

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19743

研究課題名（和文）膵臓ガン克服に向けた免疫チェックポイント阻害療法の問題点の解決

研究課題名（英文）Improvement of immune checkpoint inhibition therapy for the treatment of pancreatic cancer

研究代表者

小林 聡（Kobayashi, Akira）

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：50292214

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、膵臓ガンにおいて転写因子NRF3が乳酸産生を誘導する可能性を解析し、その阻害が与えるT細胞への影響を解明し、免疫チェックポイント阻害療法を奏功させる新たな治療法を開発する点にあった。しかしながら今回、残念ながら膵臓ガンにおける乳酸合成酵素LDHAの発現において、NRF3は転写誘導するが、タンパク質レベルの発現は増加させないことがわかった。これはLDHAタンパク質自体が正常時から高発現しているためと考察した。その代わりに、膵臓ガンの増殖にNRF3がきわめて重要な機能をもつことを発見した。この予想外の結果は、NRF3が難治性である膵臓ガンの新たな治療ターゲットになることを意味する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学の発展により、がんは早期発見されれば治療できる疾患になりつつあるが、膵臓がんは未だに5年生存率が10%を切り、難治性のままに至っている。したがって膵臓ガンの克服は喫緊の課題になっている。膵臓がんが難治性である要因の1つに、奏功する抗がん剤が少ない点にある。したがって本研究成果は、膵臓ガンの新たな治療ターゲット候補として、NRF3が有用であることを意味する。NRF3の転写因子としての活性はタンパク質切断酵素DDI2により制御されていることから、DDI2阻害剤はNRF3の阻害を介した膵がん治療薬につながる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this investigation was to examine the plausibility of the transcription factor NRF3's capacity to promote lactate production in pancreatic cancer, explore the impact of its suppression on T cells, and develop a novel treatment approach to address immune checkpoint inhibition therapy. Unfortunately, our findings have demonstrated that NRF3 enhances the mRNA expression but fails to augment the protein-level expression of the lactate synthase LDHA in pancreatic cancer. This is because of the substantial expression of the LDHA protein in normal cells. Instead, our study has uncovered a critical role of NRF3 in pancreatic cancer growth. This unexpected outcome implies that NRF3 could serve as a fresh therapeutic target for refractory pancreatic cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん 代謝 LDHA NRF3 膵臓がん 乳酸 CTGF 腫瘍悪性化機構

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、膵臓ガンの乳酸産生メカニズムを解明し、その阻害を与える T 細胞への影響を解明することで、免疫チェックポイント阻害療法を奏功させる新たな治療法を開発する点にある。ノーベル生理学医学賞を授与された免疫チェックポイント阻害療法 (以後、ガン免疫療法とよぶ) はガン治療に革命をもたらしたが、奏功しないガンも多い。例えば、膵臓ガンは大量に乳酸を分泌することで攻撃してきた T 細胞や NK 細胞等を不活化するため、同治療法が奏功しない (Brand A (2016) Cell Metabolism)。したがって膵臓ガンの乳酸産生メカニズムを解明し、これを阻害する薬剤を開発すればガン免疫療法の膵臓ガン治療効果を高めるはずである。しかし現時点では、そのような薬剤はまだ開発できていない。

2. 研究の目的

我々は、膵臓がんにおける乳酸合成酵素 LDHA の発現誘導が転写因子 NRF3 により制御されている可能性を見出した。そこで本研究では、そのメカニズムを詳細に解明し、NRF3 の阻害による T 細胞を再活性化するという、膵臓ガン治療におけるガン免疫療法の問題点を克服することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞レベルの解析

膵臓がん細胞における NRF3 の機能を解明するために、ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞を培養し、NRF3 標的遺伝子の発現をマクロアレイ解析、RT-qPCR、ウエスタンブロットで測定した。また同細胞の NRF3 をノックダウンさせた細胞株を樹立した。

(2) 免疫不全マウスへの異種移植実験

膵臓がんにおける NRF3 の機能をマウス個体レベルで検証するために、上述した NRF3 ノックダウン PANC-1 細胞を免疫不全マウスの膵尾に移植した。形成された腫瘍を組織学的に解析した。

