

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17429

研究課題名（和文）膵癌間質の多様性制御に基づく新規治療法の開発

研究課題名（英文）Exploring innovative treatment avenues by harnessing the intricate regulation of pancreatic cancer stromal diversity

研究代表者

水谷 泰之（Yasuyuki, Mizutani）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50831393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者による本研究では、がん抑制性線維芽細胞（rCAF）の実態を世界に先駆けて突き止めることに成功し、生体はがんを抑制する「疾患抑制システム」内在している可能性を示した。ヒト膵がん患者の病理組織検体、膵がん自然発症モデル、1細胞解析、培養線維芽細胞を用いて、Meflin陽性CAFが、従来から広く知られていたがん促進性CAF（pCAF）とは異なる線維芽細胞亜群であることを証明した。また、マウスモデルを用いた検証から、がんの進行中にMeflin陽性rCAFが、 α -SMA（平滑筋アクチン）陽性のpCAF（Meflinは陰性又は弱陽性）に形質転換することも報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

約50年前にMichael Stoker博士ら（グラスゴー大学）はポリオーマウイルスによって形質転換されたがん細胞の増殖が線維芽細胞によって抑制されることを示し、私達の体の線維芽細胞の本来の機能はがんの抑制性であることを提唱した。本研究は同博士の仮説を裏付けるものであり、線維芽細胞に関する今後の研究の発展に寄与するものである。

また、本研究によって膵臓がんのCAFの多様性の一部が明らかとなった。現在、がん促進性CAFをがん抑制性CAFに変換する新規治療法の開発が期待されており、本研究はそのための基盤を提供する。

研究成果の概要（英文）：There have long been conflicting views regarding the role of fibroblasts in the development and progression of cancer. While data suggesting that fibroblasts inhibit cancer were published for many years (Dr. Michael Stoker, University of Glasgow, UK, 1966), data suggesting that fibroblasts promote cancer were published in the late 1980s. In this study, we succeeded in identifying cancer-suppressing fibroblasts as proposed by Dr. Stoker, and showed that cancer-suppressing "cancer-restraining fibroblasts (r-CAFs)" may be present in each organ of the body.

研究分野：膵がん

キーワード：Meflin がん抑制性線維芽細胞 rCAF pCAF 膵がん Cancer-Restraining CAF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織はがん細胞だけではなく、がん関連線維芽細胞(Cancer-associated fibroblast :CAF)、骨髄由来の細胞、リンパ球などがん細胞以外の細胞を多く含んでいる。

CAFは細胞外基質の主な構成要素であり、がん細胞の増生や浸潤を促進している。CAFの産生する細胞外基質により促進される間質の線維化や硬化は膵がんのような高悪性度のがんの特徴的であり、がん細胞の悪性化や治療抵抗性を増す。標準的なCAFマーカーである α 平滑筋アクチン(α -SMA)、fibroblast-specific protein1 (FSP1)、fibroblast activation protein (FAP) 陽性CAFの存在とがん患者の予後悪化との間に正の相関を示す論文が多く、*in vitro*や腫瘍移植モデルからCAFは一様にごん発育を促進すると考えられきた。

現在、条件付き遺伝子破壊を利用した詳細な動物実験からCAFは一様にごんを促進するという考えは否定され、CAFには多様性があり少なくともがん促進性CAF (cancer-promoting CAF : p-CAF) とがん抑制性CAF (cancer-restraining CAF : r-CAF) の2種類のCAFが存在すると考えられている。p-CAFに関する報告は多いが、r-CAFの特異的なマーカーたんぱくは未だ見つかっていない。腫瘍の発育に伴いp-CAFとr-CAFが相互変換するかどうかについても不明である。

当研究室は以前に、GPIアンカー型細胞膜タンパク質Meflin (遺伝子名ISLR) が間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem/stromal cell: MSC) に発現していることを発見した。さらにMeflinがMSCの未分化性を維持する機能を持つことを報告した。今回我々は線維芽細胞における未分化性の維持が腫瘍抑制性の本態 (Meflin陽性CAFがr-CAFの本態である) との仮説をたて、MeflinおよびMeflin陽性CAFの膵がん発育における役割について検証を行った。

