

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430106

研究課題名(和文) 膵癌の生物学的悪性度に関わるデスモプラジアにおける線維芽細胞の腫瘍への応答の解明

研究課題名(英文) Fibroblast response to the tumor in the desmoplasia involved in the malignant potential of pancreatic cancer

研究代表者

伊佐山 浩通 (ISAYAMA, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70376458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の組織学的特徴である著明な線維化(デスモプラジア)は、膵癌の生物学的悪性度と関わることを示唆されている。我々は、既に臨床の膵癌像をよく再現する膵発癌マウスモデルを樹立し、膵癌の腫瘍間質相互作用において、膵癌細胞がCXCR2リガンドを特徴的に産生分泌していることを報告した。今回は、対する間質の線維芽細胞の応答の解明を試みた。膵癌由来線維芽細胞は、膵癌細胞からの刺激を受け、膵癌細胞と同じCXCR2リガンドを産生して膵癌細胞の浸潤能を高めていた。この応答は、正常膵の線維芽細胞とはきわめて異なっていた。また膵発癌モデルにおいてCXCR2のヘテロノックアウトにより生存予後が改善することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Desmoplasia, marked fibrosis in the pancreatic cancer tissues, seems involved in the malignant potential of pancreatic cancer.

We have already established a murine model recapitulating human pancreatic carcinogenesis and reported that the cancer cells produced CXCR2 ligands specifically in the tumor-stromal interaction. Here we tried to elucidate the comprehensive response of the stromal fibroblasts to the cancer cells. The cancer-associated fibroblasts produced the same CXCR2 ligands with those derived from cancer cells, in response to the cancer cells' stimuli, resulting in promoting the cancer cell invasion. The response was quite different from that of normal pancreatic fibroblasts. Thus, inhibition of CXCR2 signaling might be a potent therapeutic strategy controlling the tumor-microenvironment of pancreatic cancer. Consistent with this, heterozygous knockout of CXCR2 in the murine pancreatic cancer model showed a tendency of the prolonged survival.

研究分野：消化器内科学、胆道疾患、膵疾患

キーワード：膵癌 デスモプラジア 線維芽細胞 腫瘍間質相互作用 CXCR2

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治癌の最たるものであり、その病態の解明・治療法の開発は急務である

本研究開始時、膵癌は日本人の癌死の第5位であったが、現在では第4位となり、増加を続けている。その予後は最近でもまだ5年生存率7%程度と依然として極めて不良である。このように膵癌が難治癌の最たるものである理由の一つは早期診断の困難さにあり、診断時に既に転移や播種のある切除不能例が80%を占める。一方で、外科的切除を受けた症例でも多くは1年で再発し、その5年生存率は20%に達せず、浸潤・転移能が強く治療抵抗性であり、生物学的悪性度が高いことがもう一つの要因と考えられる。膵癌の腫瘍組織の特徴として、癌細胞の占める割合が少なく、間質性が豊富であり、特に線維化が著明であることが挙げられ、このような腫瘍微小環境の存在が悪性度とも強く関わっているのではないかと考えられる。

我々は、以前より膵癌の閉塞性黄疸に対する胆道ドレナージ技術を駆使して全身状態の改善に努めつつ、抗腫瘍療法を積極的に行い、かつ膵癌に関わる臨床試験を複数行ってきた。(C000000388 JM-Test 非切除膵頭部癌による胆道閉塞に対するステントの開存性を検討する多施設共同無作為比較試験; UMIN000000498 非切除進行膵癌に対するgemcitabine と gemcitabine/S-1 療法の比較試験, GEMSAP study; UMIN000002152 膵癌に対するジェムシタピン・カンデサルタン併用療法第1相試験; UMIN000005580 膵癌に対するジェムシタピン・カンデサルタン併用療法第2相試験; UMIN000005306 癌性腹水を伴う進行膵癌に対する S-1 + パクリタキセル経静脈・腹腔内併用療法の認容性試験など)。その結果、当時の標準治療薬である gemcitabine と S-1 を使い切った後も、3rd line 以降のレジメンを投与できた患者の生存期間は確実に延長していた。しかしながら、依然として難治癌であり予後不良であることには変わりなく、その QOL 及び予後を改善させる新たな治療法の開発は急務と考えられた。

ヒト膵癌像を最もよく近似するマウス発癌モデル

我々は、膵臓特異的な恒常活性型 Kras^{G12D} 発現 + TGF-β II 型受容体 (Tgfbr2) ノックアウトという組合せによる遺伝子改変膵発癌マウスモデルを樹立し、すでに報告してきた。このモデルは、ヒトの膵癌と同様の臨床的症候と共に、著明な間質の増生・線維化(デスモプラジア)を伴う分化型管状腺癌が得られ、既報のモデルの中で最もヒトの膵癌に似たモデルと考えられる。このモデルでは、前癌病変である PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) の段階的進行も見られ、ヒトの多段階発癌過程をもなぞらえている。本モデルは、特に腫瘍の微小環境が免

