

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09058

研究課題名(和文) 膵癌におけるPD-L1/PD-1クロストークが癌細胞に与える影響

研究課題名(英文) Impact of PD-L1/PD-1 crosstalk on cancer cell in pancreatic ductal carcinoma

研究代表者

今井 克憲 (Imai, Katsunori)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：60555746

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)：膵癌細胞株においてリコンビナントPD-1添加による遺伝子やタンパク発現の変化の変化を検討したが、明らかな発現変化を確認することはできなかった。膵癌細胞株においてPD-L1の過剰発現株を作成し実験に用いたが、明らかな変化を観察することができなかった。一方、Mock株と過剰発現株ではVimentinやCadherinといったEMT関連マーカーや、CD133、CD44といった幹細胞マーカーの発現に変化が認められた。さらに、PD-L1の高発現が抗癌剤耐性にも寄与していることが示唆された。これを踏まえ、現在PD-L1発現とEMT、癌幹細胞、および抗癌剤耐性機序の関連について実験を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は膵癌におけるPD-1/PD-L1の詳細なクロストークを解明することであるが、PD-L1からPD-1へのシグナルではなく、PD-1からPD-L1の逆シグナルを検証し、これが膵癌細胞の増殖や浸潤・転移に与える影響を解明することができれば、難治癌の代表である膵癌治療において、免疫チェックポイント阻害剤の治療成績向上、有用なバイオマーカーの同定、ひいては新たな創薬へと繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the changes of phenotypes including gene and protein expression on pancreatic cancer cell lines by adding recombinant PD-1, however, significant changes were not observed. We thought it could be due to less expression of PD-L1 on pancreatic cancer cell membrane, so we conduct PD-L1 overexpression cells and used in this study. Similarly, however, significant changes were not confirmed between PD-L1 overexpression and Mock cells by adding recombinant PD-L1 protein.

On the other hands, on PD-L1 overexpression cells, EMT-related genes such as Vimentin or Cadherin and cancer stem cell-related genes such as CD133 or CD44 were overexpressed compared to Mock cells. In addition, PD-L1 overexpression cells were significantly associated with cancer drug resistance. Therefore, now we are investigating the details of relationship between PD-L1 expression and EMT, cancer stemness, and cancer drug resistance.

研究分野：消化器外科学、肝胆膵外科学、腫瘍免疫学、腫瘍分子生物学

キーワード：膵癌 免疫チェックポイント PD-1 PD-L1 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

膵癌は消化器癌の中でも最も予後不良な癌の一つであり、外科的切除の他、化学療法や放射線療法も飛躍的に進歩しているが、いまだ満足いく成果は得られておらず、新規治療法の開発が急務である。近年免疫チェックポイント分子をターゲットとした抗腫瘍免疫療法が開発され臨床応用されており、様々な癌腫で良好な成績が報告されている。しかし効果が認められる症例は依然少数であり、効果発現の機序も不明な点が多い。特に膵癌においては効果が低く、これを打破する工夫が必要である。免疫チェックポイント機構に関しては、癌細胞に発現する PD-L1 から PD-1 へのシグナルが免疫応答を抑制させる機構については解明が進んでいるが、その逆の、免疫担当細胞の PD-1 からのシグナルが PD-L1 を介して癌細胞に与える影響については不明である。

2. 研究の目的

膵癌において、癌細胞における PD-L1 の発現が予後と相関することが知られている (Cancer Res 2007)。しかしながら、膵癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の臨床試験の結果は他の癌腫に比較して良好な治療効果が得られておらず、これを打破する工夫が必要である。特に、免疫チェックポイント阻害剤に代表されるような、PD-L1 から PD-1 へのシグナルが T 細胞の免疫応答を抑制させる機構に関しては解明が進んでいるが、PD-1 からのシグナルが PD-L1 を介して癌細胞に与える影響については不明な点が多い。本研究では、膵癌の PD-1/PD-L1 の発現と臨床病理学的因子や予後、薬剤感受性との関連を検索するとともに、膵癌の免疫学的微小環境における PD-1 分子からのシグナルが膵癌細胞の PD-L1 の発現や、膵癌細胞そのものに与える影響について解明することを目的とする。膵癌における PD-1/PD-L1 のより詳細なクロストークが解明されれば、免疫チェックポイント阻害剤の治療成績向上、有用なバイオマーカーの同定、ひいては新たな創薬へと繋がるのが期待される。

