

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16365

研究課題名(和文) Calreticulin陽性膵癌幹細胞の癌幹細胞性および病態生理の解析

研究課題名(英文) Analysis about stemness and pathophysiology of pancreatic cancer stem cells expressing calreticulin

研究代表者

松隈 聡 (MATSUKUMA, Satoshi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10634743

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)：膵癌細胞株Panc-1から誘導した膵癌幹細胞様細胞が豊富な細胞集団Panc-1 Lmは、薬剤耐性の一機構としてのABC transporter活性上昇を示すSide populationの割合が高く、Sphere形成能を有しており、癌幹細胞性を有していると考えられた。また、HLA class I分子の発現を低下させ、免疫チェックポイント関連分子であるPD-L1を高発現することで免疫監視機構から逃避している可能性が示唆された。さらに、誘導した細胞に含まれるCalreticulin陽性細胞は、さらに高いSphere形成能と表面抗原による免疫逃避機構を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、我々が独自の方法で、膵癌細胞株から誘導した膵癌幹細胞様細胞が豊富な細胞集団の癌幹細胞性が確認できた。さらに、この細胞は免疫チェックポイント関連分子を発現し、HLA class I分子の発現を低下させることで、免疫監視機構から逃避している可能性が示唆された。今後、表面抗原のみならず免疫逃避に関連する液性因子の発現の解析、免疫担当細胞との共培養実験を通して、癌幹細胞の免疫逃避機構を解明することで、癌の新たな治療法開発を目指している。

研究成果の概要(英文)：Panc-1 Lm, a pancreatic cancer stem-like cell enriched population induced from the pancreatic cancer cell line Panc-1, has a high proportion of side population showing an increased ABC transporter activity as a mechanism of drug resistance, and has a sphere-forming ability. These results implied that Panc-1 Lm has cancer stem cell properties. And, their high expression of PD-L1, which is an immune checkpoint-related molecule, and reduced expression of HLA class I molecule could be a mechanism of evasion from the immune surveillance. Moreover, Calreticulin-positive cells contained in the induced cells had higher sphere-forming ability and immune escape mechanism by surface antigens.

研究分野：癌幹細胞

キーワード：膵癌幹細胞 Calreticulin 癌幹細胞性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、根治切除後の高い再発率と化学療法や放射線治療に対する抵抗性を特徴とする難治癌である。近年の研究で、消化器癌の再発や遠隔転移に、癌幹細胞様細胞 (Cancer stem-like cell: CSLC) と呼ばれる細胞が関わっている、という仮説が提唱されている。CSLCは既存の抗癌剤や放射線治療に抵抗性を有しているといわれ、癌の根治のためにはCSLCを標的とした治療を開発することが急務であると考えられる。CSLCの発生には諸説あるが、近年では分化した細胞もCSLCに戻る事が可能(可塑性)で、stem cellとnon-stem cellは互いに行き来していると考えられている。教室では、膵癌細胞株および肝癌細胞株から、癌幹細胞誘導用培地を用いて、CSLCの表現型を伴う細胞の誘導に成功した(特願2012-47433)。誘導したCSLCは、CSLC関連表面抗原を表出し、高い腫瘍原性と肝転移能を有し、stemness遺伝子およびEpithelial-Mesenchymal transition (EMT) 関連遺伝子の高発現も確認された。さらに細胞周期の休止、薬剤排出に関連するABC transporterの発現亢進といった抗癌剤耐性も有していた。さらに、誘導した膵癌CSLC(P-CSLC)豊富な細胞集団と親細胞に発現している分子をProteomicsの手法で比較し、小胞体における分子シャペロンとして知られるCalreticulin (CALR)が、P-CSLCの細胞膜上で高発現していることを見出し、報告した。従来、P-CSLCは、CD24, CD44, ESAを同時に発現した細胞として報告され、同定にはこれら表面マーカーの同時測定が必要であった。一方、誘導したP-CSLCに含まれるCALR陽性細胞はABC transporter活性が高く、CSLCに特徴的な高い薬剤耐性能を有していた。一般的に、CALRの細胞膜表面への表出は、マクロファージにより認識され、貪食を促す"eat me signal"として知られており、理論的にはCALRを表出したP-CSLCは自然免疫により排除されるはずである。我々の検討では、CALR陽性細胞は、"anti-phagocytic signal"として知られるCD47を同時に表出しており、マクロファージからの貪食を逃れている可能性が考えられた。