疫系も含めて intact である点で、ヌードマウスを用いた移植モデルなどに比べ、より臨床の実状に近い状態を再現しており、膵癌の腫瘍間質相互作用を解析するのに適したモデルと言える。

膵癌における微小環境、腫瘍間質相互作用の重要性

近年、癌における微小環境の重要性が注目されており、特に膵癌では、上述のように間質が豊富であるため腫瘍間質相互作用が病態において大きな比重を占めると考えられ、これが悪性度の高さとも相関している可能性がある。腫瘍の微小環境における間質の構成成分としては、腫瘍血管、線維芽細胞、マクロファージ等の免疫・炎症性細胞が挙げられ、これらは癌の微小環境において癌細胞に教育され、腫瘍促進的に働くようになると考えられ、これら癌の微小環境を制御することが、癌の制御にもつながるのではないかと考えられる。

我々はこれまでにマウスの癌組織および前癌病変から腫瘍細胞を分離し、それらが周囲に分泌する液性因子を抗体アレイで解析したところ、複数の CXC ケモカインが癌細胞で特に強く産生されていることがわかった。これらの CXC ケモカインは、癌細胞自身の増殖には影響しないものの、受容体 CXCR2 を介し血管新生を促進し、腫瘍促進的に働いていることがわかった。実際に CXCR2 阻害剤を膵発癌マウスに投与すると、抗腫瘍効果を示し、生存期間が有意に延長した (Ijichi et al., JCI 2011)。これはすなわち、膵癌において癌の微小環境における腫瘍間質相互作用を遮断することが、有効な治療法となり得るということを示している。この時の報告では、膵癌の腫瘍間質相互作用の一端として、膵癌細胞の分泌する CXC ケモカインにより膵線維芽細胞からの CTGF 産生が誘導されることを示したが、CTGF 以外の因子の変化、線維芽細胞の応答の全体像についてはまだ不明であった。

2. 研究の目的

腫瘍組織中に豊富な間質を有する膵癌においては、腫瘍間質相互作用がその病態形成に非常に重要であると考えられ、中でも、特徴的な線維化(デスモプラジア)とその中心となる線維芽細胞の意義を理解することは、最難治癌である膵癌の病態解明および新規治療の開発に寄与するものと考えられる。

我々はこれまでに膵癌の微小環境における腫瘍間質相互作用について、膵癌細胞から間質へと分泌される液性因子について網羅的に解析し報告したが、本研究では、それに対する間質側の線維芽細胞の応答の全体像を明らかにするために遺伝子発現プロファイルの変化とその変化が癌細胞に与える影響を解析し、また癌組織由来の線維芽細胞と正常膵における線維芽細胞との相違についても明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト膵癌像をよく再現する遺伝子改変膵発癌マウスモデル(膵臓特異的 Kras^{G12D} 発現 + Tgfr2 ノックアウト, PKT) の膵癌組織から癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast, CAF) を分離し、またその同腹仔の Cre を有さない個体の正常膵から正常膵線維芽細胞 (Normal fibroblast, NF) を分離し、培養系を樹立した。

CAF を膵癌細胞の培養上清を添加して刺激し、添加の有無による CAF の遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイにて網羅的に解析した。同様に、NF についても膵癌細胞の培養上清を添加して刺激し、添加の有無による NF の遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。また CAF と NF の無刺激の状態での遺伝子発現プロファイルの相違をマイクロアレイにて比較解析した。

CAF, NF の培養上清が膵癌細胞の *in vitro* での細胞増殖に与える影響を検討した。

ダブルチャンバーのマトリゲル浸潤アッセイにて、CAF, NF の培養上清添加の有無による膵癌細胞の浸潤能の変化を検討した。また、CAF の培養上清添加時において、CXCR2 阻害剤の存在下での癌細胞の浸潤能の変化を検討した。

ダブルチャンバーの遊走能アッセイにて、膵癌細胞、前癌細胞の培養上清添加の有無による CAF の遊走能の変化を検討した。また、膵癌細胞の培養上清添加時において、CXCR2 阻害剤の存在かでの CAF の遊走能の変化を検討した。

膵発癌マウス PKT と CXCR2 ノックアウトマウスとの交配により、CXCR2 アレルがヘテロノックアウトとなるマウス (PKT2 het) を作製し、もとの PKT との生存期間の相違を比較した。

