

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501004

研究課題名（和文）膵発癌マウスを用いた膵癌の微小環境を標的とした新規治療法

研究課題名（英文）Targeting tumor microenvironment as a novel therapeutic strategy for pancreatic cancer using a genetically-engineered mouse model

研究代表者

伊佐山 浩通（ISAYAMA HIROYUKI）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70376458

研究成果の概要（和文）：膵特異的変異型 *Kras* 発現+*Tgfbr2* ノックアウトによる膵発癌マウスモデルは、臨床の膵癌の線維化の著明な腺癌という組織学的特徴をよく再現する。本モデルの膵癌細胞が産生する *CXCR2* リガンドが間質の線維芽細胞に作用し *CTGF* などの因子の発現を誘導し、血管新生を介して腫瘍促進的に働いていることが分かり、この腫瘍間質相互作用を遮断することが膵癌の治療につながることを示された。一方、微小環境中のマクロファージを標的とした治療については、今後更なる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：A genetically-engineered mouse model, containing mutant *Kras* expression and *Tgfbr2* knockout, recapitulates histological features of human pancreatic cancer, demonstrating adenocarcinoma with abundant fibrosis. The murine pancreatic cancer cells secrete *CXCR2* ligands, which induce *CTGF* expression in the stromal fibroblasts, resulting in tumor promotion through angiogenesis. Inhibiting the tumor-stromal interactions in the tumor microenvironment demonstrated anti-tumor effect and can be a therapeutic option for pancreatic cancer. The pancreatic cancer tissues contain abundant macrophage infiltration, however, targeting the macrophages as a therapy of pancreatic cancer should be further investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：膵癌、微小環境、腫瘍間質相互作用、マクロファージ、線維芽細胞、*CXCR2*、*CTGF*、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

膵癌は依然として予後の極めて厳しい最難治癌であり、その病態の理解に基づいたより有効な治療法の開発は急務といえる。我々は、臨床の膵癌像をよく近似するマウス膵発癌モデル（遺伝子型

Ptf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tgfbr2^{fl/fl}）（以下、*Kras+Tgfbr2^{KO}* マウス）を既に樹立し報告してきた。このマウスは、膵癌の組織学的特徴である間質の著明な増生を示し、線維化のみならずマクロファージの著明な浸潤もみられる。また、この膵癌組織から樹立した膵癌

細胞が分泌するサイトカインのスクリーニングから、複数のCXCケモカインが特徴的に分泌されることを見出している。

近年、さまざまな癌腫において癌の微小環境が注目されてきており、癌細胞を取り巻く微小環境が、癌細胞に好適な環境を形成し、腫瘍促進的に働いていることが報告されている。特に膵癌は、豊富な間質・線維化がその組織像の特徴でもあり、癌の微小環境における腫瘍間質相互作用が、その予後不良や治療抵抗性に寄与していることが示唆された。

遺伝子改変マウスによる膵発癌モデルは、膵癌細胞の皮下移植モデル等に比べ、癌の微小環境が保たれていることが大きな長所であり、生体内での治療法の効果判定は、そのような遺伝子改変発癌モデルを用いて行うべきであるという認識が広まってきている。

2. 研究の目的

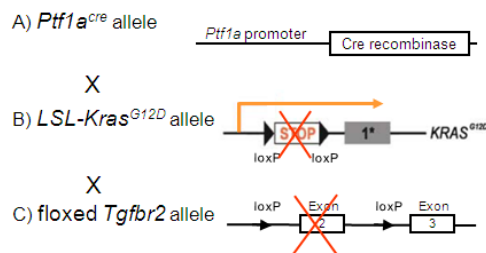
本研究の目的は、このような膵癌の微小環境における腫瘍間質相互作用を臨床像に近い膵発癌マウスモデルで検討し、その相互作用を標的とした治療をこのマウスに対して施行し、膵癌の微小環境における病態の理解に基づいた、より効果的な膵癌の治療法を見出すことである。

3. 研究の方法

1) 膵発癌モデル $Kras+Tgfb2^{KO}$ の作成

三系統のマウス A) 膵臓上皮特異的に Cre recombinase を発現する $Ptf1a^{cre/+}$ 、B) $Kras$ 遺伝子の片アレルが $LSL-Kras^{G12D}$ に置換されたもの（プロモーター領域に loxP-Stop-loxP 配列が挿入されており、下流に恒常活性型 $Kras^{G12D}$ の配列が連なっているもの）、C) $TGF\beta$ type 2 receptor ($Tgfb2$) コンディショナルノックアウトマウス、を交配し、目的の遺伝子型 $Ptf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tgfb2^{fl/fl}$ を得た（図1）。実際には、A)C)の double mutant と B)C)の double mutant をまず作成し、さらにその double mutant 同士を交配することで目的の A)B)C) triple mutant が得られた。