P-CSLCを対象とした新たな治療の開発のために、CALRが新たな治療ターゲットとなりえるのか検証するため、本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究では、誘導したP-CSLCに含まれるCALR陽性細胞のがん幹細胞性および病態生理を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膵癌幹細胞様細胞(P-CSLC)の誘導

膵癌細胞株Panc-1(American Type Culture Collection)から既報の方法で、P-CSLC豊富な細胞集団Panc-1 Lmを誘導した。

(2) フローサイトメトリー

細胞を下記の抗体とともにincubateし、フローサイトメトリー(FACSAria III (BD), MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec))解析に用いた。

<使用した抗体>

anti-CALR Alexa Fluor 647 (abcam), anti-CD24 FITC (Miltenyi Biotec)

anti-CD44 PE-Vio770 (Miltenyi Biotec), anti-ESA Pacific Blue (BioLegend)

anti-HLA class I FITC (BD), anti-CD47 PE (BD), anti-CD274 (PD-L1) PE (BioLegend)

(3) Side population解析

5% FBSを含むDMEM/F12に 1×10^6 cells/mLの濃度とした細胞と5 μ g/mL Hoechst 33342

(Sigma-Aldrich Japan) を 37 °C、30 分間 incubate した。続いて 2% FBS を含む PBS に 1×10^7 cells/mL の濃度とし、BD LSRFortessa X-20 cell analyzer (BD Biosciences)により、Hoechst 33342 を 375 nm trigon violet laser で励起し、450/20 (Hoechst 33342-Blue)と 670 LP (Hoechst 33342-Red) filter で検出を行った。

(4) マウス皮下腫瘍形成モデル

8-12 週齢の NOD-Rag1^{null} IL2rg^{null} double mutant mice (NRG mice)の皮下に 27G 針を用いて、 10^2 , 10^3 , 10^4 cells の腫瘍細胞を注入し、100 日後に腫瘍形成の有無、腫瘍径を比較した。

(5) Sphere Formation assay

Pan-1 Lm を anti-CALR Alexa Fluor 647 (abcam) と 4 °C、30 分間 incubate した後、BD FACSAria III (BD Biosciences)を用いて、CALR-high と CALR-low 細胞に分離した。これらの細胞と Panc-1、Panc-1 Lm を 96-well ultra-low attachment plates (Corning)に 1, 10, 10^2 cells/100 mL (Sphere 誘導培地) の濃度で散布し、7 日後に形成された Sphere の数を測定した。

(6) 統計解析

データは平均値 ± 標準偏差で示し、Fisher's exact test あるいは Student's t-test あるいは Welch's *t*-test により検定し、P 値 0.05 未満を有意とした。

4 . 研究成果

(1) Side population (SP)と CALR 発現

Panc-1 Lm 内の SP の割合は、Panc-1 と比較し、明らかに上昇していた(図 1(a), (b))(62.3% vs 1.1%)。

Panc-1 においては、細胞表面への CALR 発現は SP, non-SP fraction とともに認めなかった(図 1 (c), (e))。

一方、Panc-1 Lm においては、SP, non-SP fraction とともに CALR を細胞表面に発現していた(図 1 (d), (f))。

さらに、CALR の発現強度は non-SP fraction では中等度であるのに対し、SP fraction においては、陰性のものと高度発現の 2 分画に分かれていた。

(2) 皮下腫瘍形成モデル

Panc-1 および Pan-1 Lm を NRG マウスの皮下に接種し、100 日後の腫瘍形成頻度および形成された腫瘍の大きさを測定した(図 2 a) - c))。

腫瘍形成頻度は Panc-1 と比較し、Panc-1 Lm で有意に高かった(図 2 d))

図 2 e) に 10^4 cells 接種で形成された腫瘍の大きさを示す。Panc-1 Lm 接種により形成された腫瘍の大きさは、Panc-1 と比較し、有意に大きかった($198.5 \pm 24.7 \text{ mm}^3$ vs $4.3 \pm 28.5 \text{ mm}^3$, $P = 0.005$)。

