



Title	膵臓癌における線維化及びPD-L1の亢進に関する研究
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14708
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83035
Type	doctoral thesis
File Information	Akio_Tsutaho.pdf



学 位 論 文

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)

2021 年 9 月

北 海 道 大 学

蔦保 暁生

学 位 論 文

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)

2021 年 9 月

北 海 道 大 学

蔦保 暁生

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
材料と方法	11 頁
結果	16 頁
考察	30 頁
結論	33 頁
謝辞	34 頁
利益相反	35 頁
引用文献	36 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. Tsutaho A, Hashimoto A, Hashimoto S, Hata S, Kachi S, Hirano S, Sabe H.

High expression of AMAP1, an ARF6 effector, is associated with elevated levels of PD-L1 and fibrosis of pancreatic cancer.

Cell Communication and Signaling. 18: 101, doi:10.1186/s12964-020-00608-8, 2020.

2. Hashimoto S, Furukawa S, Hashimoto A, Tsutaho A, Fukao A, Sakamura Y, Parajuli G, Onodera Y, Otsuka Y, Handa H, Oikawa T, Hata S, Nishikawa Y, Mizukami Y, Kodama Y, Murakami M, Fujiwara T, Hirano S, Sabe H.

ARF6 and AMAP1 are major targets of KRAS and TP53 mutations to promote invasion, PD-L1 dynamics, and immune evasion of pancreatic cancer.

PNAS. 116: 35, 2019.

要旨

【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、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我々が同定し、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 は細胞接着斑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斑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制御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いう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、当該経路阻害と免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療実験、さらに当該経路を介した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 C57BL/6 マウスと BALB/cAjl-nu/nu 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 C57BL/6 マウスと BALB/cAjl-nu/nu 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。

ヒト膵臓癌手術検体 164 症例を用いて 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 C57BL/6 マウス (immune competent) と異種移植 BALB/cAjl-nu/nu 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、C57BL/6 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/cAjl-nu/nu 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な差を認めなかった。

今回のヒト膵臓癌組織を用いた免疫染色による解析では、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。

C57BL/6 マウスにおける皮下腫瘍を用いて、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 発現抑制細胞注入による腫瘍増殖能はコントロール群と比較して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・転移に関わる ARF6-AMAP1 経路は、膵臓癌の線維性間質の亢進にも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において、AMAP1 と PD-L1 の発現に相関関係が認められ、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与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。

略語表

ARF	ADP-ribosylation factor
AMAP1	a multiple-domain ArfGAP protein 1
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ECL	enhanced chemi-luminescence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
eIF4A	eukaryotic initiation factor-4A
eIF4E	eukaryotic initiation factor 4E
FAK	focal adhesion kinase
GAP	GTPase activating protein
GDI	guanosine diphosphate dissociation inhibitor
GDP	guanosine diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchanging factor
GTP	guanosine triphosphate
IgG	immunoglobulin G
IHC	Immunohistochemistry
Irr	irrelevant
MHC	major histocompatibility complex
MST	median survival time
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PD-1	programmed cell death-1
PDGF	platelet derived growth factor
PD-L1	programmed cell death-ligand 1
p-FAK	phosphor- focal adhesion kinase
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RAS	rat sarcoma
SDS	sodium dodecyl sulfate
shRNA	short hairpin ribonucleotide
SH3	Src homology 3
TBS	tris-buffered saline

TBST	tris-buffered saline with Tween-20
TCR	T-Cell Receptor
WB	western blotting

【諸言】

膵臓癌の臨床的特徴

膵臓癌は近年増加傾向にあり，2019 年のがん統計予測では，本邦における膵臓癌の年間罹患数は 42,700 名で部位別では第 6 位，癌死亡数予測では 36,700 名と部位別では 4 位となっている（国立がん研究センターがん情報サービス，2020）．すなわち，膵臓癌は罹患数と死亡数が近似しており，5 年相対生存率は 7.7%と報告されており，癌のなかできわめて不良である（国立がん研究センターがん情報サービス，2020）．膵臓癌に対しては外科的治癒切除（遺残腫瘍を認めない R0 切除）が唯一の根治性を追求する治療法であり，根治切除例と非切除例を比べると，根治切除例の 5 年生存率，全生存期間中央値（median survival time : MST）は 18.8%，21.0 ヶ月であるのに対して，非切除例の 3 年生存率，MST は 3.1%，8.2 ヶ月ときわめて予後不良である（Egawa et al., 2012）．また，画像診断法の進歩した現在においても，診断時における切除可能例はわずか 20%程度であり，切除境界局所進行および局所進行切除不能例が 30～40%，遠隔転移例が 50～60%と報告されている（Gillen et al., 2010）．

膵臓癌における FAK と線維化

膵臓癌が予後不良であることの 1 つ大きな要因として，その組織学的な特徴があげられる．膵臓癌組織のなかでは癌細胞の占める割合は少なく，大半を癌ではない間質が占めており，特に *desmoplasia* と呼ばれる線維化が著明である．この線維化が治療抵抗性の一因であると考えられているが，詳細なメカニズムは明らかとなっていない．

近年，間質反応の強い膵臓癌モデルマウス KPC 由来の癌細胞において細胞外マトリックスと接着分子 *integrin* が相互活性するときに活性化される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) が高発現し，活性化の指標となるチロシン残基のリン酸化が亢進していることが明らかとなった（Jiang et al., 2016、Laklai et al., 2016）．FAK は膵臓癌患者の組織で高発現し，膵臓癌モデルマウスにおいては FAK 阻害剤を使用することで線維化が抑制され，免疫抑制に関わる腫瘍微小環境において変化をもたらすことで，抗 PD-1 抗体の併用により抗腫瘍効果を得ていると報告されている（Jiang et al., 2016）．

しかしながら，FAK に対する阻害剤を使用した臨床試験はいずれも第 3 相試験で効果が証明されたものはなく臨床応用には至っていない．

膵臓癌における ARF6-AMAP1 経路

低分子量 G タンパク質は 20-30kDa の GTP (guanosine triphosphate, グア

ノシン三リン酸) 結合タンパク質の総称である (Wittinghofer et al., 2014) . GTP との結合で活性化し, GDP (guanosine diphosphate, グアノシン二リン酸) への加水分解によりその機能を果たし, さらにその GDP を GTP へと交換することにより再活性化する. この性質から低分子量 G タンパク質は細胞内シグナル伝達の分子スイッチとしてはたらくことが知られている (Wittinghofer et al., 2014) . 代表的な低分子量 G タンパク質として, 主要ながん遺伝子 RAS の産物があることから, 低分子量 G タンパク質は Ras superfamily とも呼称される (Wittinghofer et al., 2014) .

