異マウスは腭に生後約 8 週で前癌病変、約 1 年で癌を形成することが知られている (Hingorani et al. Cancer Cell 2003)。そこでこのマウスに 15-PGDH 阻害剤を投与した際の腭前癌病変に与える影響を評価した。生後 3 週から週 3 回、4 週間投与を行ったのち生後 8 週で腭を摘出したところ、阻害剤投与群では有意に腫瘍面積が増加し、細胞異型の強い病変が増加した (図 9)。また阻害剤投与を行って形成した腫瘍は Aldh1、Ki-67 陽性細胞が増加し、ATRA が枯渇しており、*in vitro* での所見と一致していた。

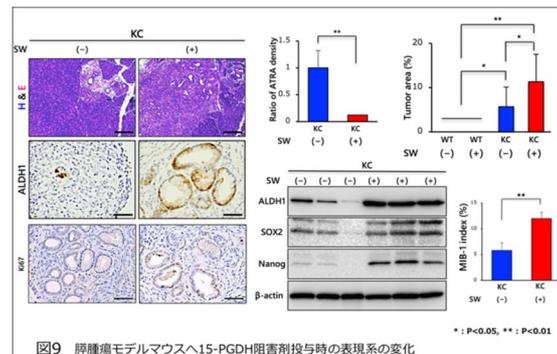


図9 腭腫瘍モデルマウスへ15-PGDH阻害剤投与時の表現系の変化

さらに、15-*Pgdh* 遺伝子欠損マウスを作製し、腭特異的 *Kras* 変異マウスと交配させた際の腭前癌病変に与える影響を評価した。生後 8 週で腭を摘出して評価したところ、15-*Pgdh* 欠損マウスは腭頭部に硬い腫瘍を認め、病理学的に腭管癌を形成していた (図 10)。

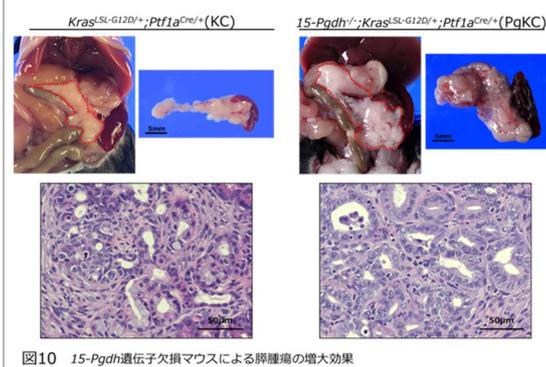


図10 15-Pgdh遺伝子欠損マウスによる腭腫瘍の増大効果

腫瘍は Aldh1、Ki-67 陽性細胞が増加し、PGE₂ の著明な蓄積と ATRA の著明な枯渇を認めた (図 11)。

最後に、ATRA による抗腫瘍効果の評価するために、腭特異的 *Kras* 変異マウスへ 15-PGDH 阻害剤を投与したマウスに同時に ATRA の投与を行うことで、腭腫瘍に与える影響を評価した。ATRA の投与によって腫瘍面積が著明に縮小し、腫瘍組織内の Aldh1 陽性細胞分画が減少していることを確認した (図 12)。以上より、15-*Pgdh* 遺伝子欠損によって *Kras* 変異によって誘導された腫瘍形成を著明に促進させること、腫瘍増殖メカニズムとして *in vitro* の所見と矛盾しないこと、枯渇した ATRA を補充することで腭癌に対する新規治療戦略として有効な可能性が示唆された。

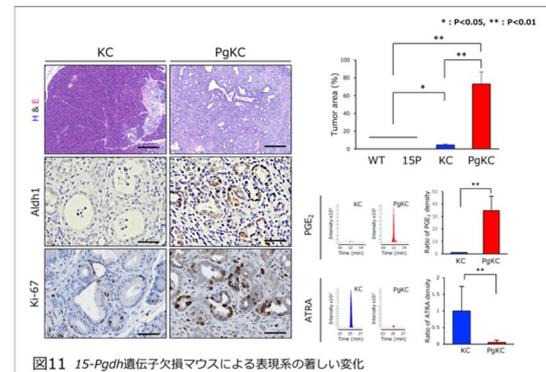


図11 15-Pgdh遺伝子欠損マウスによる表現系の著しい変化

結論

15-PGDH の欠損によって細胞内 PGE₂ が蓄積し、ATRA を分解する酵素 CYP26A1 発現上昇を介して、ALDH1 発現を上昇させる新規メカニズムを同定した。枯渇した ATRA の補充を行うことで腭癌の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

