

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08300

研究課題名(和文) Nrf2依存的リプログラミングを標的とした膵癌新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for pancreatic cancer targeting Nrf2-dependent reprogramming

研究代表者

濱田 晋 (Hamada, Shin)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20451560

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)：膵特異的変異K-ras発現とNrf2持続活性化がもたらす細胞死のメカニズムを解明し、新たな膵癌治療標的を見出すために検討を行った。恒常的にNrf2活性化を来した膵癌細胞株において、グルタミンナーゼ阻害剤投与により細胞生存率が有意に低下することを確認した。Nrf2の恒常的活性化により多数のSLCファミリー遺伝子の発現増加を認めた。遺伝子改変膵癌モデルマウス、膵炎モデルマウスを用いてNrf2関連分子の発現変化を免疫染色にて確認し、活性化の指標となる分子を同定した。膵癌細胞においてはアミノ酸代謝が、間質細胞においてはNrf2阻害により抑制されるアミノ酸代謝以外の癌促進作用が治療標的と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌はその殆どがK-ras変異を有しているにも関わらず、K-rasを標的とした治療は有効治療となっていない。我々は先行研究で、膵特異的変異K-ras発現に酸化ストレス応答の中核分子であるNrf2の恒常的活性化が加わることで膵実質の進行性萎縮を来すことを示した。この現象を規定する細胞内代謝の変化を解明し、膵癌細胞においてもNrf2持続活性化を誘導することで細胞死が誘導される、いわば「アキレス腱」を見出すことができれば、全く新しい膵癌治療への道が開ける。本研究の目的はヒトおよびマウス膵癌細胞における新たな細胞死誘導法の開発により膵癌新規治療の基礎を築くことである。

研究成果の概要(英文)：We performed following experiments to identify the cell death-inducing mechanism by mutant K-ras and continuous Nrf2 activation. We confirmed the sensitization to glutaminase inhibition in Nrf2-activated pancreatic cancer cells. Constitutive activation of Nrf2 increased expressions of SLC family genes. We assessed expressions of Nrf2 target molecules in genetically engineered mouse models of pancreatic cancer and pancreatitis. Amino acid metabolism in pancreatic cancer cells and other cancer promoting effects of stromal cells are considered as therapeutic targets.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌

## 1. 研究開始当初の背景

生体の酸化ストレス応答を司る Keap1-Nrf2 経路の活性化は正常組織の恒常性維持に不可欠であるが、消化器癌を含む多くの癌においては癌進展促進に働く。典型的な活性化機構は Nrf2 の変異による分解抵抗性の獲得や Nrf2 分解を促進するアダプター蛋白、Keap1 の機能喪失変異であり、肺癌や食道癌では変異の存在が抗癌剤感受性や予後を規定している。我々は変異 K-ras・p53 発現による膵発癌モデルマウス (KPC 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、Nrf2 欠損膵癌細胞が酸化ストレス誘導剤、抗癌剤へ感受性となることを見出した。しかしながら、KPC マウスへ Keap1 コンディショナルノックアウトを付加したモデルでは膵発癌の促進効果はみられず、むしろ進行性の膵萎縮を来すことを確認した (Hamada, 2018)。先行研究で得られた知見は Nrf2 が欠損した膵癌細胞はゲムシタピンや酸化ストレスに脆弱である一方、恒常的な Nrf2 活性化は変異 K-ras による癌進展を妨げる、という一見相反する結果であった。

肺癌細胞では変異 K-ras 発現と Nrf2 活性化によりアミノ酸代謝経路が変化し、グルタミンやアスパラギンへの依存性やアミノ酸枯渇への脆弱性を来すことが判明している (Gwinn, 2018)。膵における変異 K-ras 発現と Keap1 欠損による Nrf2 活性化は正常膵組織で同様の変化を引き起こし、膵組織の萎縮につながった可能性がある。しかしながらこれらの現象について、Nrf2 活性化が細胞機能のリプログラミングを引き起こすしきい値や肺癌細胞が通常条件下で細胞死を防ぐメカニズム、膵癌細胞で同様の現象がみられるかは未解明である。ヒト膵癌は約 95% に K-ras 変異を有しており、生存に不利となる Nrf2 活性化の程度・細胞機能の変化が判明すれば Nrf2 活性化剤による誘導が治療的意義を持つ。Nrf2 阻害による従来型抗癌剤の作用増強に加えて、新たな治療アプローチが可能となれば有用性は大きい。本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「K-ras 変異と Nrf2 持続活性化がもたらす細胞死は膵癌治療に応用できるか」である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、先行研究で見出した膵特異的変異 K-ras 発現と Nrf2 持続活性化がもたらす細胞死のメカニズムを解明し、新たな膵癌治療アプローチに応用することである。本研究計画の中核となる治療法開発コンセプトは以下のとおりである。