4. 研究成果

(1) NRF3 による LDHA 遺伝子発現制御機構

ヒト膵臓がん由来 PANC1 細胞において siRNA で NRF3 をノックダウンしたことで、発現低下する遺伝子をマイクロアレイ解析で網羅的に同定した。その結果、乳酸合成酵素 LDHA の発現が低下することを見出した。発現変動解析の定量性をあげるためにリアルタイム PCR も行い、およそ半分以下に低下することを確認した。しかしながら NRF3 ノックダウンしても、残念なことに LDHA タンパク質の量に顕著な変動はなかった。考察するに、LDHA は細胞の代謝に重要な機能をもつタンパク質であることから、細胞内に非常に大量にタンパク質が発現しており、またタンパク質としても比較的安定であるために、NRF3 ノックダウンにより LDHA mRNA が低下しても、LDHA タンパク質の量の変動には至らないと考えた。この考察は、膵臓がん細胞が LDHA 誘導による大量な乳酸の分泌を介して、T 細胞などの免疫細胞を疲弊させ攻撃を回避しているという論文 (Brand A (2016) Cell Metabolism) の知見とは食い違う。その要因はまったく不明であるが、本仮説は反証されたため、このプロジェクトを中止した。

(2) NRF3 阻害剤である HIV 治療薬のドラッグリポジショニング

近年、我々は NRF3 が腫瘍増大ならびに悪性化に関わることを報告している (Kobayashi A. (2021) Cancers)。したがって NRF3 の機能阻害は、新たながん治療につながる可能性が高い。NRF3 は通常小胞体にアンカーされ、さらに小胞体関連タンパク質分解機構 ERAD によりタンパク質分解されている。そして、まだ未同定であるが生体の NRF3 活性化シグナルにより、NRF3 はタンパク質切断酵素 DDI2 による切断を受けることで一連の抑制機構を回避し、様々な遺伝子を発現誘導し、腫瘍増大・悪性化をもたらす。ここで DDI2 の阻害剤としては、HIV プロテアーゼ阻害剤である同疾患の治療薬である nelfinavir が利用可能である。なぜなら DDI2 と HIV プロテアーゼの触媒ドメインは相同性が高いため、nelfinavir は DDI2 のタンパク質切断活性を阻害する。したがって nelfinavir は NRF3 を抑制することが強く期待される。実際、メラノーマ細胞において、nelfinavir は NRF3 によるメラニン産生を抑制することを我々は見出している (Waku T. (2023) Cell reports)。これは HIV 治療薬から NRF3 が作用するがんに対する治療薬というドラッグリポジショニングに当たる。

そこで nelfinavir 添加により、膵臓がんにおける NRF3 の機能阻害が可能か検証した。しかしながら、nelfinavir 投与により NRF3 タンパク質の抑制が確認できたが、予想外に膵臓がん細胞における NRF3 標的遺伝子の 1 つである CTGF 等の発現は低下しなかった。さらに NRF3 による浸潤能の抑制も観察できなかった。この結果は、おそらく nelfinavir 投与により NRF3 は抑制されるが、関連因子である NRF2 が活性化し、NRF3 の機能低下をレスキューする可能性が考えられた。よって、このプロジェクトに関してもここで中止した。

(3) NRF3 による膵臓の腫瘍悪性化機構の解明

以上の実験 (1)、(2) の結果から研究プロジェクトの方向性を再考し、NRF3 による膵臓の腫瘍悪性化機構の解析にフォーカスを絞った。

まず NRF3 による膵臓の腫瘍悪性化を *in vivo* で証明するために、NRF3 ノックダウンさせた膵臓がん細胞を免疫不全マウスの膵尾に移植する実験を行った。移植細胞として、恒常的 NRF3 ノックダウン PANC-1 細胞 (図 1 左、shNRF3 PANC-1 #1, 2) を樹立した。上記細胞において、NRF3 とその下流遺伝子である CTGF の mRNA およびタンパク質の発現が、コントロール細胞 (shCtrl PANC-1) と比較して有意に低下していることを確認した。さらに NRF3 ノックダウン細胞の細胞増殖能について測定

した結果、増殖能に影響がないことを確かめた。以上の結果から、*in vitro* の通常培養では NRF3 ノックダウンは PANC-1 細胞の増殖に影響を与えないことを見出した。