低分子量 G 蛋白質 Arf (ADP-ribosylation factor) は, コレラトキシンの ADP-ribosylation 活性に関わる cofactor として同定された. Arf ファミリー蛋白質は, 6 種類のアイソフォームから成り, 膜の細胞内輸送や再構成の制御に関与することが知られている (Donaldson et al., 2011) . ARF6 は, 形質膜およびリサイクリングエンドソームに局在し, 細胞の膜輸送, クラスリン依存/非依存のエンドサイトーシス, アクチンリモデリングを介した膜の突出, 小胞のリサイクリングなど細胞内の多彩な機能を制御する (Wittinghofer et al., 2014, Donaldson et al., 2011) . ARF タンパク質は他の Ras superfamily タンパク質と違って GDI (guanosine diphosphate dissociation inhibitor, GDP 乖離阻害タンパク質) を持たず, その GDP/GTP サイクルは ArfGEF と ArfGAP によって制御されている (Wittinghofer et al., 2014, Donaldson et al., 2011) .

Sabe らの研究グループは, これまで乳癌、肺癌、腎癌、頭頸部癌において低分子量 G 蛋白質である ARF6 と, その下流シグナル因子 AMAP1 (a multiple-domain ArfGAP protein 1) を基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 (Hashimoto et al., 2004, Onodera et al., 2005, Morishige et al., 2008, Hashimoto et al., 2016, Otsuka et al., 2016) .

AMAP1 は ArfGAP の一種であり, ARF6 の GAP としての機能を有するが, その活性は低く, むしろエフェクターとしての機能の方が重要であると考えられている (Wittinghofer et al., 2014, Donaldson et al., 2011) . 実際 AMAP1 は SH3 (Src homology 3) ドメインを有しており, 様々なタンパク質と相互作用し, ARF6 の局在する細胞膜や小胞のごく近傍に足場を形成することが知られている. また, AMAP1 は接着斑を形成する paxillin, アクチンリモデリングに関与する cortactin, EMT により誘導される間葉形質特異的蛋白質 EPB41L5 といったタンパク質とも相互作用し, 間葉系の形質を担保することに寄与している (Onodera et al., 2005, Hashimoto et al., 2006, Hashimoto et al., 2016) . 近年, Sabe らのグループから, 膵臓癌の代表的な 4 つの遺伝子変異 (*KRAS*, *TP53*, *CDKN2*, *SMAD4*) のなかで, *TP53/KRAS* 変異が ARF6-

AMAP1 経路を高発現させ活性化することが報告された (Hashimoto et al., 2019). *KRAS* 変異は mRNA 翻訳に関与する RNA helicase である eIF4A を活性化し ARF6 mRNA 翻訳を促進すること、また同時に、mRNA 翻訳に関与する Cap 結合蛋白質である eIF4E を活性化し AMAP1 mRNA 翻訳を促進した. 一方、*TP53* 変異は PDGF 受容体を介する ARF6 活性化過程を促進した (図 1).

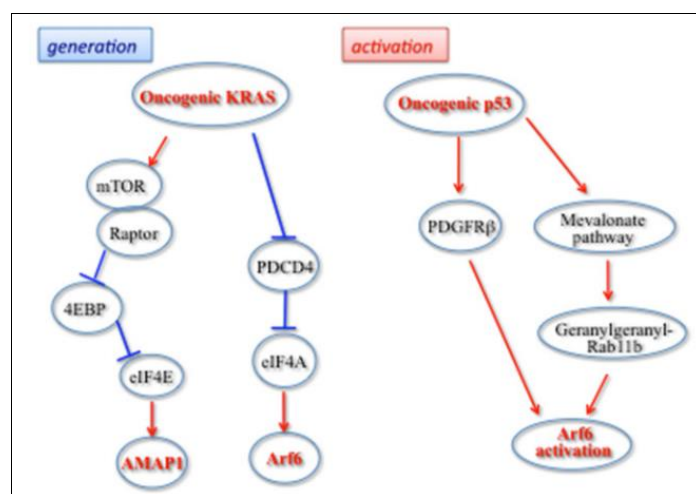


図 1 *ARF6-AMAP1* 経路は *KRAS/TP53* 遺伝子変異の標的

同時に、Sabe らは膵臓癌モデルマウスを用いた解析から AMAP1 が膵臓癌の免疫回避に関与することを見出した. 癌細胞と CTL 間での免疫シナプス形成において、癌細胞側の主要組織適合抗原と CTL 側の抗原認識する TCR などのアクセサリー分子群の相互作用により細胞傷害性が活性化もしくは抑制される. 後者の場合、免疫チェックポイント分子 PD-L1 と PD-1 の集積が上げられる. 免疫シナプス形成における細胞表面蛋白質の集積過程において、蛋白質の側面移動の関与は少なく、細胞内輸送が大きく関与する. ARF6 は形質膜及びリサイクリングエンドソームに局在し、integrin などのリサイクリングを担う因子であることから、PD-L1 の細胞内動体との関連を検討したところ、当該経路が PD-L1 の細胞膜表面上へのリサイクリングの亢進に関与していることを明らかにした (Hashimoto et al., 2019).

一方、Parsons らのグループにより FAK が AMAP1/ASAP1 と相互作用することが細胞接着斑形成に必須であることが報告されていた (Liu et al., 2002). 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.

本研究において、ARF6-AMAP1 経路が膵臓癌の線維化亢進の新たな治療標的になると推測し、線維化と ARF6-AMAP1 経路との関連に着目し、主に動物実験により検証することとした。

【材料と方法】

細胞培養

京都大学医学部の児玉裕三先生、西川義浩先生より分与いただいた C57BL/6 マウスを背景とした膵臓癌モデルマウス (Pdx1-cre; LSL-*KrasG12D*; LSL-*Trp53R172H*) に形成された腫瘍を摘出して、2-3mm 角に切り分け、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, ダルベッコ変法イーグル培地) に 1%P/S(Penicillin Streptomycin)を添加した培地にて培養し、増殖してきた細胞から樹立した膵臓癌細胞株 KPC を実験用細胞株として用いた。細胞株は 2mM L-グルタミン, 1.2 g/L 重炭酸ナトリウム, 0.5mM ピルビン酸ナトリウムが添加された DMEM に 10% FBS (fetal bovine serum, 非働化ウシ胎児血清, Hyclone) を添加した培地を用いて 37°C, 5% CO₂ の条件下で維持した。細胞の剥離時の培地除去には 1% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸) を含む PBS (phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水, pH 7.4) を使用し、剥離時には 0.25% トリプシンを添加した 1% EDTA/PBS を用いた。トリプシン活性の停止処理には FBS 添加培地を用いた。使用したバッファー等の組成を以下に列挙する。

