



Title	膵臓癌における線維化及びPD-L1の亢進に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	蔦保, 暁生
Description	配架番号 : 2648
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14708号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83034
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akio_Tsutaho_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 蔦保 暁生

学 位 論 文 題 名

膵臓癌における線維化及び PD-L1 の亢進に関する研究

(The studies on the elevated levels of fibrosis and PD-L1 of pancreatic cancer)

【背景と目的】

膵臓癌は、5年相対生存率 7.7%と報告されており、きわめて予後不良な疾患である。膵臓癌が予後不良であることの要因の一つに、desmoplasia と呼ばれる線維化が著明であることが挙げられる。線維化は、抗腫瘍免疫や治療の効果を弱めていると考えられており、そのメカニズムを明らかにすることは、膵臓癌の新たな治療戦略を見出すために重要な課題である。近年、非受容体型タンパク質チロシンキナーゼである focal adhesion kinase (FAK) の高発現が膵臓癌の線維化に寄与し、膵臓癌の悪性度と関連しているとの報告があるが、FAK 阻害剤単独の臨床試験での有効性は認められず、臨床応用には至っていない。我々は、様々な癌腫において低分子量 G 蛋白質である ARF6 と、その下流シグナル因子 AMAP1 を軸とする経路が癌の浸潤転移・治療抵抗性に関わることを報告してきた。近年、膵臓癌において代表的な遺伝子変異である *KRAS* と *TP53* が ARF6-AMAP1 経路を高発現させ活性化することを報告した。AMAP1 は、我々が、細胞-基質間接着分子 integrin の細胞裏打ち蛋白質 paxillin に結合する分子として同定し、アクチンリモデリングに関与する cortactin とも相互作用することにより、癌の浸潤・転移形質獲得に関与し、また、integrin そのもののリサイクリングに関与することを明らかにしてきた。一方、FAK は細胞接着班形成に伴ってチロシンリン酸化され、活性化される integrin 裏打ち蛋白質として同定され、AMAP1/ASAP1 と結合することが細胞接着班形成の制御に必須であることが報告されていた。これらの知見から、膵臓癌における免疫抑制的な環境形成のプロセスで FAK 活性化を介した間質反応の亢進、即ち、線維化の活性化に Arf6-AMAP1 経路が関与するのではないかと作業仮説の設定に至った。本研究では、Arf6-AMAP1 経路と膵臓癌の線維化の関連、免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療実験、さらに免疫回避に関わる腫瘍微小環境との関連を明らかにし、新たな治療戦略を見出すことを目的とした。

【材料と方法】

膵癌モデルマウス (*Pdx1-cre*; *LSL-KrasG12D*; *LSL-Trp53R172H*) 由来細胞株 KPC を使用し、shRNA を用いて *FAK*, *AMAP1* それぞれの遺伝子発現抑制細胞株を樹立した。Western blotting において *FAK*, *AMAP1* それぞれの発現抑制効率を解析した後に、以下の検討を行った。1) 2×10^5 個の KPC 細胞（コントロールおよび *FAK*, *AMAP1* 発現抑制細胞）を 6 週齢の雌 C57/BL6 と BALB/c マウスの背部皮下に注入して皮下腫瘍モデルマウスを作製し、腫瘍の体積を経時的に比較検討した。2) MTT アッセイを行い、コントロールおよび *FAK*, *AMAP1* 発現抑制細胞の細胞増殖能を比較検討した。3)

細胞注入から 14 日目に皮下腫瘍モデルマウスから腫瘍を摘出し、PD-L1 抗体を用いて免疫染色を行い、線維化については Sirius Red 染色を行って染色強度を比較検討した。4) 生後 6 週齢の雌 C57/BL6 と BALB/c マウスの背部皮下に 2×10^6 個の KPC 細胞（コントロールおよび AMAP1 発現抑制細胞）を注入し、コントロール群にはマウス IgG、治療群には抗マウス PD-1 抗体を定期的に腹腔内投与し、腫瘍体積を比較検討した。

ヒト膵癌手術検体 164 症例を用いて p-FAK, AMAP1, PD-L1 の免疫組織化学染色を行い、染色強度と生命予後との関連を評価した。また線維化についても Sirius Red 染色を行い、染色強度と生命予後との関連を評価した。

【結果】

KPC 細胞を用いたマウス皮下腫瘍モデルでは、コントロール群と比較し、FAK と AMAP1 を発現抑制した細胞で腫瘍の増大が緩やかであり、AMAP1 も FAK と同様に膵臓癌の腫瘍増殖能において関連があることが示唆された。また、*in vitro*における細胞増殖能を MTT アッセイで検討したところ、細胞増殖能に差を認めず、AMAP1 の腫瘍微小環境への影響が示唆されたため、同種移植 C57/BL6 マウス（immune competent）と異種移植 BALB/c ノードマウス（immune deficient）を用いて皮下腫瘍モデルを作成し、検討を行った。その結果、C57/BL6 マウスにおいて FAK, AMAP1 発現抑制により腫瘍増殖能は有意に低下したが、BALB/c ノードマウスにおいては、FAK, AMAP1 発現抑制による腫瘍増殖能はコントロール群と比較して有意差を認めなかった。

ヒト膵臓癌組織を用いた免疫染色による解析では、p-FAK と全生存期間、無病生存期間との関連は示されなかったが、AMAP1 低発現群では高発現群と比較し、全生存期間、無病生存期間に有意な延長を認めた。さらに、AMAP1 高発現群では低発現群と比較し、有意に線維化が高度であった。また、PD-L1 発現群では有意に全生存率の低下を認め、PD-L1 の発現の有無と AMAP1 発現程度に有意差を持って相関を認めた。

C57/BL6 マウスを用いて形成した皮下腫瘍を用いて、免疫染色を行った検討では、AMAP1 発現抑制により有意に線維化と PD-L1 発現の減少を認めた。また、免疫チェックポイント阻害抗体を用いた治療実験において、IgG 投与群、抗マウス PD-1 抗体投与群ともに AMAP1 発現抑制により腫瘍増殖能に有意な低下が認められ、AMAP1 発現抑制と抗マウス PD-1 抗体投与群の組み合わせにおいて、最も顕著な腫瘍増殖能の低下が観察された。

【考察】

今回の研究では、先行研究により示されていた膵臓癌の浸潤・転移における Arf6-AMAP1 経路との関わりにおいて、AMAP1 が膵臓癌の線維性間質の亢進に関与していることが示された。また、マウス皮下腫瘍と、ヒト膵臓癌切除検体を用いた免疫組織化学染色を施行した検討でも、AMAP1 と PD-L1 の発現に相関関係を認め、AMAP1 と PD-L1 の関連が示唆された。

【結論】

ARF6-AMAP1 経路は、線維性間質と PD-L1 の発現に寄与することで膵臓癌の悪性度進展に関連している可能性があること、ARF6-AMAP1 経路を高発現する癌において AMAP1 を阻害することにより、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果が改善する可能性があり、腫瘍微小環境のさらなる解析により、今後の治療において重要な知見となることが期待される。