

23-A-38 膵がんの本態解明と新規標的治療法の開発

独立行政法人国立がん研究センター研究所・遺伝子免疫細胞医学研究分野

青木 一教

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

膵がんでは種々の難治の要因に対する多方面からの総合的な対策が必要となる。本研究では、A)膵がんの本態解明と新たな標的分子の探索、B)膵がんの特性に基づいた治療戦略の開発、C)膵がん研究を支援する細胞・動物モデルの整備を3つの柱とする。まず、膵がんの本態を、増殖・浸潤、免疫寛容、薬剤耐性、悪液質・疼痛の4つの観点から検討し、膵がん治療に有用な新たな標的を探索する。ついで、これらの検討に基づき、膵がん細胞死誘導や間質を制御する治療法や腫瘍の免疫抑制性環境を打破し腫瘍免疫を誘導する新規免疫治療戦略などの基礎開発を行う。また、治療法開発の新たな評価系として、新規膵がん動物モデルを確立するとともに、膵がん切除組織のXenograftのパネルを整備して各研究を支援する。

研究経費

20,000 千円

研究班の組織

青木一教	研究所・遺伝子免疫細胞医学研究分野長	膵がんを標的とする免疫療法の開発
今井俊夫	研究所・動物実験支援施設長	動物モデルを用いた膵発がん初期過程における細胞増殖・浸潤機構の解明
平岡伸介	研究所・分子病理分野ユニット長	膵がん組織に形成される3次リンパ装置の腫瘍免疫における役割とその機序の解明
本田一文	研究所・創薬臨床研究分野ユニット長	タンパク質リン酸化プロファイルを用いた分子標的候補の探索と薬剤感受性予測モデルの確立
上園保仁	研究所・がん患者病態生理研究分野長	膵がん動物モデルを用いた、膵がんの痛みならびに悪液質症状改善薬の開発

清野透	研究所・ウイルス発がん研究分野長	実験動物によるde novo発がんモデルの作出
上野秀樹	中央病院・肝胆膵腫瘍科医長	新規治療法開発における臨床的課題の検討

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標) :

膵がんは、有効な早期診断法がない、生物学的悪性度が高い、既存の治療法に抵抗性を示すといった種々の要因が複合的に連鎖した難治がんであり、この難治の連鎖を断ち切るために多方面からの対策が必要となる。本研究では、膵がんの本態を、①増殖・浸潤、②免疫寛容、③薬剤耐性、④悪液質・疼痛、の4つの観点から解明し、A.膵がんの本態解明による治療に有用な新たな標的分子の同定と、B.膵がんの特性に基づいた治療戦略の開発につなげることを目的とする。また、C.各種の膵がん動物モデルや膵がん細胞のパネルを整備して各サブテーマの研究を支援する。具体的な到達目標は以下の通りである。

A. 膵がんの本態解明と新たな標的分子の探索

- 1 膵発がん初期過程における遺伝子異常を解析し、がんの発生・進展に重要な役割を果たす分子（膜型ムチンなど）を標的とする治療法の基礎開発を行う
- 2 ヒト膵がん間質に形成される3次リンパ装置の膵がん腫瘍免疫微小環境における役割を解明し、免疫療法開発や効果予測に資する知見を得る
- 3 膵がんの特徴的なリン酸化プロファイルを明らかとし、新規バイオマーカーの探索や薬剤耐性機構の解明・薬剤の効果増強に結び付ける
- 4 膵がんの悪液質を改善する薬剤を同定し、前臨床研究を行う。また、膵がん患者において、悪液質や疼痛に関わる生理活性物質の探索を行う

B. 膵がんの特性に基づいた治療戦略の開発

- 5 制御性T細胞を標的とする抗体や、腫瘍環境下において特異的に制御性T細胞を除去する新規ベクターを用いて、膵がんの免疫抑制環境を打破することにより腫瘍免疫を賦活する新規免疫療法の基礎開発を行う
- 6 局所進行膵がん患者において、放射線療法に適した症例の選別に有用なバイオマーカーを開発する

C. 膵がん研究を支援する細胞・動物モデルの整備

- 7 Xenograft や de novo 発がん等の膵がんモデル動物や不死化膵管上皮細胞のパネルを整備する

第1年次

(到達目標)