PBS:

140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄

抗体および試薬

本章において使用した抗体および試薬を以下に列挙する。

抗 AMAP1 抗体 (北海道大学医学部分子生物学分野より御分与, Onodera et al., 2005)

抗 FAK 抗体 (北海道大学医学部分子生物学分野より御分与, Mazaki et al., 1997)

抗 phospho-FAK(Y397)抗体 (ウサギ, モノクローナル, 31H5L17, Thermo Fisher Scientific)

抗 PD-L1 抗体 (ウサギ, モノクローナル, E1L3N, Cell Signaling)

抗 PD-L1 抗体 (ウサギ, ポリクローナル, NBP2-15791, Novus)

抗 β -actin 抗体 (マウス, モノクローナル, AC-74, Sigma-Aldrich)

Picro-sirius red 試薬 (Sigma-Aldrich, S365548)

マウス IgG (BioXcell, MOPC-21)

抗マウス PD-1 抗体 (小野薬品より御分与, 4H2)

RNA 干渉

shRNA (short hairpin RNA) を発現する構築をレンチウイルスにより細胞に導入し RNA 干渉による遺伝子発現抑制を行った。ウイルスパッケージング用細

胞 293FT (Invitrogen, 完全培地: DMEM, 10% FCS, 6mM L-Glutamine, 0.1mM MEMNEAA, 1mM Pyruvate) に pLKO.1-puro vector をバックボーンとした各種 shRNA 発現用 plasmid, エンベロープ発現用 plasmid の pMD2.G (Addgene #12259), ウイルスパッケージング plasmid の psPAX2 (Addgene #12260) を Lipofectamine LTX (Invitrogen) によりトランスフェクションし, ウイルスを作成した. トランスフェクションは 6-well dish scale で行い, 500 μ L の opti-MEM (opti- minimum essential media, Invitrogen) に 3 μ g の DNA (pLKO:pMD2.G:psPAX2 = 8:1:3), 6 μ L Lipofectamine LTX を混合し, 室温で 25 min 静置した後 1.5mL DMEM と共に細胞に加え, 24h インキュベートした. この操作を 40%コンフルエントの状態から 2 回行った. ウイルス感染は ϕ 6cm dish scale で行い, ウイルスを発現している 293FT 細胞の培養上清を回収, 3000g で 5min 遠心したのち, 感染させたい細胞に polybrane (終濃度: 8 μ g/mL) と共に 24h 作用させた. ウイルス感染から 48h 後, puromycin (終濃度: 1 μ g/mL) にて selection を行い, 各アッセイに細胞を使用した. 用いた shRNA のターゲット配列は下に列挙する.

AMAP1 #1 5'-GACCTGCTGCAGAACCTTATA-3'

AMAP1 #2 5'-AGATGTGTGAATATCTCATTA-3'

FAK #1 5'-CCTGGCATCTTTGATATTATA-3'

FAK #2 5'-GCCTTAACAATGCGTCAGTTT-3'

ヒト病理組織と免疫組織染色およびスコア化

ヒト膵臓癌組織は, 北海道大学病院消化器外科学教室 II にて外科的切除され, インフォームドコンセントを得た患者標本であり, 本研究は北海道大学病院倫理委員会の承認 (研究番号: 017-0059) のもとで行った. 2000 年から 2011 年までに化学療法や放射線療法などの術前治療未施行の膵臓癌患者で評価を行った. 免疫組織染色は Morpho Technology 社への外注にて行った. 具体的には, ホルマリン固定後パラフィンに包埋した標本を厚さ 3 μ m で連続切片とし, キシレンと段階希釈したアルコールによって脱パラフィン化した. TBS (tris-buffered saline, pH7.4) で洗浄したのち, Dako EnVision FLEX Target Retrieval Solution (pH 9.0) により抗原賦活化処理を行った. この処理は Dako PT Link を用いて 97 °C, 20 min の条件下で行った. 抗 AMAP1 抗体(1:750), 抗 PD-L1 抗体(Cell Signaling, 1:200), 抗 p-FAK 抗体(1:100)と 30min 反応させ, Dako Envision FLEX system を用いて可視化した. 発色の為に 5min DAB (3,3'-Diaminobenzidine, Dojin) と反応させた. ヘマトキシリン染色をカウンター染色として用いた. スコア化は染色強度を 0 から 3 までの 4 段階評価 (negative=0, low=1, middle=2, high=3), 陽性細胞率は 0 から 1.0 までの 11 段階評価 (0%=0,

10-90%=0.1-0.9, 100%=1.0) として, H score を染色強度と陽性細胞率の積として計算した.

H score=染色強度×陽性細胞率 (0-3.0)

癌の中心部で代表的な染色強度の部位を数カ所選択し, その強度の平均値を算出した.

検体を高発現群と低発現群に分ける際には計測した H score の中央値をカットオフラインとして用いた.

標本評価は病理医を含む計 2 名の医師により行った.

Sirius Red 染色に関しては試薬を用いて染色後に画像処理ソフト Image J を用いて評価を行った.

生存解析

病理組織の免疫組織染色によるスコア化に基づき, 二群間での無病生存率と全生存率を Kaplan-Meier 法を用いて検討した. 観察期間の開始は外科的切除を行った時点とし, 終了は無病生存率については疾患の増悪・再発の診断時点もしくは原因に関わらず死亡した時点, 全生存率は死亡時点もしくは最近の follow-up 時点とした.

MTT アッセイ

Cell Titer 96® (Promega)を使用して MTT アッセイを行った. 96-well ディッシュに 1×10^4 個の細胞を播き込み, 37°C, 5% CO₂ の条件下で 12h から 24h 培養したのち, 完全培地にて 5 倍希釈した Cell Titer 96® を加え, 同様の条件下で 90min 維持した. プレートリーダー(Perkin Elmer Japan, ARVO MX)により波長 490nm の吸光度を測定した.