図1 膵臓上皮特異的変異型 $Kras$ 発現 + $Tgfb2$ KO ($Kras+Tgfb2^{KO}$)



2) $Kras+Tgfb2^{KO}$ 膵癌マウスにおける CXCR2 リガンドの作用の検討および CXCR2 阻害剤投与

2-1) $Kras+Tgfb2^{KO}$ マウス膵癌細胞株 K399, K375 を CXCR2 阻害剤 SB225002 (Calbiochem) 存在下に培養し、in vitro の細胞増殖抑制効果を検討した。

2-2) K399, K375 における CXCR2 リガンドの発現を NF- κ B 阻害剤存在下の半定量 RT-PCR にて検討した。

2-3) CXCR2、CTGF の発現を K399, K375 及び $Kras$ のみ活性化したマウス膵から分離した線維芽細胞 K643f を用いた半定量 RT-PCR、マウス膵癌組織の免疫染色にて検討した。

2-4) $Kras+Tgfb2^{KO}$ 膵癌マウスを 5 群に分け、①コントロール群、②CXCR2 阻害剤 Repertaxin (Sigma) 群 (15 mg/kg 生後満 3 週齢より連日腹腔内投与)、③ gemcitabine (GEM) 群 (12.5 mg/kg 生後満 4 週齢より週 2 回腹腔内投与)、④ Repertaxin+GEM 群 (②+③)、⑤CXCR2 阻害剤 SB225002 群 (0.5 mg/kg 生後満 3 週齢より連日腹腔内投与) とし、満 7 週齢に達した時点で膵臓を摘出し、腫瘍の volume を比較し、組織学的検討を加えた。①、③、⑤群は、生存期間も検討した。

3) $Kras+Tgfb2^{KO}$ 膵癌マウスに対する CSF1R 阻害剤投与

3-1) $Kras+Tgfb2^{KO}$ 膵癌マウスを 3 群に分け、①コントロール群、②CSF1R 阻害剤投与群 (10 mg/kg 生後満 3 週齢より連日腹腔内投与)、③GEM+CSF1R 阻害剤併用投与群 (②に加え GEM 3.125 mg/kg 生後満 4 週齢より週 2 回腹腔内投与) とし、満 7 週齢に達した時点で膵臓を摘出し、腫瘍の volume を比較し、組織学的検討を加えた。また、生存期間の検討も行った。CSF1R 阻害剤投与は 20 mg/kg の投与量でも行った。

4. 研究成果

1) $Kras+Tgfb2^{KO}$ マウスは、ヒト膵癌をよく近似する間質・線維化に富む膵 ductal adenocarcinoma を形成する

本モデルマウスは、腹部膨満・体重減少・血性腹水の貯留・黄疸などヒト膵癌類似の症候を呈し、平均 8 週齢で癌死する。その組織像は分化型の ductal adenocarcinoma で間質の増生・線維化が著明であり、ヒト膵癌の組織像をよく近似していた。本モデルでは、先行する遺伝子改変モデルと比べ、肉腫様の未分化腫瘍の混在が見られず、より臨床の膵癌像に近い組織像であった。また、本モデルの組織像が示すように、腫瘍組織内に占める間質の割合が大きく、線維化のみでなくマクロファージなど炎症細胞浸潤も著明であり、膵癌の発癌・進展に活発な腫瘍間質相互作用が

寄与している可能性が示唆された。

2) **Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌細胞の産生する CXCR2 リガンドは、膵線維芽細胞に作用し腫瘍促進的に働き、一方、Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌マウスに対する CXCR2 阻害剤投与は、血管新生阻害により抗腫瘍効果を示し、有意に生存期間を延長させる**

我々はこれまでに、Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌細胞と Kras のみ活性化した PanIN 状態由来の細胞との比較から、Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌細胞が複数の CXC ケモカインを特徴的に有意に過剰産生・分泌しているという結果を得ている。また、その CXC ケモカインの大多数は受容体 CXCR2 のリガンドであり、CXCR2 の阻害が膵癌の一つの分子標的治療となることが示唆された。

2-1) K399, K375 を様々な濃度の SB225002 存在下に培養したが、増殖抑制効果は認められず、膵癌細胞由来の CXC ケモカインは、膵癌細胞自体の autocrine による増殖促進作用はないものと考えられた。

2-2) K399, K375 における CXCR2 リガンドの発現を NF- κ B 阻害剤存在下の半定量 RT-PCR にて検討した結果、有意に発現の低下がみられ、Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌細胞の CXCR2 リガンド産生は NF- κ B シグナル依存性であることが示された。