A. 膵がんの本態解明と新たな標的分子の探索

- 1 ハムスター膵管発がんモデルを用いて、膜型ムチン発現と膵がんの増殖性・浸潤性との関連を明らかとする
- 2 ヒト膵がん組織を用いて、がん間質における3次リンパ装置の臨床病理学的な特徴・意義を明らかとする
- 3 逆相マイクロアレイを作製するのに適した、細胞株からのタンパク質抽出方法を確定し、リン酸化抗体を用いてがん細胞のリン酸化状態を検出する技術を確立する
- 4 膵がん細胞をマウスの腹腔内に接種し、膵がん腹膜播種モデルを作製する

B. 膵がんの特性に基づいた治療戦略の開発

- 5 制御性T細胞を標的とする抗体を用いて、腫瘍の免疫寛容環境を打破することにより、全身性の抗腫瘍免疫を誘導できることを明らかにする
- 6 国立がん研究センターで治療を受けた局所進行膵がん患者のリストを作成し、臨床情報を整理する。また、研究所で見出されたバイオマーカーのシーズを整理し、有用性を検証するための候補を選別する

C. 膵がん研究を支援する細胞・動物モデルの整備

- 7 E6、E7、c-MYC、活性型 RAS の 4 因子をマウス膵管上皮に導入し、がん化することを確認する

(年次評価時点の実績要点)

A. 膵がんの本態解明と新たな標的分子の探索

- 1 膵発がん過程における膜型ムチンの発現状態を解析し、膜型ムチンが膵がんの上皮間葉転換に関連している可能性を示した
- 2 膵がん腫瘍内の 3 次リンパ装置形成が腫瘍免疫誘導や予後予測の指標になりうることを見いだした
- 3 細胞抽出タンパク質マイクロアレイ作製の基礎原理を確立した。計画を前倒しして、膵がん細胞株を含む 96 種類のがん細胞株を用いたマイクロアレイを作製し、リン酸化プロファイルを取得した
- 4 Pan02 膵がん細胞を C57BL/6 マウスの腹腔内に接種し、膵がん腹膜播種モデルを作製した

B. 膵がんの特性に基づいた治療戦略の開発

- 5 抗 CD25 抗体を用いて制御性T細胞を除去することにより、抗腫瘍免疫の強化や免疫療法の効果を増強できることを明らかにした
- 6 放射線化学療法を受けた局所進行膵がん症例のリストやバイオマーカーシーズリストの作成を開始した

C. 膵がん研究を支援する細胞・動物モデルの整備

- 7 ヒト膵管上皮細胞を用いて、E6、E7、c-MYC と活性型 RAS の 4 因子の導入でがん化することを確認した

研究成果と考察

第1年次評価時点

1 動物モデルを用いた膵発がん初期過程における細胞増殖・浸潤機構の解明に関する研究

BOP 誘発ハムスター膵管発がんモデルにおいて、まず、膵管病変を病理組織学的に過形成、異型過形成及び腺がんの 3 つに分類した。過形成は 86% にみられ、その約半数は周囲に単核細胞主体の炎症反応を伴っており、微小浸潤に伴う組織障害の存在が示唆された。異型過形成は 71% にみられ、その殆どに炎症を伴っていた。腺がんの発生率は 24% であった。次に、EMT との関連が報告されている膜型ムチンに関して検討した。MUC1 の発現は、過形成及び異型過形成における炎症反応の有無と関連を認めなかったが、MUC4 は、炎症を伴わない過形成の 10% に弱陽性、炎症を伴う過形成の 20% に弱陽性及び 15% に強陽性を示し ($p < 0.05$)、異型過形成においても同様の傾向がみられた。腺がんにおいては、MUC1 及び MUC4 の陽性率はそれぞれ 88% 及び 63% であり、EMT に直接的に関連する転写因子 Slug が、腺がんの一部において、MUC1/4 と共局在していた。これらの結果より、膵がんにおいては、MUC1 のほかに MUC4 も EMT に関連している可能性が示唆された。現在、ヒト外科切除標本および膵がん細胞株を用いた検討を行っている。

2 膵がん組織に形成される 3 次リンパ装置の腫瘍免疫における役割とその機序の解明に関する研究

ヒト膵がん約 300 症例を用いて、膵がん間質に形成される 3 次リンパ装置形成の意義を臨床病理学的に検討した。膵がん組織の特性を考慮して、予備検討から 3 次リンパ装置の評価基準を定め、3 次リンパ装置の形成部位と形成頻度に基づいて分類した。腫瘍内部に 3 次リンパ装置を形成する症例は少ないが、それら症例の予後は良好であった。一方、腫瘍周囲辺縁部に関しては、多くのリンパ装置を形成する症例と少量のリンパ装置を形成する