マウス皮下腫瘍モデルと免疫組織染色

生後 6 週齢の C57BL/6 マウスと BALB/cAjl-nu/nu マウス (ともに雌, Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan) の背部に 2×10^5 個の KPC 細胞と 50% Growth Factor Reduced BD Matrigel Matrix (BD Bioscience) を皮下注射し, 腫瘍を形成した. 腫瘍の長径と短径を経時的に測定し, 体積を算出した. 腫瘍は細胞注入から 14 日目に摘出し, 上記ヒト組織に対する免疫染色と同様のプロトコールで, 抗 PD-L1 抗体 (Novus, 1:200)を用いて免疫染色を行った. Sirius Red 染色についてもヒト組織と同様に行った. 全ての動物実験は、「北海道大学動物実験に関する規定」に従って実施した.

抗マウス PD-1 抗体を用いた治療実験

生後 6 週齢の C57BL/6 マウス（雌, Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan）の背部に 2×10^6 個の KPC 細胞と 50% Growth Factor Reduced BD Matrigel Matrix (BD Bioscience) を皮下注射し、腫瘍を形成した。細胞注入から 10 日目、14 日目、17 日目に、コントロール群にはマウス IgG, 治療群には抗マウス PD-1 抗体をそれぞれ 1mg/kg 腹腔内投与し、腫瘍の長径と短径を経時的に測定して体積を算出した。

SDS-PAGE およびウエスタンブロット

培養細胞におけるタンパク質発現状況を確認するため、mRIPA バッファーを用いて細胞を溶解し、サンプルバッファーを用いてタンパク質濃度 80 μ g/100 μ L の細胞抽出液を作成し、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法) および WB (western blotting, ウエスタンブロッティング法)により検出した。SDS-PAGE は目的のタンパク質の分子量に応じて 8-15%分離ゲルと 5%濃縮ゲルを用いて Running バッファー中で等電流電気泳動（ゲルー枚あたり 150V, 25mA, 100W, 1h45min）を行った。泳動後のゲルは transfer バッファー中で等電圧電気泳動（50V, 150mA, 100W, 2h）を行い、PVDF (ポリフッ化ビニリデン, polyvinylidene difluoride) メンブレン上に転写した。メンブレンの洗浄には TBST (tris buffered saline with 0.1% Tween-20)を用いた。抗体添加の前に室温, 1h のブロッッキングを行った。ブロッッキング液は抗体に応じて 5% BSA (bovine serum albumin) /TBST もしくは 5%スキムミルク/TBST を使用した。一次抗体を添加したブロッッキング液中で 4°C, オーバーナイト, 二次抗体を添加したブロッッキング液中で室温, 1h 反応させたのち、ECL (enhanced chemiluminescence) WB 検出キット(GE healthcare)を用いて検出した。使用したバッファー等の組成を以下に列挙する。

mRIPA バッファー:

1% Triton X-100, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 5mM EDTA, 1% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1% SDS, 10% glycerol, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), 5 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 3 μ g/ml pepstatin A

サンプルバッファー:

50 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% BPB (bromophenol blue), 100mM DTT (dithiothreitol)

Running バッファー:

25 mM Tris, 250 mM Glycine, 0.1% SDS

Transfer バッファー:

25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.01% SDS, 20% メタノール

TBST:

10mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 0.1% Tween-20

統計解析

全ての統計解析は JMP® version 14 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を用いて行い, $P < 0.05$ を有意とした. 群間の比較には Student's t -test を行った. Kaplan-Meier 曲線の有意性検定には log-rank test を行った. 相関分析には Spearman rank correlation test を行った.

【結果】

1 KPC 細胞における FAK, AMAP1 発現抑制によるマウス皮下腫瘍形成能への影響 (予備実験)

shRNA を用いて FAK と AMAP1 をノックダウンした 2×10^5 個の KPC 細胞を C57BL/6 マウス皮下に移植し、腫瘍の大きさを経時的に測定してコントロール群 (irr) と比較した。図 2-1 に示すように、irr と比較し FAK と AMAP1 を発現抑制した細胞では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形成能において関連があることが示唆された。図 2-2 に FAK と AMAP1 の遺伝子発現抑制効率を示す。

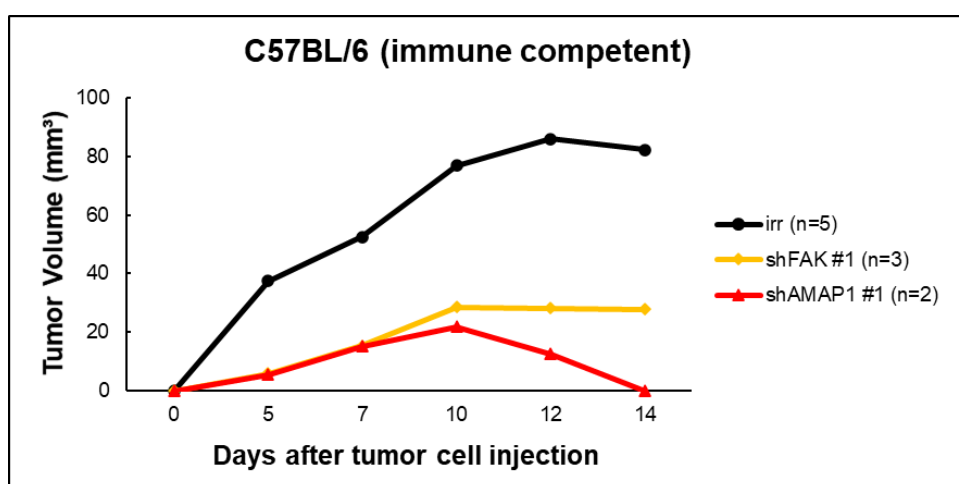


図 2-1 マウス皮下腫瘍モデルにおける経時的腫瘍サイズ比較

KPC 細胞コントロール群 (irr) と FAK 発現抑制細胞 (shFAK), AMAP1 発現抑制細胞 (shAMAP1) を C57BL/6 マウスの背部皮下に 2×10^5 個注入し、経時的にサイズを測定し体積を比較した。

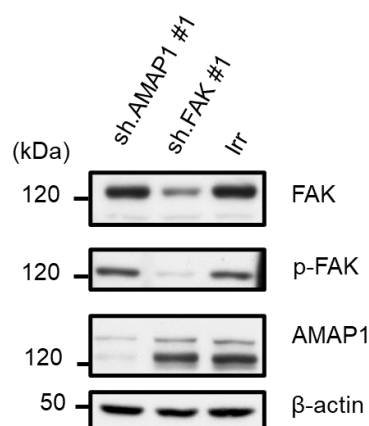


図 2-2 膵臓癌細胞株 KPC における FAK, AMAP1 遺伝子発現抑制効率

shRNA による *FAK*, *AMAP1* の遺伝子発現抑制効率を *WB* により確認した。左端は明示した分子量のマーカー位置を示す。

2 KPC 細胞における *FAK*, *AMAP1* 発現抑制による細胞増殖能への影響 (in vitro)

マウスモデル皮下腫瘍モデルにおいて、*FAK*, *AMAP1* を発現抑制した際に腫瘍サイズに変化が見られた。この変化が線維化・免疫逃避機能等の腫瘍微小環境におけるものであるかを確認するために、in vitro におけるそれぞれの細胞増殖能を *MTT* アッセイで検討したところ、図 3 に示すように *MTT* アッセイにおいて細胞増殖能に差を認めなかった。