次に、同細胞を免疫不全マウスの膵尾へ移植した。移植 7 週間後に解析した結果、予想外にも腫瘍が増大しないことを発見した (図 1 右)。そこで、移植組織を組織学的に解析した結果、やはり NRF3 ノックダウン PANC-1 細胞の腫瘍は増大していないことを確認した。さらに shCtrl PANC-1 由来の腫瘍周辺はマッソントリクローム染色において顕著に陽性になり、線維化が亢進するのに対して、NRF3 ノックダウン PANC-1 細胞では顕著な線維化を確認できなかった。ここで重要な点は、上述したように、NRF3 ノックダウン PANC-1 細胞は、通常培養では増殖するが、免疫不全マウスへの移植では腫瘍が形成されなかったことである。すなわち本結果は、NRF3 は膵臓がんにおける腫瘍微小環境中の増大メカニズムに関わることを強く意味する。

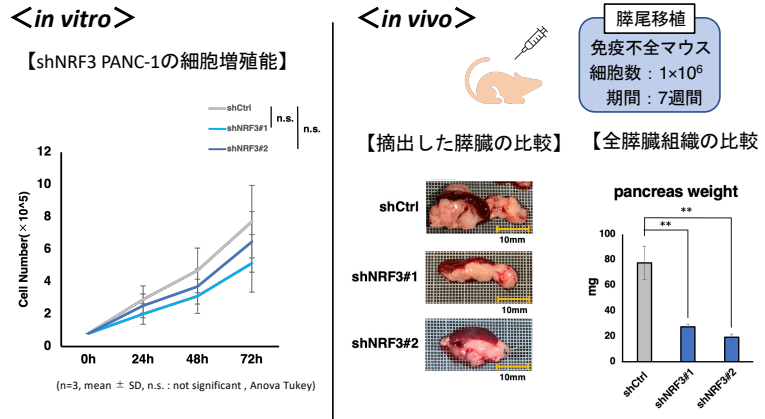


図 1 膵臓の腫瘍増大に関わる転写因子 NRF3

した結果、増殖能に影響がないことを確かめた。以上の結果から、*in vitro* の通常培養では NRF3 ノックダウンは PANC-1 細胞の増殖に影響を与えないことを見出した。

次に、同細胞を免疫不全マウスの膵尾へ移植した。移植 7 週間後に解析した結果、予想外にも腫瘍が増大しないことを発見した (図 1 右)。そこで、移植組織を組織学的に解析した結果、やはり NRF3 ノックダウン PANC-1 細胞の腫瘍は増大していないことを確認した。さらに shCtrl PANC-1 由来の腫瘍周辺はマッソントリクローム染色において顕著に陽性になり、線維化が亢進するのに対して、NRF3 ノックダウン PANC-1 細胞では顕著な線維化を確認できなかった。ここで重要な点は、上述したように、NRF3 ノックダウン PANC-1 細胞は、通常培養では増殖するが、免疫不全マウスへの移植では腫瘍が形成されなかったことである。すなわち本結果は、NRF3 は膵臓がんにおける腫瘍微小環境中の増大メカニズムに関わることを強く意味する。

(4) NRF3-CTGF 経路による膵臓がん細胞の浸潤・遊走能の活性化

次に NRF3 による膵臓の腫瘍悪性化機構の分子メカニズムを解明するために、NRF3 標的遺伝子を同定するマイクロアレイ解析を行った。具体的には、PANC-1 細胞において siRNA で NRF3 をノックダウンさせた時の遺伝子発現変動を解析した。その結果、結合組織成長因子 CTGF が NRF3 標的遺伝子である可能性を見出した。そこで RT-qPCR、ウエスタンブロッティングそしてクロマチン免疫沈降実験により、NRF3 が膵臓がん細胞の CTGF 遺伝子を直接的に発現誘導することを明らかにした。次に、CTGF は癌細胞の増殖とともに、浸潤・遊走能を高めることが知られているために、スクラッチおよびトランスウェルアッセイにおいて、NRF3 が CTGF を介して膵臓がん細胞の遊走・浸潤能を亢進することを見出した (図 2)。最後に、NRF3 により誘導された CTGF がオートクライン的に膵臓がん細胞自身に作用しているのか検証するために、CTGF の代表的な下流因子である ERK をウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、活性化の指標となる ERK のリン酸化 (p-ERK) が NRF3 ノックダウンにより減少し、この減少は CTGF 発現ベクターとの co-transfection によりレスキューできた。したがって、膵臓がん細胞において NRF3 は CTGF を介して ERK を活性化させることを見出した。さらに、NRF3-CTGF 経路が発現誘導する浸潤関連遺伝子についても検討した。CTGF は ERK を介して MMP-2 の発現量を上昇させることで、浸潤能を亢進させるという報告がある。そこで、NRF3 ノックダウン条件下での MMP-2 の mRNA 量を RT-qPCR にて解析した。その結果、MMP-2 の mRNA 発現量の有意な低下を見出した。以上の結果より、本研究では膵臓がん細胞において NRF3 が CTGF の発現誘導を介して ERK を活性化させ、MMP-2 の発現量を上昇させることで、浸潤能を亢進させる可能性が高いと結論づけた。