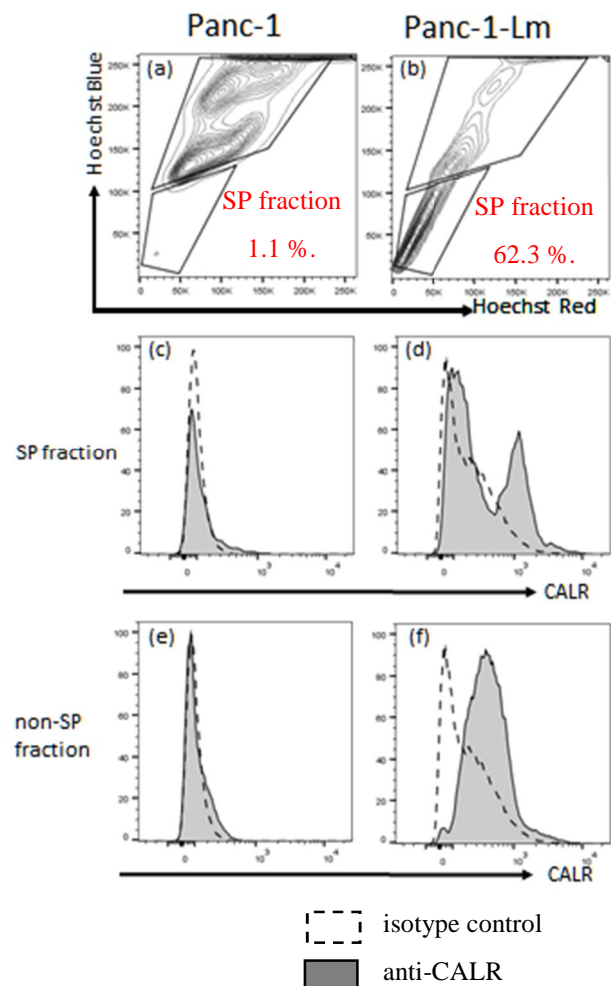


図 1 . Side population と CALR 発現

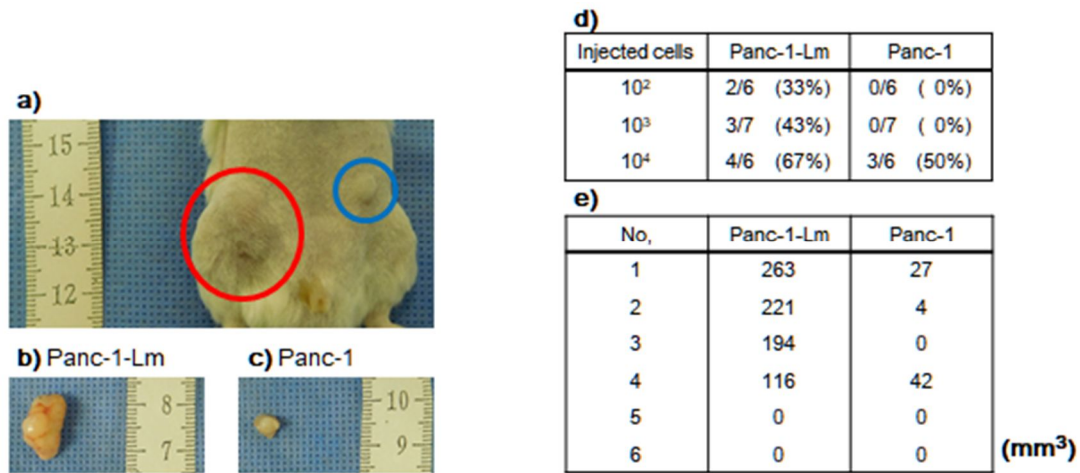


図2．皮下腫瘍形成モデル

(3) Sphere 形成能(表1)

1 cell/well では、いずれの群でも Sphere 形成は認めなかった。10 cells/well では CALR^{high} cells のみが Sphere 形成し、CALR^{low} cells は 100 cells/well でも Sphere 形成しなかった。

細胞濃度	Panc-1	Panc-1 Lm	CALR ^{high} cell	CALR ^{low} cell
1 cell/well	0/20	0/26	0/26	0/27
10 cells/well	0/20	0/28	6/25	0/25
100 cells/well	1/20	12/26	25/25	0/25

表1．Sphere formation assay の結果

(4) 免疫チェックポイント関連分子の発現

HLA class I 分子の発現は、Panc-1、Panc-1 Lm、CALR^{high} の順で発現が低下(図3 A-C)し、一方 PD-L1 は発現が上昇した(図3 D-F)。一方、CD47 は Panc-1 と比較し、Panc-1 Lm および CALR^{high} で発現が低かった(図3 G-I)。