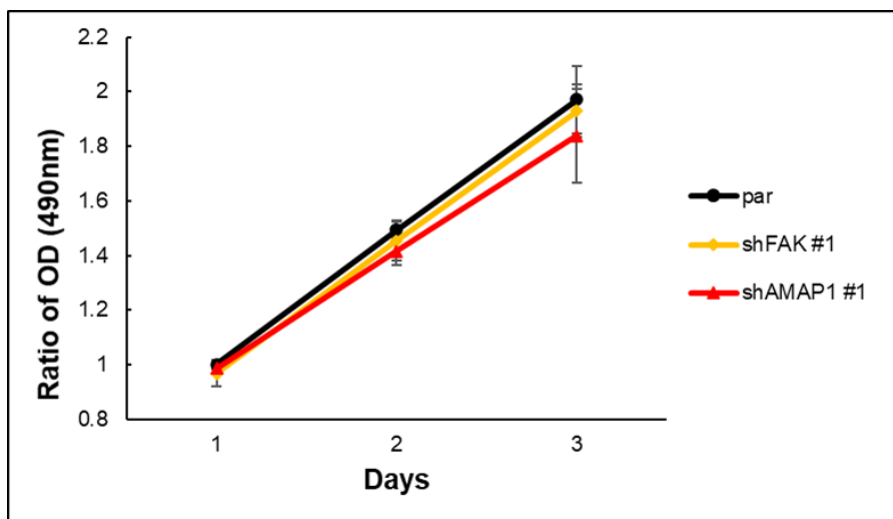


図 3 膝癌細胞株 *KPC* において *FAK*, *AMAP1* を発現抑制した際の細胞増殖能の比較

MTT アッセイにより *KPC* 細胞において *FAK*, *AMAP1* を発現抑制した際の細胞増殖能を求めた。1 日目のコントロール群 (*par*) の波長 490nm の吸光度を 1.0 として比較を行った。各群それぞれ測定日毎に 6well の吸光度を測定し平均値を測定し検討した。群間比較には *Student's t-test* を施行した。

3 KPC 細胞における *FAK*, *AMAP1* 発現抑制によるマウス皮下腫瘍形成能への影響 (本実験)

AMAP1 の免疫回避における関連を明らかにする目的で、*C57BL/6* マウスと *BALB/cAjl-nu/nu* マウスを用いて皮下腫瘍モデルを作成し、検討を行った。図 4-1 に示すように、*C57BL/6* マウスにおいて *FAK*, *AMAP1* 発現抑制により腫瘍形成能は有意に低下したが、*BALB/cAjl-nu/nu* マウスにおいては、*FAK*,

AMAP1 発現抑制による腫瘍形成能はコントロール群と比較して有意差を認めなかった (図 4-2)。

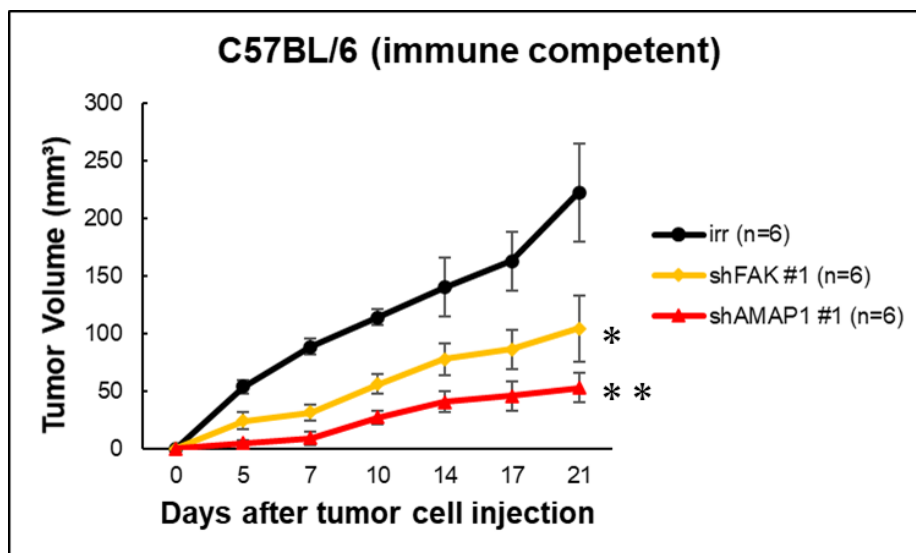


図 4-1 C57/BL6 マウス皮下腫瘍モデルにおける経時的腫瘍サイズ比較

KPC 細胞コントロール群 (*irr*) と FAK 発現抑制細胞 (*shFAK*), AMAP1 発現抑制細胞 (*shAMAP1*) を C57BL/6 の背部皮下に 2×10^5 個注入し, 経時的にサイズを測定し体積を比較した. 群間比較には *Student's t-test* を施行した. *は $P < 0.05$, **は $P < 0.01$ を示す.

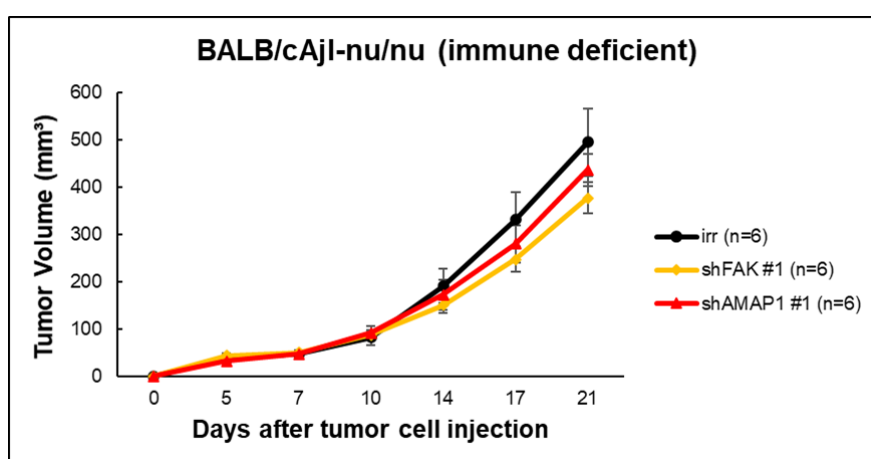


図 4-2 BALB/cAjl-nu/nu マウス皮下腫瘍モデルにおける経時的腫瘍サイズ比較

KPC 細胞コントロール群 (*irr*) と FAK 発現抑制細胞 (*shFAK*), AMAP1 発現抑制細胞 (*shAMAP1*) を BALB/cAjl-nu/nu の背部皮下に 2×10^5 個注入し, 経時的にサイズを測定し体積を比較した. 群間比較には *Student's t-test* を施行した.