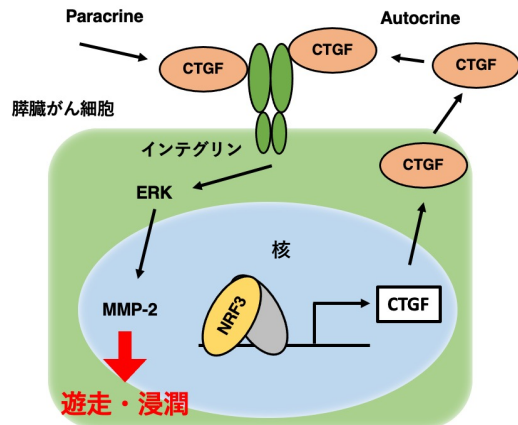


図 2 NRF3-CTGF 経路による膵臓がん細胞の浸潤能亢進

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 5件）

1. 著者名 Hirose Shuuhei, Waku Tsuyoshi, Tani Misato, Masuda Haruka, Endo Keiko, Ashitani Sanae, Aketa Iori, Kitano Hina, Nakada Sota, Wada Ayaka, Hatanaka Atsushi, Osawa Tsuyoshi, Soga Tomoyoshi, Kobayashi Akira	4. 巻 26
2. 論文標題 NRF3 activates mTORC1 arginine-dependently for cancer cell viability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106045 ~ 106045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106045	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 Waku Tsuyoshi, Nakada Sota, Masuda Haruka, Sumi Haruna, Wada Ayaka, Hirose Shuuhei, Aketa Iori, Kobayashi Akira	4. 巻 42
2. 論文標題 The CNC-family transcription factor Nrf3 coordinates the melanogenesis cascade through macropinocytosis and autophagy regulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111906 ~ 111906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111906	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 Waku Tsuyoshi, Iwami Takuya, Masuda Haruka, Hirose Shuuhei, Aketa Iori, Kobayashi Akira	4. 巻 259
2. 論文標題 Nrf3 Functions Reversely as a Tumorigenic to an Antitumorigenic Transcription Factor in Obese Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.2022.J090	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 Waku Tsuyoshi, Kobayashi Akira	4. 巻 22
2. 論文標題 Pathophysiological Potentials of NRF3-Regulated Transcriptional Axes in Protein and Lipid Homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12686 ~ 12686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312686	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 Waku Tsuyoshi, Hagiwara Toru, Tamura Natsuko, Atsumi Yuri, Urano Yasuomi, Suzuki Mikiko, Iwami Takuya, Sato Katsuya, Yamamoto Masayuki, Noguchi Noriko, Kobayashi Akira	4. 巻 24
2. 論文標題 NRF3 upregulates gene expression in SREBP2-dependent mevalonate pathway with cholesterol uptake and lipogenesis inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103180 ~ 103180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103180	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19件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小林 聡
2. 発表標題 がん微小環境におけるオーファン転写因子NRF3のアルギニンを介した新たな腫瘍増大機構
3. 学会等名 佐賀大学農学部生化学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 聡
2. 発表標題 プロテオスタシスないしアルギニン欠乏シグナルに対する新たな生体応答
3. 学会等名 第16回 日本臨床ストレス応答学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 聡
2. 発表標題 NRF3-CCN2経路による膵臓の新たな悪性化機構
3. 学会等名 第13回日本CCNファミリー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬修平、和久 剛、増田 遥、明田伊鳳、畠中敦至、大澤 毅、曾我朋義、小林 聡
2. 発表標題 NRF3はアルギニンによるmTORC1活性化を介して腫瘍を増大させる
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田恵佳、中田創太、増田 遥、住 春菜、廣瀬修平、明田伊鳳、和久 剛、小林 聡
2. 発表標題 転写因子Nrf3は細胞膜輸送系の制御を介してメラニン産生カスケードを最適化する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 史 天宇、畑中彩里、水瀬雅己、和久 剛、小林 聡
2. 発表標題 膵臓がんのシステイン依存性におけるNRF3-xCT経路の機能
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田恵佳、中田創太、増田 遥、住春 菜、和久剛、小林 聡
