

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03631

研究課題名(和文)酸化ストレス応答依存性評価と人為的制御を基盤とした革新的膵癌治療戦略の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapy for pancreatic cancer based on the regulation of oxidative stress responses

研究代表者

正宗 淳(Masamune, Atsushi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90312579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、Nrf2活性化状態に応じた膵癌細胞・膵星細胞抑制による効果的な膵癌治療法開発のための基盤構築である。Nrf2阻害剤により発現が低下する分子としてAldh3a1を見出し、Nrf2阻害とともにAldh3a1発現ノックダウンが抗癌剤感受性を増強することを見出した。Nrf2阻害剤は既存抗癌剤の作用をin vitro、in vivoで増強することを確認した。膵星細胞については癌細胞の腫瘍形成能増強効果が膵星細胞側のNrf2に依存することを見出した。Nrf2活性化状態にある膵癌細胞に対して、アミノ酸代謝阻害が生存率を低下させることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の予後改善のためには新たな治療法開発が喫緊の課題である。使用薬剤の奏功性・耐性化機序をリアルタイムに把握し、耐性獲得機構制御により有効性を維持する薬剤選択を可能とすることで、酸化ストレス応答依存性という新たなパラダイムに基づく膵癌個別化治療の基盤を構築するものである。以上の計画は現状では困難な膵癌の個別化治療を実現し、現行治療の課題を克服するという大きな創造性を有する。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to develop intervention methods for pancreatic cancer according to the Nrf2 activation status. We identified that halofuginone, the inhibitor of Nrf2, represses Aldh3a1 expression. Halofuginone potentiates the effects of the anticancer agent both in vitro and in vivo. The enhancement of tumorigenicity by pancreatic stellate cells depend on stellate cells' Nrf2. Inhibition of amino acid metabolism was more effective in Nrf2-activated pancreatic cancer cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

現在の膵癌治療の問題点は、特定の遺伝子変異や腫瘍側因子に基づく奏功性予測が実現されていない、治療介入による腫瘍の性質変化を把握できずに二次治療を選択せざるを得ない、ことである。このため、切除不能膵癌に対する化学療法は根治を望める治療ではない。我々は酸化ストレス応答機構の活性化がもたらす膵癌促進メカニズムに注目し研究を行ってきた。Keap1-Nrf2 経路は酸化ストレス応答の中核を担い、酸化ストレスによる Keap1 の立体構造変化、それにより分解を免れた Nrf2 による標的遺伝子の転写活性化により多彩な細胞機能を調節する。膵癌を含む多くの癌において、遺伝子変異による Nrf2 分解機構の機能不全や癌遺伝子シグナルによる Nrf2 活性化がみられる。酸化ストレスは膵線維化を担う膵星細胞の活性化促進因子でもあり、癌促進的なニッチ形成に寄与する。我々は変異 Kras・p53 発現による膵癌モデルマウスに Nrf2<sup>-/-</sup>バックグラウンドを導入した先行研究(Hamada, 2017)において、全身性の Nrf2 欠損は前癌病変 PanIN・浸潤癌の出現を抑制し、かつ転移を増加させない、Nrf2 欠損膵癌細胞は酸化ストレスやゲムシタピンに脆弱性を示す、Nrf2 欠損は PanIN 周囲の炎症細胞浸潤を減少させる、との知見を得た。

既に家畜の治療薬として実用化されている植物アルカロイド誘導体、ハロフギノンは強力な Nrf2 抑制効果を持つ。本薬剤は Nrf2 の活性化がみられる癌細胞において、シスプラチンやドキソルビシンなど、細胞内酸化ストレスを増加する抗癌剤の作用を増強する(Tsushima, 2017)が、Nrf2 依存性のない癌細胞に対する効果は限定的である。従来型抗癌剤の多くでは耐性化を生じる際に Nrf2 活性化がみられ、癌幹細胞機能の増強に寄与することから、Nrf2 阻害剤は耐性化に対抗する治療手段となりうる。全身性の Nrf2 ノックアウトにより想定外の癌進展作用はみられず、Nrf2 阻害は安全性の高い治療アプローチと予想される。

Nrf2 の活性化が膵癌の抗癌剤感受性を含めた stemness の増強に関わること、また、癌細胞のみならず炎症細胞の集積にも影響し癌促進的なニッチを作り出すという知見は我々独自のものである。Nrf2 阻害は、特に Nrf2 依存性の耐性化を生じる薬剤との併用で効果が見込まれる。リアルタイムに Nrf2 への依存性を把握できれば、Nrf2 阻害療法を選択すべきかを決定できる。一方、Nrf2 阻害療法は、Nrf2 非依存的な耐性メカニズムの活性化、stemness の低い細胞集団の増加によって無効化される可能性がある。この状態から再び Nrf2 阻害療法を有効治療とするためには、Nrf2 依存性を回復させる他の治療薬への変更が必要である。このようなアプローチを実現するため、Nrf2 依存性の誘導過程を可視化して治療介入がもたらす変化を定量的に評価するという、これまでにない新たな手法を取り入れた。

Nrf2 依存性誘導という観点からの薬剤の分類、癌細胞における Nrf2 依存性の評価という二方向のアプローチで膵癌治療を実現しようとする試みは、他に類を見ない。さらに、様々な癌促進作用が知られている膵星細胞においても有効な治療標的が明らかになれば、膵癌細胞と膵星細胞の両者をターゲットとした dual therapy につながる。ヒト膵癌において薬剤耐性の Nrf2 依存性マーカーが明らかになれば、治療開始時のみならず初期治療後にも耐性化メカニズムに基づくサブグループ特定が可能となり、膵癌治療におけるブレイクスルーとなる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、抗癌剤耐性が Nrf2 活性化に依存した“効く”膵癌の特定による Nrf2 阻害療法対象サブグループ同定と、Nrf2 依存性を人為的に制御することで膵癌細胞の耐性化機序を二極化させ、Nrf2 阻害療法の治療対象拡大により長期間奏功性を担保できる治療戦略を確立することである。すなわち、酸化ストレス応答依存性という新たなパラダイムに基づく膵癌個別化治療の基盤構築である。

