

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08627

研究課題名(和文) エクソソームを利用した膵癌幹細胞標的療法の開発

研究課題名(英文) Research on targeted therapy of pancreatic cancer stem cells using exosomes

研究代表者

松原 修一郎 (MATSUBARA, Shyuichiro)

鹿児島大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60199841

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)：膵癌幹細胞マーカーCD133高発現細胞を用いて、エクソソームを運搬体とした治療法の標的となる分子の検索および作用機作について研究した。セリン / スレオニン・キナーゼmTORの関与について明らかにし、mTORは2種類の異なった複合体mTORC1(mTOR複合体1)およびmTORC2(mTOR複合体2)を形成して働いているが、これらは異なった作用で癌幹細胞の維持に関与し、mTORC1とこれにフィードバック機構を介して働くmTORC2 Akt経路との同時阻害が癌幹細胞の抑制に有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は5年生存率が10%前後の難治性のがんで、新たな治療法が求められている。治療の障害となる再発・転移は腫瘍を作る幹細胞、癌幹細胞によって引き起こされると考えられ、癌幹細胞の根絶を目的とした標的療法が注目される。また、膵癌などKRASが活性化した細胞では細胞外小胞の一種エクソソームの取り込みが亢進しており、膵癌治療の運搬体としてエクソソームの利用が試みられている。米国のKalluri, R.らは変異型KRASを標的として研究をすすめているが、この方法ではエクソソームの取り込み自体が低下する懸念がある。mTOR、Aktの同時阻害はこれの回避が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Using pancreatic cancer stem-like model cells with high CD133 expression level, we studied for target molecules and their mechanisms of action for exosome-based therapies. The involvement of the serine / threonine kinase mTOR was elucidated. mTOR works by forming two distinct complexes mTORC1 (mTOR complex 1) and mTORC2 (mTOR complex 2), which are involved in cancer stem cell maintenance through different actions, and the combined inhibition of mTORC1 and the mTORC2 Akt pathway, which affects on mTORC1 through a feedback mechanism, is effective in suppressing cancer stem cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：癌幹細胞 膵臓癌 CD133 mTOR Akt

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治性の悪性腫瘍で、5年生存率は現在も10%前後である [1]。日本における癌関連死因の第4位を占め、膵癌の罹患率はさらに増加を続けている [1]。この疾患の臨床経過は不良で、新しい治療法が必要とされている。

がん幹細胞 (CSC) 理論が提唱され、固形癌においても CSC 発見の報告が続いている [2,3,4]。CSC は、自己複製能とパルク腫瘍細胞 (自己複製能を持たない腫瘍構成細胞) への「分化能」を有する細胞である [2,3,4]。したがって、CSC は腫瘍形成の起点となり、再発の原因となる。CSC は転移や薬剤耐性・放射線耐性の原因とも考えられている。膵癌の CSC を根絶すれば、腫瘍の発生がなくなり、癌の再発が効果的に抑制されると期待できる。したがって、CSC の維持に働くシグナル経路は新しい治療法の有望な標的である。

膵臓の CSC マーカーとしては、CD133 [2] と CD44/CD24/EpCAM の組み合わせ [3] が報告されている。我々の研究でも、臨床膵癌における CD133 発現は予後不良および転移の増加と関連していた [5]。膵癌細胞株 Capan-1 の CD133 陽性細胞は CSC 様の性質を示す [6]。この細胞株から遊走能を指標として選別を繰り返し、CD133 陽性細胞比率の高いサブラインを樹立した。また、そのサブラインに CD133shRNA を導入し、CD133 ノックダウン細胞を得た。これら細胞の比較から、CD133 が上皮間葉転換 (EMT) を促進することがわかった [7, 8]。EMT と CSC 様性質との関連性は、これまでの報告に一致している [9,10,11]。

2. 研究の目的

近年エクソソームに関する研究が進み、この細胞外小胞に含まれる様々な分子が体内において安定であること、また、膵癌など KRAS が活性化した細胞ではエクソソームの取り込みが亢進していること、が報告されている [12]。これらの点に注目して、本研究はエクソソームを運搬体として短鎖 RNA などを膵癌幹細胞に投与し、CSC の抑制制御をおこなう治療法の開発を目指して開始した。