症例がそれぞれ多数を占め、3次リンパ装置形成の殆ど見られない症例は少数であった。これら3群の間で、全生命予後に有意な差は見いだせなかったが、無再発生存期間は3次リンパ装置形成の多いものの方が長い傾向にあった。これらの研究結果は、膵がん腫瘍内の3次リンパ装置形成が宿主の抗腫瘍免疫を量る指標になりうることを示している。現在、その免疫学的意義を検討している。このようなヒト膵がん組織での腫瘍免疫反応の解析は、5で行われる新規免疫療法を開発する上での重要な基盤となる。

- 3 タンパク質リン酸化プロファイルを用いた分子標的候補の探索と薬剤感受性予測モデルの確立に関する研究
すでに、細胞抽出タンパク質を用いたマイクロアレイの作製に関する基礎原理は確立した。そこで、研究計画を前倒しして、膵がん細胞株を含む96種類のがん細胞株から細胞抽出液を調整し、本抽出液をスライドガラス上に3000スポット以上の高密度でブロットし、マイクロアレイを作製した。さらに、このマイクロアレイを200枚以上作製して、約180種類のリン酸化抗体でハイブリダイゼーションを行い、リン酸化プロファイルを取得している。今後、本リン酸化プロファイルから膵がんの特徴的なプロファイルを抽出し、膵がんに対する新規標的分子を同定する。
- 4 膵がん動物モデルを用いた、膵がんの痛みならびに悪液質症状改善薬の開発に関する研究
マウス膵がん細胞Pan02をC57BL/6マウスの腹腔内に接種し、がん性腹膜播種のモデルを作成した。現在、本モデルを用いて、悪液質の診断基準を満たすか、あるいは痛みを評価するのに適しているかについて検討を行っている。また、進行期膵がん患者を対象として、がん悪液質症状に対する漢方薬六君子湯の有効性に関する臨床試験を開始予定であるが、その附随研究として、がん悪液質の症状緩和に有効とされる食思改善ペプチド(グレリンなど)の血中濃度と膵がんの進行状態との関連を明らかにする。
- 5 膵がんを標的とする免疫療法の開発に関する研究
多くの固形がんは免疫療法に抵抗性を示すが、これは制御性T細胞の誘導等の影響により、腫瘍が免疫抑制性の環境を獲得している事に起因する。そこで、抗CD25抗体を用いて制御性T細胞を除去することにより免疫療法の抗腫瘍効果を増強できるか検討した。まず、膵がんを含めた種々のがん細胞(Pan02, MethA, EL-4, CT26, Renca)の皮下腫瘍モデルにおいて、抗CD25抗体を静脈内に投与して末梢から制御性T細胞を除去したところ、腫瘍の増殖は抑制されマウスの生存率は有意に延長した。このことは、腫瘍の免疫抑制性環境の成立において制御性T細胞が重要な役割を果たしていることを示している。さらに、免疫療法として、腫瘍局所の制御と自然免疫・獲得免疫を強化する効果を持つインターフェロン(IFN)遺伝子治療を併用した。腫瘍内へのI型IFN遺伝子導入は、腫瘍内の樹状細胞の成熟活性化を誘導し、抗原提示能を増強することにより、腫瘍免疫を誘導できた。抗CD25抗体の投与と、腫瘍内IFN遺伝子導入と複合することにより、脾臓において腫瘍細胞反応性のリンパ球の数が明らかに増加し、腫瘍の増殖は強く抑制された。この抗腫瘍効果は、遺伝子導入していない腫瘍に対しても認められ、全身性の抗腫瘍免疫が効率良く誘導されることを明らかとした。本年度は、このように、制御性T細胞を除去することにより腫瘍の免疫抑制性環境を打破することが、免疫療法の抗腫瘍免疫を強力に増強できることを示した。一方、膵がん移植マウスモデルでは、実際の免疫反応を反映していないことが懸念されるので、今後、7のde novo膵発がんモデルを用いて検証を行う。
- 6 新規治療法開発における臨床的課題の検討
国立がん研究センターにおいて、2001年から2008年までに放射線化学療法を受けた局所進行膵がん症例に関して、性別・年齢などの患者背景因子、治療法や生存期間などを調査するために、匿名化を行ったうえで、リストの作成を開始した。また、すでに研究所で同定されているバイオマーカーシーズのリストの作成も行った。来年度に向けて膵がん生検材料を整理し、免疫染色等により、リストアップされたバイオマーカー候補が放射線療法の効果予測や予後予測に有用であるか評価する。
- 7 実験動物によるde novo発がんモデルの作出に関する研究
ヒト膵管上皮細胞に、E6、E7、c-MYC及び活性化型RASの4因子を導入することでがん化することを確認した。また、E6、E7の代わりにCDK4、Cyclin D1とTERTで不死化したのち、p53特異的shRNAとRASの計5因子を導入することにより、皮下移植後3ヶ月で造腫瘍性を示す細胞を得ることができた。さらに、MYCを追加導入することにより、1ヶ月で造腫瘍性を示す細胞を樹立することに成功した。しかし、得られた腫瘍は、腺がんまたは未分化がんの組織像を示していた。一般に、免疫不全動物への皮下移植では本来の組織像を再現することが難しく未分化がん組織像が得られる傾向がある。今後は、導入遺伝子の組み合わせや発現量を変えることで、皮下移植腫瘍であっても高分化型腺がんの組織像を示す膵がんの発生を誘導できるかどうか検討するとともに、膵がんの組織