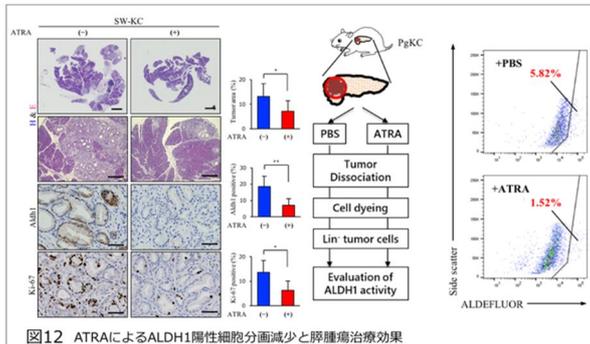


図12 ATRAによるALDH1陽性細胞分画減少と腭腫瘍治療効果

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

1. **Arima K**, Ohmuraya M, Miyake K, Koiwa M, Uchihara T, Izumi D, Gao F, Yonemura A, Bu L, Okabe H, Imai K, Hashimoto D, Baba Y, Chikamoto A, Yamashita YI, Furukawa T, Araki K, Baba H, Ishimoto T. Inhibition of 15-PGDH causes Kras-driven tumor expansion through prostaglandin E2-ALDH1 signaling in the pancreas. *Oncogene*. 2019;38(8):1211-1224. doi: 10.1038/s41388-018-0510-y
2. **Arima K**, Nitta H, Beppu T, Nakagawa S, Okabe H, Imai K, Chikamoto A, Yamashita YI, Yamashita Y, Baba H. Impact of Repeated Hepatectomy on Liver Regeneration in Hepatocellular Carcinoma: A Propensity Score-based Analysis. *Anticancer Res*. 2019;39(2):965-970. doi: 10.21873/anticancer.13200
3. **Arima K**, Komohara Y, Bu L, Tsukamoto M, Itoyama R, Miyake K, Uchihara T, Ogata Y, Nakagawa S, Okabe H, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Yamashita YI, Baba H, Ishimoto T. Downregulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase by interleukin-1 β from activated macrophages leads to poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2018;109(2):462-470. doi: 10.1111/cas.13467
4. **Arima K**, Yamashita YI, Hashimoto D, Nakagawa S, Umezaki N, Yamao T, Tsukamoto M, Kitano Y, Yamamura K, Miyata T, Okabe H, Ishimoto T, Imai K, Chikamoto A, Baba H. Clinical usefulness of postoperative C-reactive protein/albumin ratio in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg*. 2018;216(1):111-115. doi: 10.1016/j.amjsurg.2017.08.016
5. Eto T, Miyake K, Nosho K, Ohmuraya M, Imamura Y, **Arima K**, Kannno S, Fu L, Kiyozumi Y, Izumi D, Sugihara H, Hiyoshi Y, Miyamoto Y, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Furukawa T, Araki K, Baba H, Ishimoto T. Impact of loss-of-function mutation at the RNF43 locus on colorectal cancer development and progression. *J Pathol*. 2018;245(4):445-455. 2018 doi: 10.1002/path.5098
6. Kitano Y, Okabe H, Yamashita YI, Nakagawa S, Saito Y, Umezaki N, Tsukamoto M, Yamao T, Yamamura K, **Arima K**, Kaida T, Miyata T, Mima K, Imai K, Hashimoto D, Komohara Y, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H. Tumour-infiltrating inflammatory and immune cells in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*. 2018;118(2):171-180. doi: 10.1038/bjc.2017.401

[学会発表](計 4件)

1. **Arima K**, Itoyama R, Ishimoto T, Miyake K, Uchihara T, Nakagawa S, Okabe H, Hayashi H, Imai K, Chikamoto A, Yamashita YI, Baba H. Verification of mechanism that the activated inflammatory signaling enhances pancreatic cancer progression. 第 29 回日本消化器癌発生学会 2018 年 11 月 16 日
2. **Arima K**, Ishimoto T, Ohmuraya M, Miyake K, Eto T, Okabe H, Kitano Y, Yamamura K, Kaida T, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Yamashita YI, Baba H. Prostaglandin E2 accumulation enhances the expansion of ALDH1-positive tumor cells and Kras-driven tumorigenesis in pancreas. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017. Apr 3rd 2017
3. **Arima K**, Ishimoto T, Ohmuraya M, Miyake K, Uchihara T, Eto T, Nakagawa S, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Yamashita YI, Baba H. 15-PGDH inhibition enhances KRAS-driven tumor cell expansion via all-trans retinoic acid depletion in pancreas. 第 76 回日本癌学会総会 2017 年 9 月 29 日.
4. **有馬浩太**, 石本崇胤、大村谷昌樹、三宅慧輔、内原智幸、塚本雅代、梅崎直紀、江藤二男、北野雄希、宮田辰徳、中川茂樹、岡部弘尚、今井克憲、馬場祥史、橋本大輔、近本亮、山下洋市、古川徹、荒木喜美、馬場秀夫 慢性炎症関連シグナルの活性化に伴う膵癌進展メカニズムの解明 第 28 回日本消化器癌発生学会 2017 年 11 月 18 日

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。