2019 年春、京都で開かれた細胞外小胞の国際学会 ISEV2019 に参加し、米国で同様の研究を行っている Kalluri, R. らのグループの発表を聞き、また、Kalluri 教授と会場で話した結果、全体の計画を再検討し実験の一部を縮小して、彼らが標的に用いている KRAS (変異型) 以外の新たな標的分子の検索に力を入れることとした。

3. 研究の方法

膵癌細胞株 Capan-1 の CD133 陽性細胞は免疫不全マウスへの移植実験において腫瘍形成能があり、この細胞から得られた CD133 高発現のサブライン (Capan-1 M9 細胞、陽性細胞比率 90%以上) が CSC 様の性質を示したことから、このサブラインを膵癌幹細胞のモデルとして CSC の維持に働くシグナル経路検索ができると考えた。

Capan-1 M9 細胞を種々のシグナル経路に働く阻害剤などで処理し、幹細胞性の形質として CD133 発現細胞の比率およびスフェア形成能 (自己複製能の指標) を調べ、同時にソフトアガー中でのコロニー形成 (足場非依存性増殖) や cell viability (MTT アッセイ)、細胞増殖 (細胞数計測による) についても検討した。また、Akt mTOR 経路の構成タンパクについてウエスタンブロッティング法を用いてタンパクの発現やリン酸化状態を調べた。

さらに、この細胞で得られた結果が他の膵癌細胞株 (PANC-1、腫瘍形成能あり) でも同様に見られるかを確認した。

4. 研究成果

我々は上記の方法で、mTOR 阻害剤ラパマイシンおよびヘッジホッグ経路の阻害剤が、Capan-1 M9 細胞の CD133 発現率および cell viability に異なった様式で作用し、また、免疫不全マウス移植腫瘍の増殖を、単独あるいは併用投与で、抑えることを示してきた[13, 14]。

膵癌では、多くの症例(約 85%)で KRAS 突然変異のある事が知られており [15]、mTOR は KRAS の下流に存在する PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路の構成要素である。セリン/スレオニンプロテインキナーゼ mTOR は、それぞれ固有の基質に作用する 2 つのキナーゼ複合体、mTOR 複合体 1 (mTORC1) と 2 (mTORC2) として機能している。この 2 つの複合体は構成するタンパク要素が異なり、mTORC 1 はラパマイシンによってアロステリックに阻害されるが、mTORC2 はラパマイシン非感受性である。

mTORC1 特異的阻害剤であるラパマイシンは CD133 陽性細胞の cell viability およびスフィア形成を低下させ、マウス移植腫瘍の増殖を抑えたが、mTORC1 と mTORC2 の両方に作用する ATP 競合型阻害剤 KU-0063794 は、より効果的であることが示唆された[13]。このことは、mTORC1 だけでなく mTORC2 も CSC 様性質の維持に関与し、したがって有効な治療標的となる可能性を示しているため、mTORC1 と mTORC2 の働きについてさらに詳しく調べた。

CD133 高発現膵癌細胞の CSC 様性質に対する mTORC1/mTORC2 デュアル阻害剤の作用

mTORC1 と mTORC2 の両方に作用するデュアル阻害剤 KU-0063794 は、mTORC1 阻害剤ラパマイシンと同様に、CD133 高発現細胞 (Capan-1 M9 細胞) のスフェア形成 (自己複製能の指標)、ソフトアガー中でのコロニー形成、cell viability (MTT アッセイ)、細胞増殖(細胞数計測による)を低下させる。一方で、CD133 発現細胞の比率はあまり変化させず、この点で発現細胞比率の低下を起こすヘッジホッグ経路の阻害剤とは異なっている。さらに、cell viability およびスフェア形成について詳細に調べるとラパマイシンによる低下は一定濃度でプラトーに達するが、デュアル阻害剤 KU-0063794 の作用はより低いレベルまで直線的な濃度依存性を示した。このことは別の膵癌細胞 PANC-1 でも同様に認められた (図 1)。