2. 研究の目的

Meflin陽性線維芽細胞ががん抑制性線維芽細胞 (Cancer Restraining CAF) であることを証明する。

3. 研究の方法

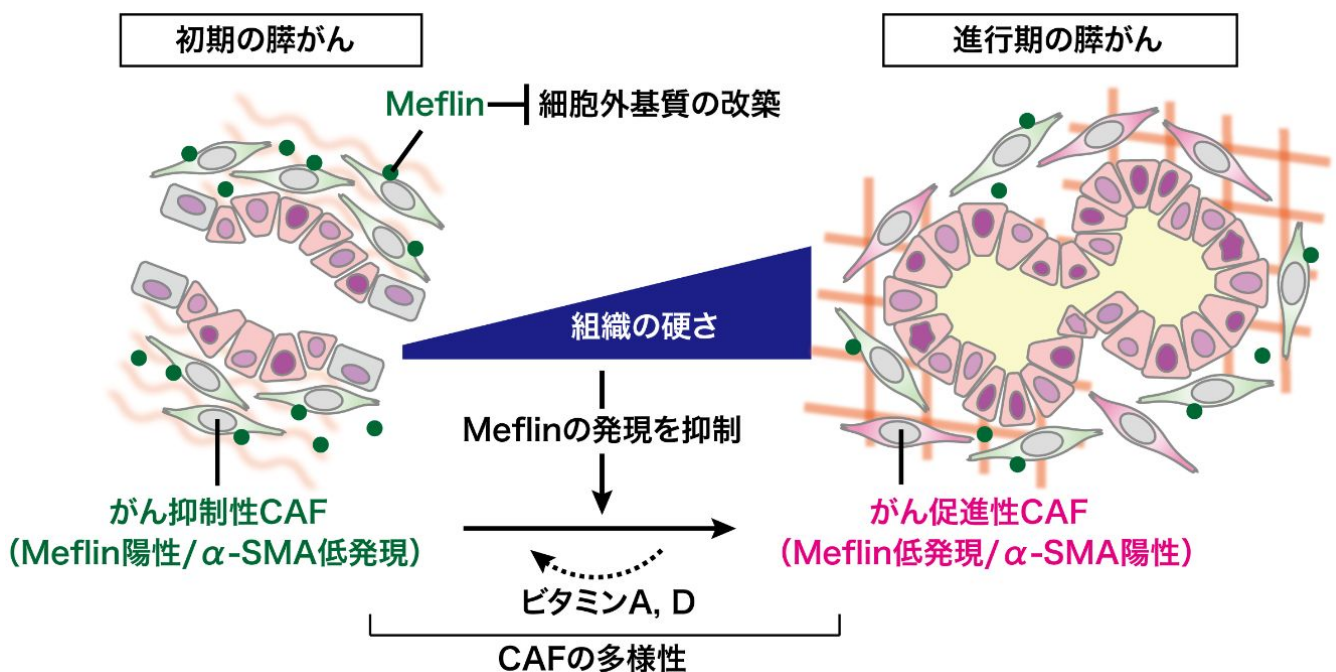
In situ hybridization (ISH) 法を用いてヒトおよびマウス正常膵におけるMeflinの発現を調べた。次にヒトおよびマウス膵星細胞 (Pancreatic stellate cells : PSC) を使用して、ウェスタンブロッティング法でMeflinの発現を検出した。野生型マウス (WT) とMeflin欠損マウス (Meflin-KO) から樹立した初代培養PSCにビタミンD誘導体のCalcipotriolを添加してMeflinおよび α -SMAの発現動態の変化を検出した。ヒト膵がん手術検体を使用してISH法で組織上のMeflinの発現を検出し、高発現・低発現群 (間質細胞の20%をカットオフ値と設定) にわけて予後を調査した。Meflin-KOマウスと膵がん自然発症マウスモデル (KPC : Kras G12D/P53 R172H/PDX1-Cre) を掛け合わせてWT-KPCおよびMeflin-KO KPCの予後および表現型を調べた。またMeflin-KO KPCマウスからオルガノイドを樹立してマウス膵へ同所性移植し発育を観察した。Meflinプロモーター支配下にCreリコンビナーゼを発現するレポーターマウス (Meflin-ZsGreen-DTR (ヒトジフテリアトキシンレセプター) - Cre: Meflin-ZDC) を使用して、Xenograftモデルにおいてジフテリアトキシンを投与しMeflin陽性細胞特異的に細胞死を引き起こさせ腫瘍の悪性度の変化を観察