## 3. 研究の方法

Nrf2 抑制による膵癌細胞・膵星細胞を標的とした治療介入法の実現に向けて、膵癌細胞・膵星細胞における Nrf2 発現制御法の基盤構築のため以下の検討を行った。

(1)既報にて Nrf2 の枯渇作用を示すことが示されている植物アルカロイド誘導体、ハロフギノンを KPC マウス由来膵癌細胞株に投与し、発現変動遺伝子を同定した。(2)KPC マウス・マウス膵癌細胞移植ヌードマウスへハロフギノンを投与し、ハロフギノン投与で発現が低下する分子、Aldh3a1 の発現を免疫染色で確認した。(3)ハロフギノン投与による抗癌剤感受性の変化を検討し、Aldh3a1 ノックダウン細胞株の抗癌剤感受性を評価した。(4)野生型・Nrf2 欠損膵星細胞株と野生型・Nrf2 欠損膵癌細胞株とのヌードマウス混合皮下移植実験を行い、癌細胞側・膵星細胞側のいずれの Nrf2 が癌進展に寄与するかを明らかにした。(5)Nrf2 活性化状態にある膵癌細胞において、アミノ酸代謝阻害剤に対する感受性を評価した。

## 4. 研究成果

### (1)ハロフギノン投与による発現変動遺伝子の同定

KPC マウス由来膵癌細胞にハロフギノンを投与し、マイクロアレイにて発現変動遺伝子を抽出

した。典型的な Nrf2 標的遺伝子群に加え、既報にて癌幹細胞での発現が報告されている代謝酵素、Aldh3a1 発現の低下がみられた。ハロフギノン処理により、Aldh3a1 発現は mRNA および蛋白レベルの両方で低下していた。

#### (2)KPC マウス・マウス膵癌細胞移植ヌードマウスでのハロフギノンの効果

ハロフギノン投与 KPC マウス膵組織においては、前癌病変である pancreatic intraepithelial neoplasm での Aldh3a1 発現が低下していた。ヌードマウス皮下移植腫瘍では、ハロフギノン投与により皮下腫瘍癌腺管での Aldh3a1 発現が低下していた。

#### (3)ハロフギノン投与・Aldh3a1 ノックダウンによる抗癌剤感受性の変化。

ハロフギノンをマウス由来膵癌細胞に投与したところ、膵癌の標準治療薬であるゲムシタピンへの感受性が亢進し、併用によりアポトーシスの指標である cleaved caspase-3 発現の増加を確認した。マウス膵癌細胞移植ヌードマウスへの投与でも、有意な皮下移植腫瘍の縮小効果を認めた。Aldh3a1 ノックダウン細胞株についても評価を行い、コントロール膵癌細胞株に比べ抗癌剤感受性が増加することが判明した。

#### (4)膵星細胞株・膵癌細胞株の混合皮下移植実験

野生型膵星細胞は混合移植により、野生型 KPC マウス由来膵癌細胞株・Nrf2 欠損 KPC マウス由来膵癌細胞株の両方でヌードマウス皮下移植腫瘍を増大させた。この結果より、腫瘍形成能の増強は膵星細胞側の Nrf2 に一定程度依存すると考えられた。

#### (5)Nrf2 活性化膵癌細胞におけるアミノ酸代謝阻害剤の効果

DEM 処理により Nrf2 活性化を誘導したマウス及びヒト膵癌細胞株においては、glutaminase 阻害剤投与によって有意に細胞生存率が低下することが判明した。この作用は *K-ras* 変異を有する膵癌細胞株で認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Hamada S, Matsumoto R, Tanaka Y, Taguchi K, Yamamoto M, Masamune A.	4. 巻 22
2. 論文標題 Nrf2 Activation Sensitizes K-Ras Mutant Pancreatic Cancer Cells to Glutaminase Inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci .	6. 最初と最後の頁 1870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22041870	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 Nabeshima T, Hamada S, Taguchi K, Tanaka Y, Matsumoto R, Yamamoto M, Masamune A.	4. 巻 318
2. 論文標題 Keap1 deletion accelerates mutant K-ras/p53-driven cholangiocarcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.	6. 最初と最後の頁 G419-427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00296.	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 Tanaka Yu, Hamada Shin, Matsumoto Ryotaro, Taguchi Keiko, Yamamoto Masayuki, Masamune Atsushi	4. 巻 321
2. 論文標題 Nrf2 expression in pancreatic stellate cells promotes progression of cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G378 ~ G388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00120.2021	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 Matsumoto Ryotaro, Hamada Shin, Tanaka Yu, Taguchi Keiko, Yamamoto Masayuki, Masamune Atsushi	4. 巻 379
2. 論文標題 Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Depletion Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine via Aldehyde Dehydrogenase 3a1 Repression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 33 ~ 40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.121.000744	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 Hamada Shin, Matsumoto Ryotaro, Masamune Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 HIF-1 and NRF2; Key Molecules for Malignant Phenotypes of Pancreatic Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 411 ~ 411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14020411	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0件

〔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	濱田 晋  (Hamada Shin)  (20451560)	東北大学・医学系研究科・助教    (11301)	
研究分担者	田口 恵子  (Taguchi Keiko)  (20466527)	東北大学・医学系研究科・准教授    (11301)	

#### 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