

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07981

研究課題名(和文) 癌間質相互作用と癌組織の多様性を標的とした進行膵癌に対する分子治療法開発の試み

研究課題名(英文) The development of novel molecular therapy targeting to carcinoma-stroma interaction and heterogeneity of advanced pancreatic cancer.

研究代表者

佐藤 賢一 (SATO, Kennichi)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：10282055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：PKM2抑制細胞をNOGマウスに皮下注射すると造腫瘍能が低下した。PKM2ノックダウンによりECARは減少し、OCRに変化は見られなかった。PKM2発現抑制によりいくつかの代謝産物が減少し、とりわけPKM2の触媒により生成されるピルビン酸とポリアミンの一種であるスペルミンの減少が顕著であった。マウスの高転移肺癌株(Lewis lung carcinoma cell line, 3LL)をPOSTNノックアウトマウスと野生型マウスに移植して肺転移巣を解析した。その結果、POSTN KOマウスにおける転移巣の面積はコントロールマウスに比べ有意に小さいことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では進行膵癌の新たな治療標的として癌間質相互作用と癌組織の多様性に着目した。また、癌間質相互作用と癌組織の多様性に関わる重要な分子としてそれぞれ、PKM2とPeriostinに焦点を絞った。PKM2は膵癌特有の代謝を制御し、膵癌の進展に関与していることが明らかとなった。また、PKM2の下流にスペルミンが存在することも明らかとなり、新しい治療標的分子となる可能性が示唆された。さらにPeriostinも膵癌進展に関与していること、癌の転移に関与していることも明らかにした。これらの知見は、いまだに予後不良である膵癌に対する新しい治療法の開発につながる可能性を持ち、社会的に大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：To examine PKM2's expression and role in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), we knocked PKM2 down in PDAC cells by introducing small interfering and short hairpin RNAs, and examined the role of this gene in PDAC. We analyzed the cells' energy-producing pathways by Extracellular Flux Analyzers, and detected intracellular metabolites by a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometer. RNAi-mediated knockdown of PKM2 diminished proliferation, migration, and tumorigenicity of PDAC cell-lines. PKM2 knockdown also resulted in lower glycolytic activities, and decreased levels of some intracellular metabolites such as pyruvate and polyamine but elevated levels of reactive oxygen species. In a syngenic implantation model, murine Ex3LL lung-cancer cells formed smaller tumor nodules in periostin<sup>-/-</sup> mice than in periostin<sup>+/+</sup> mice at metastatic lung sites, suggesting that periostin plays an important role in cancer metastasis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 癌間質相互作用