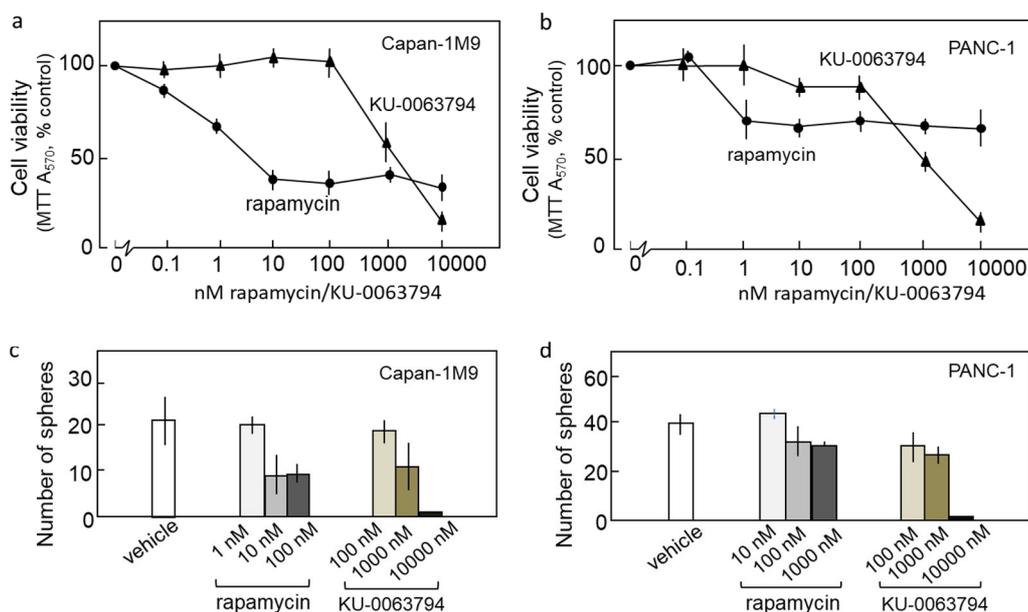


図1. 膵癌細胞のcell viabilityおよびスフェア形成に対するmTOR阻害剤の作用

Akt mTOR 経路に対する mTOR 阻害剤の作用

Capan-1 M9 細胞を mTOR 阻害剤で処理し、Akt mTOR 経路構成タンパクのウエスタンブロッティングをおこなった。ラパマイシン処理細胞では、S6 キナーゼおよび S6 タンパクのリン酸化が抑えられ mTORC 1 の阻害が確認されるとともに、Akt のリン酸化が誘導され、すなわち Akt の活性化が認められた。KU-0063794 処理細胞でも S6 キナーゼおよび S6 タンパクのリン酸化は同様に抑えられ mTORC 1 の阻害は確認されたが、Akt の活性化は認められなかった。

mTORC1 と Akt 同時阻害の作用

mTORC2 は Akt の S473 をリン酸化することから [16, 17]、ラパマイシン処理細胞では mTORC2 活性が Akt のフィードバック活性化に関与している可能性がある。この考えは、ラパマイシンによる阻害作用はプラトーに達するが、KU-0063794 による阻害効作用にはプラトーがないという結果と矛盾しない。

Akt 活性化の関与を確認するため、Capan-1 M9 細胞をラパマイシンと Akt 阻害剤 GSK2110183 で同時処理した。Akt 阻害剤存在下では cell viability は直線的に減少し、プラトーは認められなかった。また、スフェア形成についても同時処理によって効果的に抑制された (図 2)。

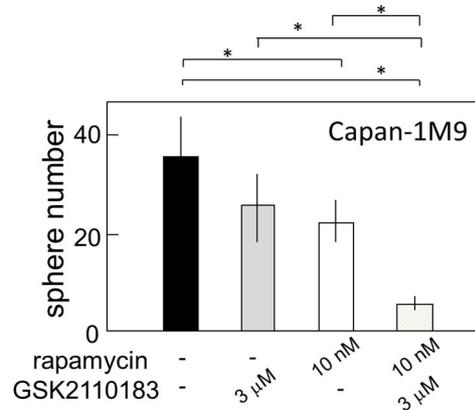


図2. ラパマイシンとAkt阻害剤 (GSK2110183) 同時処理によるスフェア形成抑制

我々は、膵癌幹細胞の維持シグナルが治療標的として有効であると考え、mTOR およびヘッジホッグ経路に注目してきた。今回、mTOR 複合体 1 (mTORC1) および 2 (mTORC2) の関与と作用機作についてさらに検討し、mTORC1 の活性が CSC 様特性と直接相関すること、また、mTORC2 はラパマイシン処理後の Akt リン酸化に関与し、CSC 抑制に対する負の作用を持つことを示す結果を得た。mTORC1 および mTORC2 の二重阻害、あるいは mTORC1 と Akt の同時阻害によって膵癌幹細胞を効果的に抑制できると考えられる。