4. 研究成果

膵癌由来線維芽細胞と正常膵線維芽細胞の培養系の樹立

Partial trypsinization method によりマウスの膵癌組織、正常膵組織から上皮細胞と間質細胞を分離し、それぞれ CAF と NF を分離し、培養系を樹立した。ちなみに PKT モデルは膵臓上皮特異的な遺伝子改変がなされているため、CAF には遺伝子改変は生じていない。

膵癌細胞に対する CAF, NF の応答としての遺伝子発現プロファイル変化の解析

CAF に対し、膵癌細胞の培養上清を添加して刺激した際の遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイにて解析した。580 遺伝子が 2 倍以上に発現が増加し、552 遺伝子が 1/2 以下に発現が減少した。その中で、複数の炎症性サイトカインの発現が増加しており、膵癌細胞が産生分泌するものと同じ CXC ケモカインが含まれていた。一方、NF

においては、膵癌細胞からの刺激に対する遺伝子発現プロファイルの変化が大きく異なっており、発現の増加する遺伝子の上位には CXC ケモカインは含まれていなかった。

CAF と NF の遺伝子発現プロファイルの相違

CAF と NF のベースラインとしての遺伝子発現プロファイルの相違をマイクロアレイにて比較した。プロファイルが大きく異なっていることがわかった。これは、線維芽細胞の genotype は同じであるにも関わらず、異なる発現プロファイルを有するということであり、CAF は、癌組織の中で正常膵とは異なる環境において CAF としての特徴的な遺伝子制御や刺激応答性を獲得するようになったと考えられる。

膵癌細胞と CAF は同じ CXCR2 リガンドを産生分泌することにより、互いに引き付け合い浸潤能を高める

ダブルチャンバーのマトリゲル浸潤アッセイにおいて、CAF の培養上清は、NF のそれに比べて有意に膵癌細胞の浸潤能を促進した。その促進効果は CXCR2 依存的であった。一方、ダブルチャンバーの遊走能アッセイにおいて、膵癌細胞の培養上清は、前癌細胞のそれに比べて有意に CAF の遊走能を促進した。その促進効果は CXCR2 依存的であった。すなわち、膵癌細胞と CAF は、CXCR2 リガンドとなる同じ種類の CXC ケモカインを互いに産生分泌し、互いの浸潤もしくは遊走能を高めて引き付け合うという現象が観察された。この現象により、膵癌の浸潤・転移・播種が促進されていることが示唆された。

当初は、膵癌細胞が産生分泌する CXC ケモカインに対し、CAF からは異なる種類の因子が分泌されているものと推測していたが、CAF も同じ CXC ケモカインを分泌していることが示され、膵癌の進展における CXCR2 シグナルの重要性が予想以上に高いということが示唆された。

CXCR2 シグナルのノックダウンにより、膵癌の進展が抑制され、生存予後が改善する可能性がある

PKT 膵発癌モデルは、急速に膵癌が進行し、生後 8 週齢で癌死する、非常に進行の速いモデルである。CXCR2 の重要性から、PKT モデルにおいて CXCR2 をノックアウトすれば膵癌の発癌自体の抑制の可能性も考えられた。

しかし、CXCR2 は両アレルがノックアウトとなると産仔が著明に減少し、PKT との交配を進めることが極めて困難であった。そこで、CXCR2 アレルをヘテロノックアウトとし、このシグナルが半減 (ノックダウン) された状態 (PKT2het) での膵発癌の変化を比較解析した。

残念ながら、PKT2het においても膵発癌は

認められ、腹部膨満の出現は PKT とほぼ同時期と考えられた。その後の生存期間を比較すると PKT2het では、PKT に比べて生存が延長する傾向がみられている。実際の腫瘍組織像にどのような変化がみられているかを含めて現在解析中である。

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 1 件)

伊地知秀明、マウスモデルから臨床を見据えた膵癌基礎研究の展開、日本消化器病学会雑誌、査読有、111 巻、2014、1561-1569、DOI : 10.11405/nisshoshi.111.1561

〔学会発表〕(計 3 件)

伊地知秀明、伊佐山浩通 他、遺伝子改変膵発癌マウスモデルを用いた膵癌克服を目指す研究展開、第 44 回日本膵臓学会大会、2013.7.25、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Ijichi H、Significance of CXC chemokines/CXCR2 axis in pancreatic cancer progression、The 4th International Forum in the 100th General Meeting of Japanese Society of Gastroenterology、2014.4.26、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

Ijichi H、Translational research of pancreatic cancer using genetically-engineered mouse models、The 3rd International Topic Conference in the 101st General Meeting of Japanese Society of Gastroenterology、2015.4.24、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

〔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・准教授

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・講師

研究者番号：70463841