した。次に細胞系譜解析 (Meflin-CreERT2 に対して Xenograft を作成) を行い腫瘍進展での Meflin 陽性細胞のマーカ分子の変遷を観察した。Meflin を overexpression させることで、線維芽細胞の形質変化を観察した。最後に WT-KPC, Meflin-KO KPC のがん間質におけるコラーゲンの配向を第二高調波顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

正常膵において Meflin が膵がんの CAF の起源である PSC に特異的に発現していることを見いだした。PSC にビタミン D を投与することで Meflin の発現が上昇することからも Meflin が PSC のマーカーであることが支持された。さらにビタミン D は Meflin を介して CAF の α -SMA (p-CAF の代表的なマーカー) の発現を下げることで (Reprogram; 間質の形質変換) を示した。次に、Meflin は膵臓がんの CAF の一部の群に発現していることを見いだした。また、CAF において α -SMA と Meflin の発現が互いに負の相関を示すことを見いだした。

術後膵臓がん患者の標本において、Meflin 陽性 CAF の量の多さは良好な生存率と有意に関連した。Meflin-KO KPC の膵臓がんは野生型 KPC と比較しより未分化度で予後不良であることを見出した。興味深いことに、Meflin-KO KPC では、野生型 KPC と比較して低分化型の膵臓がんが高頻度にも出現することも判明した。膵臓がんオルガノイドを膵臓に同所性移植すると同様に分化度の低い腫瘍が発育した。KPC から樹立した膵臓がん細胞株を ZDC マウスに皮下移植して Meflin 陽性細胞を特異的に除去したところ、非投与群と比較しより未分化な腫瘍ができた。また、Meflin 陽性細胞の細胞系譜解析をしたところ、皮下移植された膵臓がんの進行に伴って、Meflin 陽性 CAF が別のタイプの CAF に分化することも見出した。最後に、Meflin を線維芽細胞において過剰発現させると α -SMA を抑えること、移植実験で膵臓がんセルラインの増殖を抑制する効果がみられることを見いだした。第二高調波顕微鏡を用いた検証から、Meflin 分子の機能は間質の硬化やがん細胞の悪性化に結びつく細胞外基質の改築 (リモデリング) の抑制であることも判明した。



以上の結果は、Meflin 陽性 CAF はこれまで本態が不明であったがん抑制性 CAF である可能性を示している。

約 50 年前に Micheal Stoker 博士ら（グラスゴー大学）はポリオーマウイルスによって形質転換されたがん細胞の増殖が線維芽細胞によって抑制されることを示し、私達のからだの線維芽細胞の本来の機能はがんの抑制性であることを提唱した。本研究は同博士の仮説を裏付けるものであり、線維芽細胞に関する今後の研究の発展に寄与するものと推察される。

また、がんの間質に存在する免疫細胞の多様性は多くの研究の対象となってきたが、CAF の多様性の解析はこれまで不十分であった。本研究によって膵臓がんの CAF の多様性の一部が明らかとなった。現在、がん促進性 CAF をがん抑制性 CAF に変換する新規治療法の開発が期待されているが、本研究はそのための基盤を提供するものと考えられる。

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 1件）

1. 著者名 Mizutani Y, Iida T, Ohno E, Ishikawa T, Kinoshita F, Kuwatsuka Y, Imai M, Shimizu S, Tsuruta T, Enomoto A, Kawashima H, Fujishiro M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Safety and efficacy of MIKE-1 in patients with advanced pancreatic cancer: a study protocol for an open-label phase I/II investigator-initiated clinical trial based on a drug repositioning approach that reprograms the tumour stroma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-09272-2	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 Mizutani Yasuyuki et al	4. 巻 79
2. 論文標題 Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5367 ~ 5381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-19-0454	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 -

〔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 水谷泰之, 川嶋啓揮, 藤城光弘
2. 発表標題 抑制性癌関連線維芽細胞の同定と治療薬の開発
3. 学会等名 JDDW
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 水谷泰之, 飯田忠, 石川卓哉, 大野栄三郎, 川嶋啓揮, 藤城光弘, 榎本篤	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学図書出版	5. 総ページ数 4
3. 書名 胆と膵	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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