3. 研究の方法

(1) 可溶性 PD-1 添加による膵癌細胞株の phenotype の変化の検証

PD-L1 高発現株である PK59 と、PD-L1 低発現株である PANC1 の膵癌細胞株に、recombinant human PD-1 protein を添加して培養し、proliferation assay、invasion assay、migration assay を行い、増殖能、浸潤能、遊走能の変化を検証する。続いて、PD-1 添加により癌細胞株の PD-L1 の発現に変化をもたらすかどうかを検証する。さらに、PD-L1 低発現株に PD-L1 分子を強制発現させ、PD-1 添加による phenotype の変化も併せて検証する。

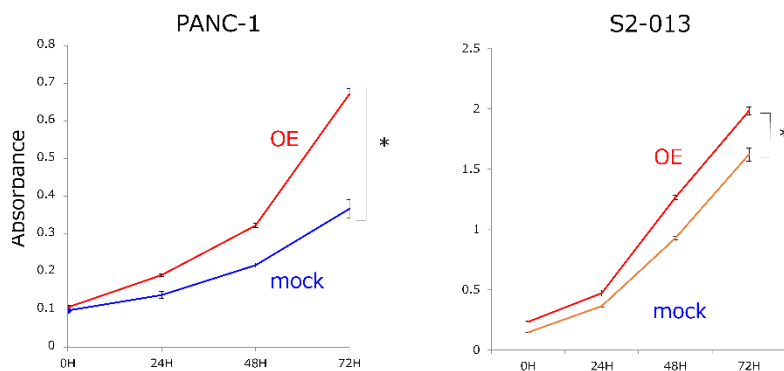
(2) PD-L1 強制発現株の作成と遺伝子発現・phenotype の変化の検証

PD-L1 強制発現膵癌株を作成し、遺伝子発現・phenotype の変化を、特に EMT marker や癌幹細胞マーカーに着目して検証し、PD-1/PD-L1 シグナルと癌細胞の悪性化獲得機序について明らかにする。

4. 研究成果

膵癌細胞株においてリコンビナント PD-1 添加による遺伝子やタンパク発現の変化の検証したが、明らかな発現変化を確認することはできなかった。膵癌細胞株において PD-L1 の過剰発現株を作成したところ、過剰発現株で細胞増殖が有意に増加することが示された (図 1)。

a) Growth assay (using CCK8)



Both PANC-1 and S2-013 showed a significant increase in growth in the OE cells.

図 1 PD-L1 過剰発現株における細胞増殖の検討

また、PD-L1 過剰発現株では EMT 関連タンパクに変化を認めることが示された (図 2)。

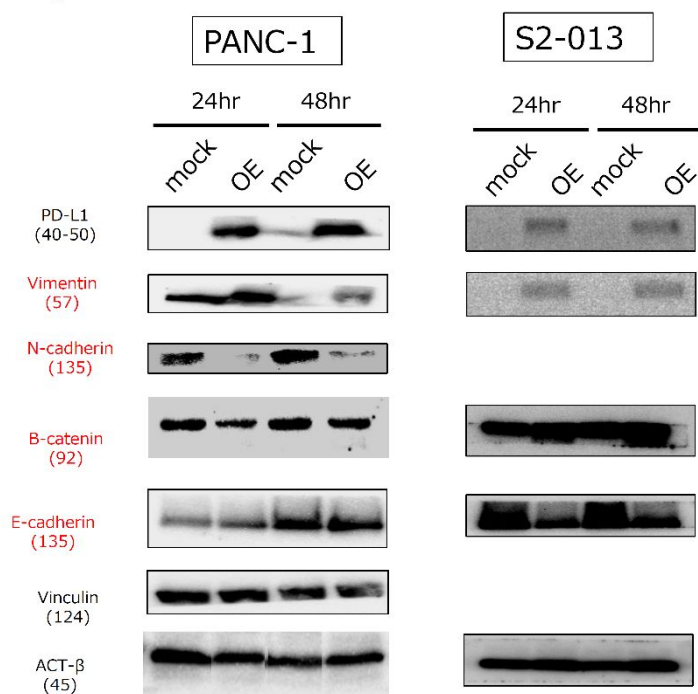


図 2 PD-L1 過剰発現による EMT 関連タンパクの発現変化

現在、この過剰発現株を用いて RNA sequence を行い、その解析を行っている。また、抗癌剤耐性機序に着目し、5-FU や Gemcitabine 等の膵癌の key drug における薬剤耐性について検証をすすめている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	山下 洋市 (Yamashita Youichi) (00404070)	株式会社麻生(株式会社麻生飯塚病院医学研究推進本部)・ 外科・部長 (17401)	
研究分担者	岡部 弘尚 (Okabe Hirohisa) (40573621)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員 (17401)	
研究分担者	山尾 宣暢 (Yamao Takanobu) (70836337)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員 (17401)	

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