型や浸潤・増殖能を規定する遺伝子群の同定を進める。本 de novo 膵発がんモデルの作出は、本研究班で行う免疫療法などの治療開発研究を推進する上で非常に有用である。

倫理面への配慮

本研究の中で、生殖細胞系列変異の解析を行う場合は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、また体細胞遺伝子発現・構造を解析する観察研究の場合には同指針に準拠し、かつ「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して研究計画の承認や、説明・同意を行い、試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進める。本研究の臨床検体の利用に関しては個人情報管理者のもとに連結可能匿名化処理が施されている。

動物実験に関しては、「国立がん研究センターの動物実験に関する指針」に従い、動物実験倫理委員会の承認を得て行う。遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え実験安全委員会の審査を経て理事長の承認を得て行う。

本研究の研究開発が臨床応用の段階に達した場合は、「遺伝子治療臨床試験に関する指針」、「臨床研究に関する倫理指針」等を遵守し、必要な研究計画の審査・承認や、被検者の同意を得て実施する。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

【第1年目（平成23年度）】

（雑誌論文）

1. Narumi K, Udagawa T, Kobayashi A, Hara H, Kondoh A, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Takeshita F, Ochiya T, Okada T, M. Yamagishi M, Yoshida T, Aoki K. *In vivo* interferon-alpha gene transfer enhances antitumor immunity after autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Gene Ther** 19; 34-48, 2012
2. Udagawa T, Narumi K, Goto N, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Ochiya T, Yoshida T, Chikaraishi T, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. **Hum Gene Ther** 23; 173-186, 2012
3. Hiraoka N, Yamazaki-Itoh R, Ino Y, Mizuguchi Y, Yamada T, Hirohashi S, Kanai Y. CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in the early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. **Gastroenterology** 140: 310-321, 2011.
4. Matsubara J, Honda K, Ono M, Sekine S, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Sakuma T, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T, Okusaka T, Kosuge T, Tsuchida A, Shimahara M, Yasunami Y, Chiba T, Yamada T. Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 20: 2195-2203, 2011.
5. Ito H, Honda K, Satow R, Arai E, Shitashige M, Ono M, Sakuma T, Sakano S, Naito K, Matsuyama H, Yamada T. Combined functional genome survey of therapeutic targets for clear cell carcinoma of the kidney. **Jpn J Clin Oncol** 41: 847-53, 2011.
6. Ando Y, Hojo M, Kanaide M, Takada M, Sudo Y, Shiraishi S, Sumikawa K, Uezono Y. S(+)-ketamine suppresses desensitization of g-aminobutyric acid type B receptor-mediated signaling by inhibition of the interaction of g-aminobutyric acid type B receptors with G protein-coupled receptor kinase 4 or 5. **Anesthesiology** 114: 401-411, 2011.
7. Minami K, Sudo Y, Yokoyama T, Ogata J, Takeuchi M, Uezono Y. Sevoflurane inhibits the m-opioid receptor function expressed in *Xenopus* oocytes. **Pharmacology** 88: 127-132, 2011.
8. Fujitsuka N, Asakawa A, Uezono Y, Minami K, Yamaguchi T, Nijima A, Yada T, Maejima Y, Sedbazar U, Sakai T, Hattori T, Kase Y, Inui A. Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival. **Transl Psychiatr** 1 (e23): 1-10, 2011.
9. Zushi Y, Narisawa-Saito M, Noguchi K, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Urade M, Kiyono T. An *in vitro* multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. **Am J Cancer Res** 1:869-881, 2011.
10. Kaida M, Ueno H, et al. Phase 1 trial of Wilms tumor 1 (WT1) peptide vaccine and gemcitabine combination therapy in patients with advanced pancreatic or biliary tract cancer. **J Immunother** 34:92-99, 2011.
11. Morizane C, Ueno H, et al. Construction and validation of a prognostic index for patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. **Pancreas** 40:415-421, 2011.