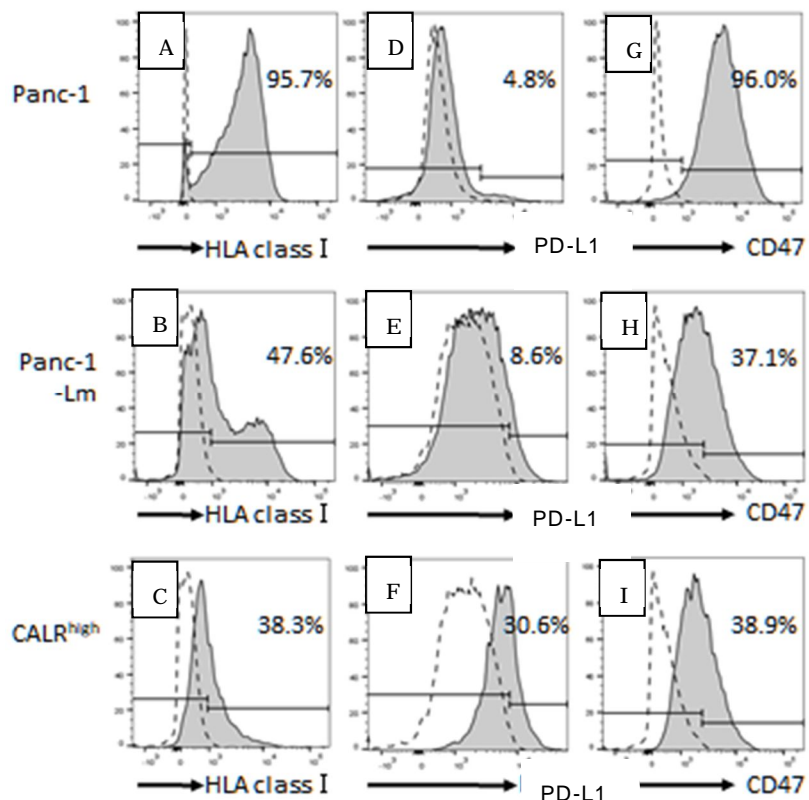


図3．免疫チェックポイント関連分子の発現

本研究で、我々は、膵癌細胞株から誘導した P-
CSLCs 豊富な細胞集団
Pan-1 Lm の幹細胞性を示し、この幹細胞性は Pan-1 Lm に含まれる CALR 陽性細胞が担っている可能性が高いことを示した。

さらに、Pan-1 Lm および CALR 陽性細胞は、HLA class I 分子の発現を低下させ、PD-L1 発現を上昇させることで主に細胞性免疫からの監視を逃避している可能性が示唆された。

今後は P-
CSLC におけるその他の腫瘍免疫抑制分子 (PD-L2, CD73, Ceacam-1, LSECtin, B7H3,

B7H4, Galectin-9 など) の発現を RT-PCR, flow cytometry を用いて解析するとともに、P-CSLC 培養液中の可溶性免疫抑制物質 (TGF- β , IL-10, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) など) の濃度を ELISA 法にて検討することを予定している。また最近、乳癌細胞株において、抗癌剤が hypoxia-inducible factors (HIFs) を介して CD47, CD73, PD-L1 の発現を誘導すると報告されている。我々の誘導した CSLC においても HIFs の発現は亢進しており、HIF-1 /2 の阻害剤 acriflavine の添加がこれらの分子の発現に及ぼす影響を解析し、HIFs の関与を確認する。さらに、P-CSLC と M1/M2 マクロファージ、T-cell との共培養システムを開発し、免疫監視機構との関与を明らかにしたいと考えている。

<引用文献>

Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med.* 17(3):313-9. 2011

Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 8(10):806-23. 2009

Meacham CE and Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 501(7467):328-37. 2013

Kreso A, O'Brien CA, van Galen P, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science.* 339(6119):543-8. 2013

Watanabe Y, Yoshimura K, Yoshikawa K, et al. A stem cell medium containing neural stimulating factor induces a pancreatic cancer stem-like cell-enriched population. *Int J Oncol.* 45(5):1857-66. 2014

Matsukuma S, Yoshimura K, Ueno T, et al. Calreticulin is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells. *Cancer Sci.* 107(11):1599-1609. 2016

Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67(3):1030-7. 2007

Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 13(1):54-61. 2007

Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med.* 2(63):63ra94. 2010

Samanta D, Park Y, Ni X, et al. Chemotherapy induces enrichment of CD47⁺/CD73⁺/PDL1⁺ immune evasive triple-negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115(6):E1239-E1248. 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松隈 聡
2. 発表標題 膵癌幹細胞に高発現した分子Calreticulinの臨床的意義
3. 学会等名 第16回日本消化器外科学会大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----