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

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において膵癌患者の5年相対生存率は約8%と報告されている。この生存率はあらゆる癌種の中で最も低く、20%を下回るのは膵癌のみである。1993～1996年に診断された膵癌例の5年相対生存率は6.5%であり、様々な診断法や新しい抗がん剤が開発されてきた10年の時を経ても、生存率の改善が認められない。罹患数も増加傾向にあり2015年には39000人、死亡数もほぼ同数の33000人と推測される。その原因として、早期発見が困難であるとともに、進行癌に対する有効な治療法がないことが挙げられる。遺伝子変異の蓄積を数学的に解析すると、膵の癌化から転移を示すまで約20年の歳月が必要という結果が2010年に報告された(Nature 2010)。これは、膵癌は進行が早く、発見した時には既に手遅れといった定説を覆し、癌が形成され転移を示すまでの数年間以内で発見できれば膵癌は制御可能であることを示唆した。しかし、つい最近、膵癌において染色体破砕やゲノム倍化などの現象によって、非常に短期間に転移可能となる遺伝子変異が獲得されることが明らかとなった(Nature 2016)。つまり、従来考えられていた通りに急速に進行する膵癌が存在していることが判明した。従って、膵癌患者の予後を改善するためには、発見したときには既に転移が存在するような急速に進展する進行例に対する画期的な治療法を開発する必要がある。膵癌の治療の困難さの要因の主なものとして、(1)豊富な間質との相互作用による強力な癌進展促進と(2)癌組織の多様性が挙げられる。例えば、癌細胞の増殖を抑制する物質を膵癌組織に投与しても、それが間質に作用して癌促進的な効果を助長してしまって、その効果が相殺されてしまうということである。同様に、膵癌組織中には、全く異なった性質を示す癌細胞が混在していることから、同一癌組織内においても治療薬に対しての効果が異なり、必然的に治療耐性の癌細胞が残存し増殖してしまう。治療抵抗性を示し、転移や再発をもたらす細胞が癌幹細胞と呼ばれ、わずかな細胞数のみで起源の癌組織を再構築できる能力を持つ。膵癌間質における癌との相互作用における重要な分子として Periostin (POSTN) が挙げられる。申請者らは、膵癌細胞からのシグナルによって間質の POSTN 発現が誘導されること、高濃度の POSTN が膵癌細胞の運動能を亢進させることを報告している (Int J Cancer 2008)。また、肝星細胞における POSTN 発現が腫瘍関連マクロファージ (TAM) によって誘導され、肝転移に促進的な微小環境を創るのに重要な役割を演じていることが示された (Nat Cell Biol 2016)。さらに、Glioma においては、POSTN が TAM の集積に重要な役割を果たしていることも明らかとなり、POSTN が癌間質相互作用によって癌進展に関与する因子をコントロールしている可能性が浮上してきている。癌細胞の多様性をコントロールしている因子の一つとして、癌細胞の代謝が挙げられる。申請者らは、胃癌、膵癌において代謝酵素のピルビン酸キナーゼの M2 型 (PKM2) が、酸素が十分にある状態でも、酸化的リン酸化ではなく解糖系によってエネルギーを得るという癌特異的代謝 (Warburg 効果) に重要な役割を演じ、その発現を抑制すると腫瘍増殖能が低下することを解明した (Cancer Sci 2017)。興味深いことに、PKM2 の発現をノックアウトし解糖系の代謝を抑制しても生存する癌細胞が少数ながら存在していた。最近、膵癌幹細胞は解糖系ではなくミトコンドリア代謝によってエネルギーを得ていることが明らかになった (Cell Metab 2015) ことから、PKM2 の発現を抑制された状態で残存生育する細胞が膵癌幹細胞と同様の性質を持つことが示唆される。癌幹細胞は癌組織中に 1%未滿しか存在せず、その同定法も確立されていないため実験に用いるのは困難であったが、PKM2 発現抑制細胞を膵癌幹細胞と同様の性質を持つ細胞として実験に使うことが可能と考えた。以上から、間質の POSTN が膵癌進展促進効果を示さずに、かつ、癌幹細胞と非癌幹細胞の双方に共通した治療標的となる分子の同定が画期的な膵癌治療法の開発に直結すると思われる。

## 2. 研究の目的

研究の目的は、進行膵癌症例に対する画期的な治療法の確立を最終目標に、(1)膵癌幹細胞と非癌幹細胞の両者共通となる治療標的分子を同定し、(2)その分子治療が POSTN の直接的な膵癌細胞への進展促進的な作用とともに、間接的な TAM の誘導などを介した癌進展機構を誘導しないか検証することである。

## 3. 研究の方法

(1) 膵癌幹細胞と非癌幹細胞の両者の増殖を抑える分子の同定；(2) (1)で同定した分子の発現を抑制あるいは発現亢進させた場合の間質における POSTN に対する影響の検証；(3) 分子治療の効果を動物実験にて検証する。