4 ヒト腓膵臓癌組織における p-FAK, AMAP1, 線維化と予後との関連

ヒト腓膵臓癌組織を用いて免疫染色を行い、p-FAK, AMAP1, 線維化と予後との関連を検討した。患者情報を表 1 に示す。p-FAK と AMAP1 については、染色強度を 4 段階に分類して H score を算出し、中央値をカットオフラインとして高発現群と低発現群に分類した。染色強度の分類例を図 5-1 と図 5-3 に示す。線維化については Sirius red 染色を行い、フリーソフト Image J を用いて染色面積を算出し、中央値をカットオフラインとして高線維化群と低線維化群に分類した。この群分けに応じて、FAK, AMAP1 の発現量と線維化について、無病生存率、全生存率との相関を Kaplan-Meier 法を用いて解析した。図 5-2 に示すように p-FAK と全生存率、無病生存率との関連は示されなかった。図 5-4 に示されるように AMAP1 高発現群では低発現群と比較し、全生存率、無病生存率において有意差を認めた。図 5-6 に示されるように、高線維化群では低線維化群と比較して全生存率において有意差を認めた。

表 1 本研究に使用した患者標本の臨床情報 (n=164)

		n (%)
性別	男性	96 (58.5%)
	女性	68 (41.5%)
年齢		65 (43-89) ^b
腫瘍位置	膵頭部	94 (57.3%)
	膵体尾部	70 (42.7%)
腫瘍径, cm		3.0 (1.0-8.0) ^a
腫瘍遺残	陽性	23 (14.0%)
	陰性	141 (86.0%)
T 分類	1+2	7 (4.3%)
	3+4	157 (95.7%)
リンパ節転移	陽性	125 (76.2%)
	陰性	39 (23.8%)
遠隔転移	陽性	12 (7.3%)
	陰性	152 (92.7%)
病理学的ステージ	IA-IIA	38 (23.2%)
	IIB-IV	126 (76.8%)
リンパ管浸潤	陽性	107 (65.2%)
	陰性	57 (34.8%)

脈管浸潤	陽性	135 (82.3%)
	陰性	29 (17.7%)
神経叢浸潤	陽性	144 (88.4%)
	陰性	20 (11.6%)
術後補助化学療法 ^b	陽性	83 (50.6%)
	陰性	80 (48.8%)
再発 ^c	陽性	131 (79.9%)
	陰性	31 (18.8%)

a 中央値

b 1名の患者からは術後補助化学療法に関する情報は得られなかった。

c 2名の患者からは再発に関する情報は得られなかった。

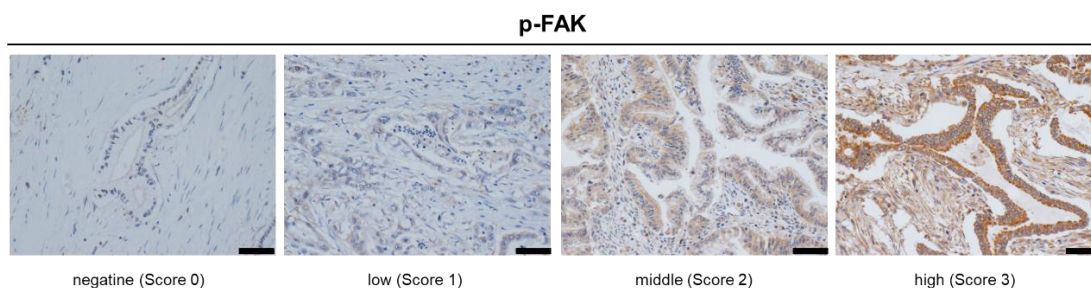


図 5-1 *p*-FAK 発現量に応じたスコア

患者標本を免疫組織化学により染色し *p*-FAK の発現状況をスコアリングした。スケールバーは 50 μ m を表す。

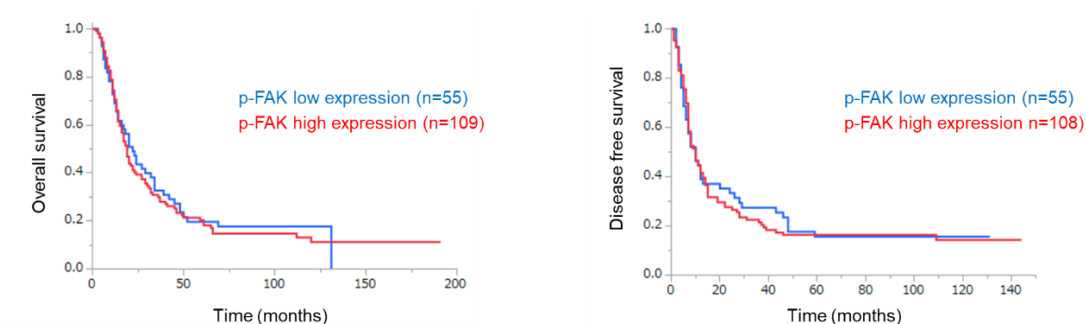


図 5-2 *p*-FAK 発現量と予後の関係

p-FAK の発現量により群分けを行い, Kaplan-Meier 法により全生存率と無病生存率との相関を検討した。log-rank 法により *P* 値を算出した。

