

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17672

研究課題名(和文)細胞外マトリックス阻害による腫瘍免疫活性化を目指した新規膵癌治療戦略

研究課題名(英文)The accumulation of extracellular matrix induces immunosuppressive microenvironment and treatment resistance in pancreatic cancer

研究代表者

青木 修一 (Aoki, Shuichi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30844451

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)：当科で術前化学療法(NAT)後に切除を行った膵癌において、治療効果有り/無し例の切除サンプルを用いた網羅的RNA発現解析をnCounter Analysisにて行うと、無し群ではMET, LAMB2, COL17A1の発現亢進を認め、MET高発現症例は術後肝転移再発を有意に認め予後不良であった。CRISPR/cas9を用いたMET阻害膵癌細胞株の三次元培養では、YAP-CTGF pathwayの不活化、Collagen Iなどの細胞外マトリックスの発現低下を認めた。マウスモデルではMET阻害により肝転移抑制効果を認め、低酸素環境の改善による腫瘍内浸潤CD8 T cellの増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の術前化学療法を行っても、MET高発現膵癌はMET-YAP-CTGF経路による細胞外マトリックス産生や細胞接着の亢進により、肝転移を誘導し治療耐性をもたらす。MET阻害による細胞外マトリックス産生の低下は、低酸素環境の改善による癌微小環境の再構築をもたらす。抗腫瘍免疫の活性化につながる。MET阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤との併用は、既存の化学療法より優れた治療効果をもたらす可能性があり、膵癌術前治療の新たな治療戦略となり得る。

研究成果の概要(英文)：We performed nCounter Analysis, a novel integrated RNA sequence technique, using resected pancreatic cancer samples after preoperative chemotherapy (NAT) at our department. The expression of MET, LAMB2, and COL17A1 was significantly increased in the treatment-resistant group, and patients with high MET-expression significantly occurred postoperative liver metastasis and showed poor prognosis. We established MET-knockout pancreatic cancer cell lines by CRISPR/cas9 method. In 3-D culture, MET-knockout inactivated YAP-CTGF pathway and decreased expression of extracellular matrix such as Collagen I. In an orthotopic mouse model, MET inhibition suppressed liver metastases and reduced accumulation of extracellular matrix within tumor. Finally, MET inhibition increased the infiltrated CD8 T cells within the tumor by improving the hypoxic environment to normoxia.

研究分野：Surgical oncology

キーワード：tumor microenvironment pancreatic cancer immunotherapy extracellular matrix hypoxia

1. 研究開始当初の背景

切除可能膵癌における術前化学療法(Neoadjuvant therapy:NAT)の有用性が明らかとなり、一定期間の NAT 後に外科的切除を行うことが標準治療となった。しかし、NAT の治療効果は不均一で、NAT に治療耐性を示す症例の予後は不良である。

2. 研究の目的

NAT の治療耐性をもたらす分子病理学的機構を明らかにし、耐性克服に向けた新たな術前化学療法の戦略を提唱する。

3. 研究の方法

(1) 近年開発された FFPE サンプルを用いた網羅的 RNA 発現解析技術である、nCounter Analysis を用いて、NAT 後の膵癌微小環境の発現変化を検討した。2007 年から 2018 年の間、NAT 後切除した膵癌症例において治療効果を認めた 13 例(Evans 分類 IIB 以上)と治療耐性 13 例(Evans 分類 I 以下)の nCounter Analysis を施行し、耐性群に有意な遺伝子発現や pathway を明らかにする。その発現と臨床病理学的因子を比較検討する。

(2) (1)で認められた有意な発現タンパクを標的として、CRISPR/cas9 を用いた発現阻害細胞株を作成する。3D 培養下で発現阻害による下流シグナルの変化や現象の変化を検討する。さらに同種マウスモデルを用いて、腫瘍増殖能やマウス生存を比較検討し、腫瘍組織の免疫組織学的検討から、微小免疫環境の変化を検討する。

4. 研究成果

(1) 耐性群では癌のドライバー遺伝子である *MET* や、細胞外マトリックスと関連する *LAMB2*, *COL17A1* の有意な発現亢進を認め、GO 解析では細胞接着に関する Hemidesmosome assembly の亢進を認めた。同期間に手術先行で手術した、もしくは NAT 後に切除した膵癌 308 例において、*MET* 発現による予後解析を行うと、手術先行群では *MET* 発現による予後の差を認めず、NAT 施行例では、*MET* 高発現は低発現に比べ全生存期間や無再発生存期間において有意に予後不良であった($p=0.002$, 0.003)。術後再発部位では、*MET* 高発現症例は有意に肝転移再発を認め($p=0.035$)、肝転移切除サンプルでは、転移巣は原発巣に比べ *MET* が高発現していた。以上より、*MET* の発現は手術先行群では有意な予後因子ではなく、NAT 治療群において有意な予後因子であり、治療耐性に関与することは分かった。*MET* 以外にも細胞外マトリックスの発現が NAT 治療耐性に関与することが明らかとなった。

(2) *MET* の発現阻害細胞株(*MET*-KO)を 3D 培養すると、spheroid の形成不全を認め、下流シグナルの網羅的解析では、*MET* シグナル阻害による YAP の核内移行、および CTGF、Collagen I の細胞外マトリックスの発現低下を認めた。同種膵癌肝転移マウスモデルでは、*MET* 阻害による肝転移抑制効果を認め、*MET* 阻害剤と Gemcitabine との併用により優れた治療効果を認めた。肝転移巣の RNA 解析では、*MET*-KO によ

る細胞外マトリックスの発現低下や低酸素環境の改善を認め、免疫組織学的評価では、MET-KO による regulatory T cell の腫瘍内浸潤の抑制および CD8 T cell の腫瘍内浸潤の増加、PD-L1 の発現増強を認め、抗腫瘍免疫の賦活化を認めた。同マウスモデルを用いて、MET 阻害剤と anti-PD1 antibody の併用による肝転移抑制効果を現在実験中である。以上より、*MET* 高発現膵癌は MET-YAP-CTGF 経路による細胞外マトリックス産生や細胞接着の亢進により、肝転移を誘導し治療耐性をもたらすことが明らかとなった。MET 阻害剤による微小環境の再構築が抗腫瘍免疫の活性化をもたらす、膵癌術前治療において、MET 阻害と免疫療法との併用による新規治療の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青木修一
2. 発表標題 膵癌術前治療の耐性克服に向けた新展開
3. 学会等名 第122 回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木修一
2. 発表標題 肝内胆管癌においてMET signal は免疫抑制的微小環境を誘導する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuichi Aoki
2. 発表標題 Transcriptome analyses to characterize treatment resistance to neoadjuvant therapy for pancreatic cancer
3. 学会等名 The 26th International Association of Pancreatology
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiroyuki Isayama	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 324
3. 書名 Management of Pancreatic Cancer and Cholangiocarcinoma	

〔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			
米国	Harvard Medical School			
ドイツ	University Hospital Cologne			