2-3) K375, K399 および膵線維芽細胞 K643f における CXCR2 発現は、転写レベルにおいては線維芽細胞で有意に高いことがわかった。マウス組織を用いた免疫染色では膵癌組織に heterogeneous に染まり、正常膵との比較では、特に浸潤先端部における間質側に発現している傾向がみられた。

一方、線維化促進因子かつ腫瘍促進因子として知られる CTGF(connective tissue growth factor)の免疫染色は、マウス膵癌組織において癌細胞と間質の境界部分に非常に強い染色性を示し、活発な腫瘍間質相互作用が示唆された。半定量 RT-PCR では、線維芽細胞における発現が有意に高く、CXCR2 リガンドにより線維芽細胞での CTGF 発現が誘導され、また Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌細胞の上清によっても線維芽細胞での CTGF 発現が誘導され、CXCR2 阻害剤存在下ではそれがキャンセルされた。

これら 2-1)から 2-3)の結果から、Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌細胞が特徴的に産生分泌する CXCR2 リガンドは、癌細胞自身には直接働かないが、間質の線維芽細胞の CXCR2 に作用し CTGF 産生を誘導するというように癌の微小環境を修飾するという働き方をすることが示された。この線維芽細胞における CTGF 産生誘導は、TGF- β type 1 receptor 阻害剤の存在下ではキャン

セルされ、TGF- β シグナル依存性であった。癌細胞自身は Tgfr2^{KO} であるため TGF- β シグナルの影響は受けないが、間質では TGF- β シグナルが重要な働きをしていることが示唆された。

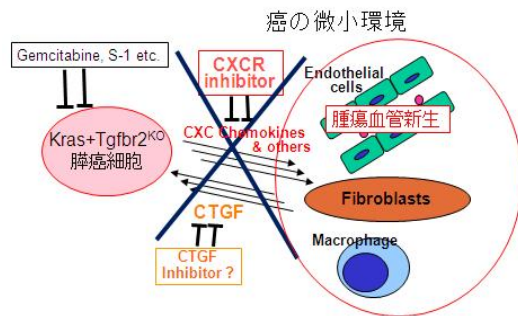
我々は、ヌードマウスへの皮下移植実験において Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌細胞単独移植群に比べ、Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌細胞と膵線維芽細胞を半々に混合した群の方が皮下腫瘍の増大が速いという結果を見出しており、これは、癌細胞と線維芽細胞の共在による腫瘍間質相互作用が実際に腫瘍促進的に働いていることを示す知見といえる。また、この混合した細胞による皮下腫瘍の増大は、CXCR2 阻害剤の局所投与により抑制され、CXCR2 依存的な腫瘍間質相互作用が重要であることも示唆された。

2-4) これらの結果を踏まえ、Kras+Tgfr2^{KO} マウスに CXCR2 阻害剤

(Repertaxin or SB225002)を投与する治療実験を行った。CXCR2 阻害剤もしくは膵癌標準治療薬 GEM を投与すると、無治療群に比べ有意な腫瘍 volume の抑制効果を示した。抑制効果は Repertaxin, SB225002 と GEM と同程度であった。Repertaxin または SB225002 を GEM と併用すると、各単独投与群に比べ、更に抑制する傾向がみられた。vWF の免疫染色による腫瘍組織での血管数の評価から、CXCR2 阻害による抗腫瘍効果は血管新生阻害と相関するものと考えられた。一方、GEM 投与では血管新生は阻害されず、異なる作用機序であることが確認された。コントロール群(生存期間中央値=MST 53 日)に比べ、SB225002 投与群は有意な生存延長効果を示し(MST 62 日)($p<0.05$)、これは GEM 単独投与とほぼ同等であった。

これらの結果から、Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌細胞が間質に対して分泌する CXC ケモカインは癌細胞の増殖を直接促進するのではなく、腫瘍血管新生を介して腫瘍に促進的に作用し、受容体 CXCR2 を阻害することで GEM とは異なる機序で同等の効果を持つ有用な分子標的治療になると考えられた(図 2)。GEM+SB225002 併用投与も検討したが、この併用の際には GEM 12.5 mg/kg は過剰量となってしまうようである。GEM を減量し、至適投与量を検討することで、相乗効果を示す治療法が得られる可能性がある。

図2 膵癌に対する治療の総合戦略
(癌細胞への直接作用と癌微小環境の修飾)