2. 発表標題 転写因子Nrf3は細胞膜輸送系の制御を介してメラニン産生カスケードを最適化する
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 明田伊鳳、廣瀬修平、増田 遥、和田恵佳、佐藤清敏、曾我朋義、和久 剛、小林 聡
2. 発表標題 転写因子NRF3によるミトコンドリア動態制御の可能性
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuto Michihara, OKatsuya Satoh, Kohei Yamamoto, Yue Gao, Tsuyoshi Waku, Akira Kobayashi
2. 発表標題 Identification of Pathological Function of the NRF3-CTGF Axis in Pancreatic Cancer Malignancies.
3. 学会等名 The 7th JCA-AACR Special Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Hatanaka, Sota Nakada, Iori Aketa, Katsuya Satoh, Gen Matsumoto, Akira Watanabe, Tomofumi Yoshida, Shigeo Takamori, Tsuyoshi Waku, Akira Kobayashi
2. 発表標題 A transcription factor NRF1(NFE2L1) activates selective autophagy by inducing p62 and GABARAPL1 expression upon proteasome inhibition.
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (ISA2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsuyoshi Waku, Akira Kobayashi
2. 発表標題 NRF1 and NRF3 complementarily maintain basal proteasome activity in cancer cells through CPEB3-Mediated translational repression.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、シンポジウム(招待講演)横浜(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣瀬修平、増田 遥、和久 剛、小林 聡
2. 発表標題 NRF3はアミノ酸取り込みを介したmTORC1活性化によって腫瘍増大に寄与する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、横浜
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田 遥、廣瀬修平、和久 剛、小林 聡
2. 発表標題 転写因子NRF3によるアミノ酸独占を介したがん免疫回避仮説の検証
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、横浜
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅野太我、道原琢登、和久 剛、小林 聡
2. 発表標題 NRF3-TAZ経路による膵がん浸潤・転移機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、横浜
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 道原琢登、和久 剛、小林 聡
2. 発表標題 NRF3-CTGF経路による膵臓がん悪性化機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、横浜
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中田創太、畠中惇至、松本 弦、和久 剛、貫名信行、小林 聡
2. 発表標題 NRF1はプロテアソーム阻害時にp62を介した選択的オートファジーを誘導する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、横浜
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中田創太、畠中惇至、松本 弦、和久 剛、貫名信行、小林 聡
2. 発表標題 転写因子NRF1はプロテアソーム阻害時にp62を介した選択的オートファジーを誘導する
3. 学会等名 第15回日本臨床ストレス応答学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣瀬 修平、増田 遥、曾我 朋義、和久 剛、小林 聡
2. 発表標題 NRF3はアミノ酸取り込みおよび葉酸代謝を介したmTORC1活性化によって腫瘍増大に寄与する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術年会、横浜
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅野太我、道原 琢登、和久 剛、小林 聡
2. 発表標題 NRF3-TAZ経路による膵がん浸潤・転移機構の解析
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会 オンライン開催
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

同志社大学遺伝情報研究室ホームページ
<https://akobayas.wixsite.com/genetic-code-lab>
同志社大学生命医科学部生命システム学科ホームページ
<https://medsystems.doshisha.ac.jp/>
アカデミア向け求人情報プラットフォーム
https://tayo.jp/recruitments/student/E52QiIns50j5Zob3_dWt4A

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	和久 剛 (WAKU TSUYOSHI) (40613584)	同志社大学・生命医科学部・准教授 (34310)	

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