## 4. 研究成果

### (1) 膵癌における PKM2 の役割

膵臓癌組織での PKM2 の発現を調べるため、マイクロダイセクションによって切り取った膵臓組織から RNA を抽出し、PKM2 に特異的なプローブを用いてリアルタイム RT-PCR を行った。PKM2 は正常膵管部に比べ、癌部において有意に高く発現していることが示された ( $P < 0.01$ )。膵臓癌細胞株に si-RNA または sh-RNA を導入し、PKM2 発現抑制株を作製して実験を行った。PKM2 の発現抑制効果はウエスタンブロットにて確認した。PKM2 をノックダウンすると細胞増殖と細胞遊走能が抑制されることが示された。さらに PKM2 抑制株を NOG マウスに皮下注射すると、明らかに造腫瘍能が低下した。PKM2 の発現抑制が糖代謝に影響を及ぼしているかどうかを調べるため、まず膵臓癌細胞のグルコース消費量を計測した。その結果 PKM2 抑制細胞にてグルコース消費量が有意に減少していることがわかった。そこで PKM2 の発現と代謝の変化をより詳細に調べるため、細胞外フラックスアナライザーにて酸化的リン酸化の指標となる酸素消費速度 (OCR) と解糖系代謝の指標となる細胞外酸性化速度 (ECAR) を測定した。PKM2 ノックダウンにより ECAR は減少し、OCR に変化は見られなかった。これに伴い OCR/ECAR 比は PKM2 発現抑制株で増加傾向がみられたことから PKM2 抑制株におけるエネルギー生産は酸化的リン酸化が優位になることが示唆された。さらに我々は PKM2 ノックダウンによって細胞増殖能に顕著な差が見られた MIA PaCa-2 を用いて、PKM2 発現抑制株とコントロール細胞株それぞれの細胞内代謝産物についても解析した。PKM2 発現抑制によりいくつかの代謝産物が減少し、とりわけ PKM2 の触媒により生成されるピルビン酸とポリアミンの一種であるスペルミンの減少が顕著であった)。スペルミンの減少と関連するように、スペルミンの前駆体スペルミジンの合成に関わるスペルミジンシンターゼ (SRM) が減少、スペルミンの分解に関わるスペルミジン/スペルミン N1 アセチルトランスフェラーゼ 1 (SAT1) の発現上昇がマイクロアレイの結果から確認された。PKM2 の発現は ATP 生産量には影響を与えなかった。以上の結果から PKM2 は解糖系代謝の維持に重要な役割を担っていることが示された。

### (2) Periostin 発現消失における膵癌間質への影響と転移能への関与

Periostin ノックアウトマウスと遺伝子改変膵癌マウスを交配させ、膵癌における Periostin の役割を検討している。現在まで、Periostin ノックアウトマウスでは膵癌の発症がコントロールに比べ遅い傾向がみられるものの、マウスの数を増やし解析中である。

マウスの高転移肺癌株 (Lewis lung carcinoma cell line, 3LL) を POSTN ノックアウトマウス

と野生型マウスに移植して肺転移巣を解析した。その結果、POSTN KO マウスにおける転移巣の面積はコントロールマウスに比べ有意に小さいことがわかった。また、POSTN KO マウス転移巣の ki-67 陽性細胞はコントロールに比べ有意に少ないことも判明した。つまり、POSTN の消失により、転移巣での癌細胞増殖が阻害され生育が抑制されることが示唆された。

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 2件）

1. 著者名 Okazaki Toshimasa, Tamai Keiichi, Shibuya Rie, Nakamura Mao, Mochizuki Mai, Yamaguchi Kazunori, Abe Jiro, Takahashi Satomi, Sato Ikuro, Kudo Akira, Okada Yoshinori, Satoh Kennichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Periostin is a negative prognostic factor and promotes cancer cell proliferation in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31187 ~ 31199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Satoh Kennichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular Approaches Using Body Fluid for the Early Detection of Pancreatic Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 375 ~ 375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11020375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡崎 敏昌, 玉井 恵一, 渋谷 莉恵, 中村 真央, 望月 麻衣, 山口 壹範, 岡田克典, 佐藤 賢一.
2. 発表標題 ペリオスチンは肺癌の進展を促進する
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福土 大介, 玉井 恵一, 小暮 高之, 片寄 友, 佐藤 賢一
2. 発表標題 BEX2は肝臓癌における静止期癌幹細胞維持分子である
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021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
研究協力者	玉井 恵一  (TAMAI Keiichi)		

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