3) Kras+Tgfr2^{KO} 膵癌マウスに対し CSF1R 阻害剤は有意な生存延長効果を示さず

Kras+Tgfr2^{KO}膵癌組織の F4/80 染色では、腫瘍組織にマクロファージの著明な浸潤がみられ、腫瘍の微小環境形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。近年、腫瘍組織中のマクロファージは、腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage, TAM) と呼ばれ、腫瘍促進的な作用を持つようになることが報告され注目されている。一方、CXCR2 阻害剤を投与したマウス膵癌組織では、もともとみられていた著明なマクロファージ浸潤が減少していた。このことから、マクロファージに発現している CSF1R (colony-stimulating factor 1 receptor) の阻害剤を投与しマクロファージの活性化を抑制することが、膵癌の微小環境を修飾し、効果的な治療につながるのではないかと考えた。

3-1) CSF1R 阻害剤 10 mg/kg 単独投与にては、膵癌マウスの生存期間延長がみられなかったため、20 mg/kg まで増量して投与を行ったが、やはり有意な生存延長はみられなかった。GEM との併用においては、CXCR2 阻害剤との併用の結果もふまえ、GEM 投与量を 3.125 mg/kg まで減量して行った。この減量の検討において、GEM 3.125 mg/kg 単独投与は、12.5 mg/kg 単独投与と比べ、生存期間は同等であった。この減量した投与量を用い、CSF1R 阻害剤 10 mg/kg、20 mg/kg との併用投与を試みた。いずれにおいても、生存期間の有意な延長は見られなかった。7 週齢まで投与した際の膵癌組織の H&E 染色像では、炎症細胞浸潤は同等に見られており、特に有意な組織学的所見の相違を認めなかった。

膵癌の微小環境修飾による治療効果という観点において、マクロファージは治療標的としての可能性はあると思われるが、今回用いた方法では治療としての有効性を示すことができず、CSF1R 以外の標的分子の

探索、また微小環境におけるマクロファージ以外のコンポーネントの検討も重要と考えられた。

4. 研究成果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Ryota Takahashi, Yashuhiro Hirata, Kousuke Sakitani, Wachiko Nakata, Hiroto Kinoshita, Yoku Hayakawa, Hayato Nakagawa, Kei Sakamoto, Yoko Hikiba, Hideaki Ijichi, Harold L Moses, Shin Maeda, Kazuhiko Koike. Therapeutic effect of c-Jun N-terminal kinase inhibition on pancreatic cancer. *Cancer Science*, 査読有、Vol. 104, 2013, pp.337-344.

② Hideaki Ijichi. Inhibition of CXCLs/CXCR2 axis in the tumor microenvironment might be a potent therapeutics for pancreatic cancer. *OncoImmunology*, 査読有、Vol. 1, 2012, pp. 569-571.

③ Hideaki Ijichi, Anna Chytil, Agnieska E Gorska, Mary E Aakre, Brian Bierie, Motohisa Tada, Dai Mohri, Koji Miyabayashi, Yoshinari Asaoka, Shin Maeda, Tsuneo Ikenoue, Keisuke Tateishi, Christopher VE Wright, Kazuhiko Koike, Masao Omata, Harold L Moses. Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Clinical Investigation*, 査読有、Vol. 121, 2011, pp. 4106-4117.

[学会発表] (計 7 件)

① 高橋良太、膵臓癌に対する JNK 標的療法についての検討、第 50 回日本臨床分子医学会学術集会、2013/4/12、東京

② 伊地知秀明、遺伝子改変膵発癌マウスモデルを用いた膵癌研究の臨床への橋渡しの展開、第 98 回日本消化器病学会総会、2012/4/20、東京

③ 伊地知秀明、膵癌微小環境における CXC ケモカイン/CXCR2 Axis 阻害の重要性、第 70 回日本癌学会学術総会、2011/10/3、名古屋市

④ 伊地知秀明、膵発癌マウスモデルを用いた膵癌化学療法への橋渡しの展開、第 97 回日本消化器病学会総会、2011/5/15、東京

⑤ 伊地知秀明、Blockade of CXC chemokines/CXCR2 axis inhibits pancreatic ductal adenocarcinoma progression、第 69 回日本癌学会学術総会、2010/9/23、大阪市

研究者番号：

⑥ Hideaki Ijichi、Blockade of CXCL chemokines/CXCR2 axis inhibits pancreatic ductal adenocarcinoma progression、Joint Meeting of 14th International Association of Pancreatology and 41th Japanese Pancreas Society、2010/7/11、福岡市

⑦ Hideaki Ijichi、Blockade of CXCL chemokines/CXCR2 axis inhibits pancreatic ductal adenocarcinoma progression through anti-angiogenesis、The 101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research、2010/4/18、Washington D. C.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊佐山 浩通 (ISAYAMA HIROYUKI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70376458

(2) 研究分担者

伊地知 秀明 (IJICHI HIDEAKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70463841

(3) 連携研究者

()