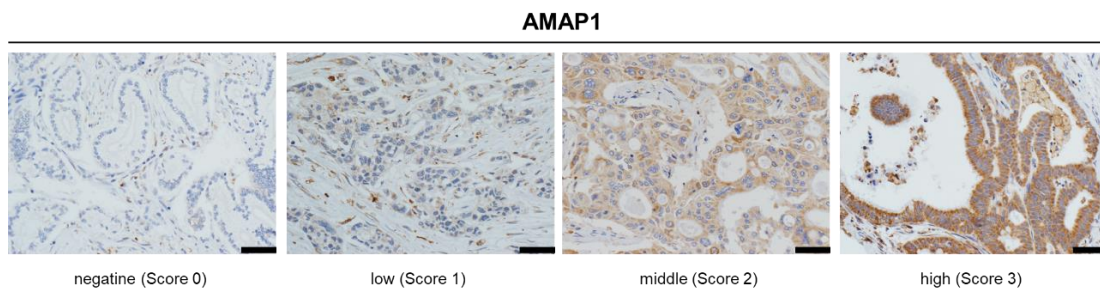


図 5-3 *AMAP1* 発現量に応じたスコア

患者標本を免疫組織化学により染色し *AMAP1* の発現状況をスコアリングした。スケールバーは $50\ \mu\text{m}$ を表す。

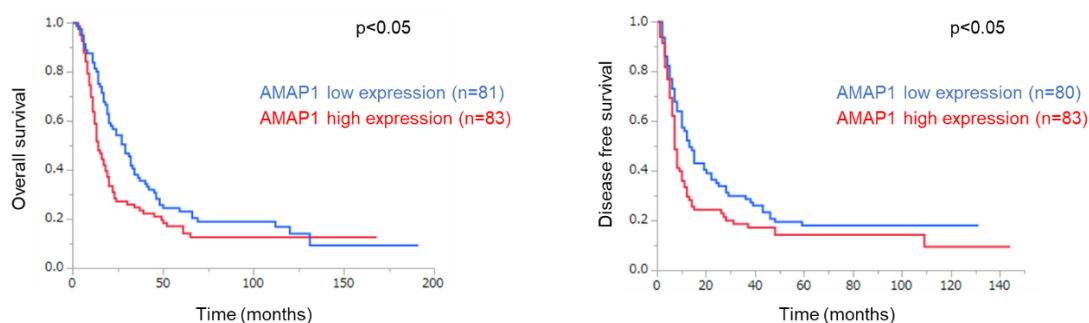


図 5-4 *AMAP1* 発現量と予後の関係

AMAP1 の発現量により群分けを行い, *Kaplan-Meier* 法により全生存率と無病生存率との相関を検討した。 *log-rank* 法により *P* 値を算出した。

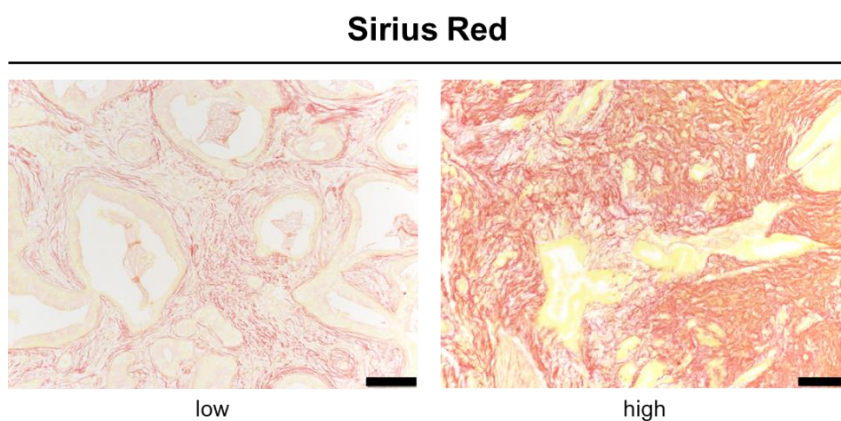


図 5-5 線維化に応じた分類

患者標本を *Picro Sirius red* 試薬により染色し *Image J* を用いて定量化し分類した。スケールバーは $50\ \mu\text{m}$ を表す。

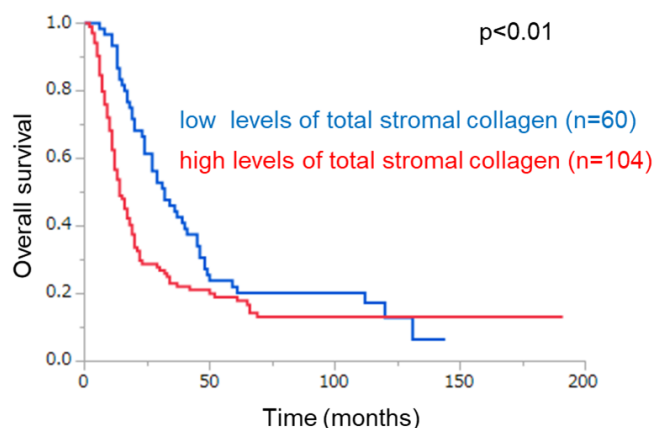


図 5-6 線維化と予後の関係

Sirius Red 染色面積により群分けを行い, *Kaplan-Meier* 法により全生存率との相関を検討した. *log-rank* 法により *P* 値を算出した.

5 ヒト膵臓癌組織における p-FAK, AMAP1 と線維化との関連

次に, 同一の標本を用いて p-FAK の発現程度と線維化との関連, AMAP1 の発現程度と線維化との関連を検討した. 図 6-1 に示すように, p-FAK は高発現群と低発現群において線維化との関連は認めなかった. 図 6-2 に示すように, 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.

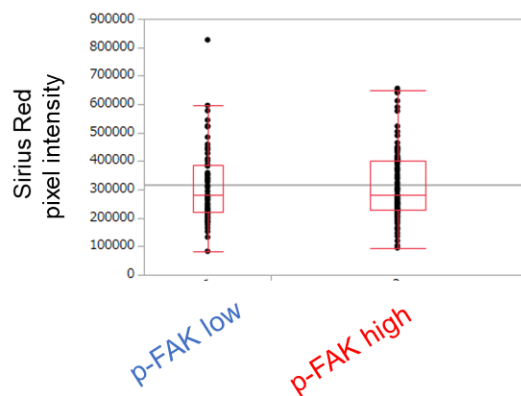


図 6-1 p-FAK 発現程度と線維化の関連

p-FAK 低発現群と高発現群における *Sirius Red* 染色面積を比較した. 群間比較には *Student's t-test* を施行した.