12. Ueno H, Okusaka T, et al. Multicenter phase II study of gemcitabine and S-1 combination therapy (GS Therapy) in patients with metastatic pancreatic cancer. **Jpn J Clin Oncol** 41:953-958, 2011.

(学会発表)

1. Narumi K, Udagawa T, Ikarashi Y, Ochiya T, Yoshida T, Aoki K. *In vivo* delivery of interferon- α gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance after autologous hematopoietic stem cell transplantation. The American Society of Gene Therapy's 14th Annual Meeting. May 18- 21, 2011 (Seattle, USA).
2. Udagawa T, Narumi K, Ikarashi Y, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses immunotolerant environment in tumors and induces antitumor immunity. 第70回日本癌学会総会. Oct 3-5, 2011.
3. Aida K, Udagawa T, Narumi K, Suzuki K, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami O, Yoshida T, Aoki K. Inhibition of regulatory T cells enhances antitumor immunity induced by intratumoral IFN- α gene transfer. 第70回日本癌学会総会. Oct 3-5, 2011.
4. Honda K, Yamamoto S, Tsuda H, Huang W, Chen W, Yamada T. Therapeutic target discovery for advanced stage ovarian cancer using proteome-scale antibody screening and quantitative virtual immunofluorescence microscopy. HUPO 2011 10th World Congress. September 4-7, 2011 (Geneva, Switzerland)
5. Yamada T, Honda K. Detection of early pancreatic cancer by plasma protein modification. The 7th Early Detection Research Network (EDRN) Scientific Workshop. September 13-16, 2011 (Virginia, USA).
6. Kiyono T. *In vitro* multi-step carcinogenesis models for gynecologic cancers (Symposium) 第70回日本癌学会学術総会 Oct 3-5, 2011
7. Ueno H, Kaniwa N, et al. Impact of cytidine deaminase (CDA)-related biomarkers on overall survival in advanced pancreatic cancer patients (pts) receiving gemcitabine (GEM) monotherapy. ASCO Annual Meeting 2011 (Chicago, USA).
8. Ueno H. Randomized Phase III study of gemcitabine plus S-1 (GS) versus S-1 versus gemcitabine (Gem) in unresectable advanced pancreatic cancer in Japan and Taiwan : GEST study. 5th Chinese Symposium on Medical Oncology 2011 (Beijing, China).
9. 上園保仁. 各種オピオイド製剤によるオピオイド耐性の違いを明らかにする-オピオイド受容体への作用メカニズム解析を通して. 第5回日本緩和医療薬学会年会. Sep 24-25, 2011.
10. 横山徹, 寺脇潔, 南浩一郎, 柳原五吉, 上田陽一, 上園保仁. がん悪液質モデルラットでは視策上核大細胞性ニューロンでの浸透圧感受性が変化している. 第70回日本癌学会学術総会 . Oct 3-5, 2011.

(書籍)

1. Narumi K, Aoki K. Combination of immune gene therapy with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation against solid cancers. In: Cellular and Genetic Practices for Translational Medicine ed. by J-Y. Kwak and J-Y. Han. Research Signpost, Kerala, India 2011, p227-246.
2. 中原知美, 清野 透 「マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック」第8章 ウイルス性腫瘍のマウスモデル 秋山徹, 奥山隆平, 河府和義編, 羊土社 pp142-62, 2011.

(知的財産権)

1. Method of Treating Solid Tumor (Patent No.: US 7,985,407 B2)
Date of Patent : Jul 26, 2011
Inventors : Aoki K, Yoshida T
Assignee : National Cancer Center