KRAS が活性化した細胞ではエクソゾームの取り込みが亢進していることから、膵癌でもエクソゾームを運搬体とした治療法の開発がすすんでいる [18]。KRAS(変異型) を直接標的にするとエクソゾームの取り込み自体を低下させると考えられるが、mTOR および Akt を標的とすることによってこれを回避できる可能性があり、期待される。

文献

1. 公益財団法人 がん研究振興財団. がんの統計 2024; ISSN 2433-3212.
2. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell Stem Cell. 2007;1:313-23.
3. Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. Can Res. 2007;67:1030-7.

4. Takao S, Ding Q, Matsubara S. Pancreatic cancer stem cells: regulatory networks in the tumor microenvironment and targeted therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2012;6:614-20.
5. Maeda S, Shinchi H, Kurahara H, et al. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2008;98(8):1389-97.
6. Hayashi T, Ding Q, Kuwahata T, et al. Interferon-alpha modulates the chemosensitivity of CD133-expressing pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Cancer Sci.* 2012;103:889-96.
7. Ding Q, Yoshimitsu M, Kuwahata T, et al. Establishment of a highly migratory subclone reveals that CD133 contributes to migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Hum Cell.* 2012;25:1-8.
8. Ding Q, Miyazaki Y, Tsukasa K, Matsubara S, Yoshimitsu M, Takao S. CD133 facilitates epithelial-mesenchymal transition through interaction with the ERK pathway in pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer.* 2014;13:15.
9. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133:704-15.
10. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial mesenchymal transition. *PLoS ONE.* 2008;3:e2888
11. Zhou P, Li B, Liu F, et al. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer treatment resistance. *Mol Cancer.* 2017;1:52.
12. Nakase I, Kobayashi NB, Takatani-Nakase T, Yoshida T. Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Sci Rep.* 2015;5:10300. doi: 10.1038/srep10300.
13. Matsubara S, Ding Q, Miyazaki Y, Kuwahata T, Tsukasa K, Takao S. mTOR plays critical roles in pancreatic cancer stem cells through specific and stemness-related functions. *Sci Rep.* 2013;3:3230.
14. Miyazaki Y, Matsubara S, Ding Q, et al. Efficient elimination of pancreatic cancer stem cells by hedgehog/GLI inhibitor GANT61 in combination with mTOR inhibition. *Mol Cancer.* 2016;15:49.
15. Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer *Semin Oncol.* 2021;48:10-18.
16. Manning BD, Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell.* 2017;169:381-405
17. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005;307:1098-101.
18. Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, Lee JJ, Kalluri R. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature.* 2017;546:498-503.

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 Shyuichiro Matsubara, Koichiro Tsukasa, Taisaku Kuwahata, Sonshin Takao	4. 巻 33
2. 論文標題 Prevention of Akt phosphorylation is a key to targeting cancer stem-like cells by mTOR inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human cell	6. 最初と最後の頁 1197-1203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-020-00416-9	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 Kurahara H, Maemura K, Matak Y, Sakoda M, Iino S, Kawasaki Y, Arigami T, Mori S, Kijima Y, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Significance of Glucose Transporter Type 1 (GLUT-1) Expression in the Therapeutic Strategy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 1432-1439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-018-6357-1	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Matsubara, S., Shimono, R., Furukawa, T., Takao, S.
2. 発表標題 Prevention of Akt phosphorylation is a key to targeting pancreatic cancer stem-like cells by mTORC1 inhibition.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsubara, S., Tsukasa, K., Miyazaki, Y., Obara, T., Matsuyama, T., Takao, S.
2. 発表標題 CD133 induces EMT and peritumoral fibrosis of pancreatic cancers
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsubara, S., Tsukasa, K., Kuwabata, T., Obara, T., Matsuyama, T., Takao, S.
2. 発表標題 Differential functions of mTORC1 and mTORC2 in the maintenance of stem-like properties of pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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	新地 洋之 (SHINCHI Hiroyuki) (60284874)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	高尾 尊身 (TAKAO Sonshin) (80171411)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	
研究分担者	下野 隆一 (SHIMONO Ryuichi) (60404521)	香川大学・医学部・准教授 (16201)	

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