- ・ヒト膵癌ではほぼ全例で K-ras の活性化型変異がみられ、均一性が高い
- ・Nrf2 活性化は経口投与可能な薬剤で実現可能である
- ・癌遺伝子変異がない正常組織への影響は少ない可能性が高い

以上のポイントは治療応用を考えた際に大きなメリットとなる。

## 3. 研究の方法

本研究では膵特異的変異 K-ras 発現と Nrf2 持続活性化がもたらす細胞死のメカニズムを解明し、新たな膵癌治療標的を見出すために以下の検討を行った。

(1) 変異 K-ras を発現する膵癌マウスモデル由来細胞株を用いて、酸化ストレス応答亢進による代謝リプログラミングについて検討を行った。野生型・Nrf2 欠損・Keap1 欠損・Nrf2/Keap1 欠損 KPC マウスから樹立した細胞株を用いて、アミノ酸代謝経路の阻害剤への感受性を検討した。

(2) Keap1 欠損により恒常的に Nrf2 活性化を来した膵癌細胞株において、Keap1・Nrf2 欠損膵癌細胞とで発現変動遺伝子の比較を行った。

(3) 膵癌モデルマウスである KPC マウス、膵腺房細胞の脱落と線維化を来す膵特異的 Spink1 ノックアウトマウスを用いて、Nrf2 の標的分子発現に変化がみられるかを免疫染色にて確認した。

## 4. 研究成果

(1) Keap1 欠損により恒常的に Nrf2 活性化を来した膵癌細胞株において、阻害剤投与により細胞生存率が有意に低下することを確認した。野生型膵癌細胞において酸化ストレス誘導剤であるマレイン酸ジエチル投与後に阻害剤処理を行った場合でも同様に細胞生存率は低下し、Keap1 欠損による恒常的な活性化のみならず、薬剤による Nrf2 活性化によってもアミノ酸依存性が誘導可能であることが判明した。更に、K-ras 変異を

有するヒト膵癌細胞株についてもマレイン酸ジエチル処理を行うことでアミノ酸依存性が誘導可能であることを確認した。K-ras 変異を持たない細胞株ではこのようなアミノ酸依存性の誘導は起こらず、K-ras 変異を有する膵癌細胞での酸化ストレス応答活性化により新たな治療介入が可能になると考えられた。

(2) Nrf2 の恒常的活性化により多数の SLC ファミリー遺伝子の発現増加を認めたが、glutaminase 自体の発現増加や、Nrf2 標的遺伝子であるグルタミン・システイン交換輸送体をコードする SLC7A11 遺伝子の発現増加は認められなかった。

(3) 膵特異的 Spink1 ノックアウトマウスの膵腺房細胞脱落部分の間質細胞においては heme oxygenase 1 発現が増加しており、酸化ストレスの増加・Nrf2 活性化による変化が考えられた。一方、xCT 発現レベルには変化を認めなかった。変異 Kras 発現により Nrf2 活性化が起こる KPC マウス膵組織においても両者の発現レベルを評価したところ、前癌病変である pancreatic intraepithelial neoplasm においては xCT 発現が増加していたが、周囲の間質細胞では heme oxygenase-1 発現が亢進していた。野生型マウス膵星細胞を Nrf2 阻害剤である halofuginone 100nM で処理後、培養上清を用いて KPC マウス膵癌細胞を刺激したところ、コントロール処理に比べ増殖促進作用が減弱することを確認した。膵癌細胞においてはアミノ酸代謝が、間質細胞においては Nrf2 阻害により抑制されるアミノ酸代謝以外の癌促進作用が治療標的と考えられ、今後さらなる検討を要する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 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 -

〔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	正宗 淳  (Masamune Atsushi)  (90312579)	東北大学・医学系研究科・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