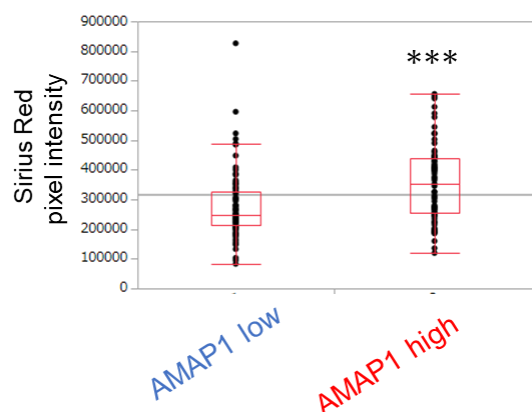


図 6-2 AMAP1 発現程度と線維化の関連

AMAP1 低発現群と高発現群における *Sirius Red* 染色面積を比較した。群間比較には *Student's t-test* を施行した。***は $P < 0.001$ を示す。

6 ヒト膵臓癌組織における PD-L1 と AMAP1、予後との関連

同一の標本を用いて PD-L1 と予後との関連、PD-L1 と AMAP1 の関連を検討した。PD-L1 は腫瘍組織が 10%以上染色されている標本を陽性、10%未満の標本を陰性として分類した。染色強度の分類例を図 7-1 に示す。この分類に応じて、PD-L1 の発現の有無と全生存率との相関を *Kaplan-Meier* 法を用いて解析した。図 7-2 に示すように、PD-L1 発現群では有意に全生存率の低下を認めた。図 7-3 に示すように、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。

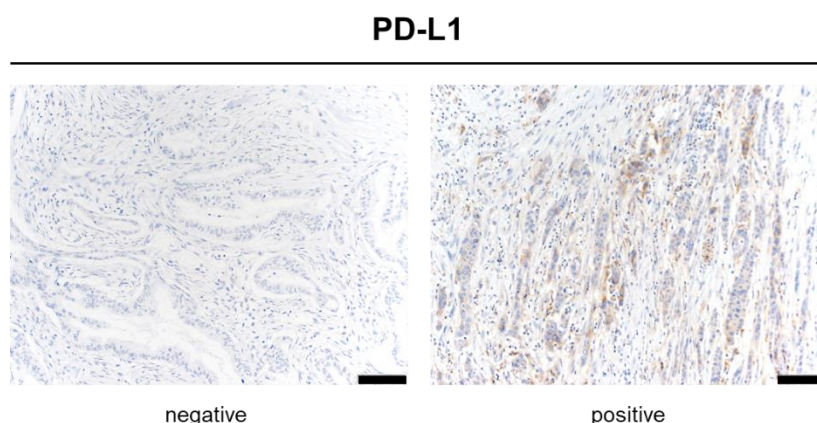


図 7-1 PD-L1 発現の有無に応じた分類

患者標本を免疫組織化学により染色し PD-L1 の発現状況を染色強度に応じて分類した。スケールバーは $50\ \mu\text{m}$ を表す。

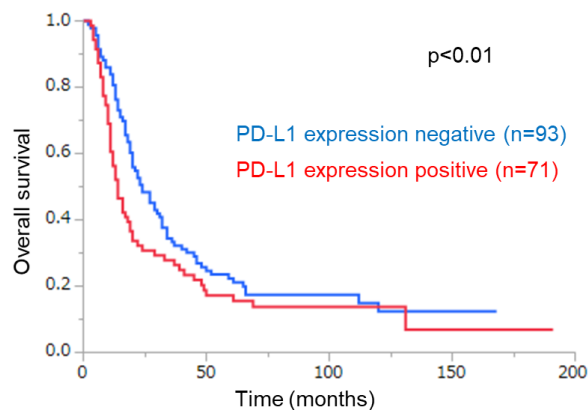


図 7-2 PD-L1 発現の有無と予後の関係

PD-L1 の発現の有無により群分けを行い, *Kaplan-Meier* 法により全生存率との相関を検討した. *log-rank* 法により *P* 値を算出した.

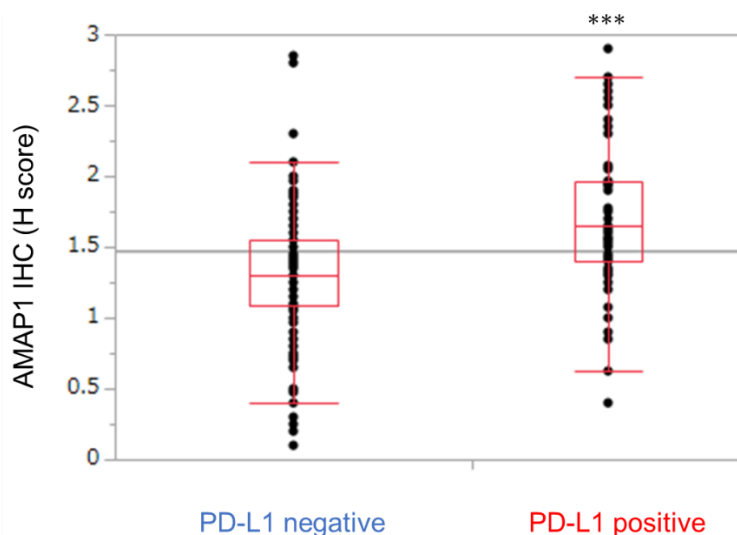


図 7-3 PD-L1 発現の有無と AMAP1 発現程度との関連

PD-L1 発現の有無における AMAP1 発現程度を比較した. 群間比較には *Student's t-test* を施行した. ***は $P < 0.001$ を示す.

7 KPC 細胞における AMAP1 発現抑制による影響

ヒト膵臓癌組織を用いた免疫染色により, AMAP1 の線維化と免疫回避への関連が示唆されたため, 2 種類の AMAP1 ノックダウン細胞を用いて, 改めて *in vitro*, *in vivo* における AMAP1 発現抑制による影響を検討した. 図 8-1 に AMAP1 の遺伝子発現抑制効率を示す. 図 8-2 に示すように MTT アッセイにおいて細胞増殖能に差を認めなかった. 図 8-3 に示すように, C57BL/6 マウス

において AMAP1 発現抑制により腫瘍形成能は有意に低下したが、BALB/cAjl-nu/nu マウスにおいては、AMAP1 発現抑制による腫瘍形成能はコントロール群と比較して有意差を認めなかった (図 8-4)。

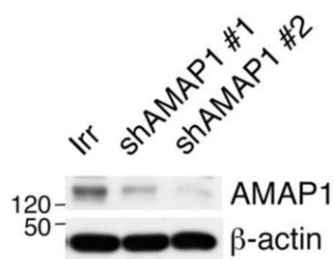


図 8-1 膵臓癌細胞株 *KPC* における *AMAP1* 遺伝子発現抑制効率

shRNA による *AMAP1* の遺伝子発現抑制効率を *WB* により確認した。左端は明示した分子量のマーカ位置を示す。

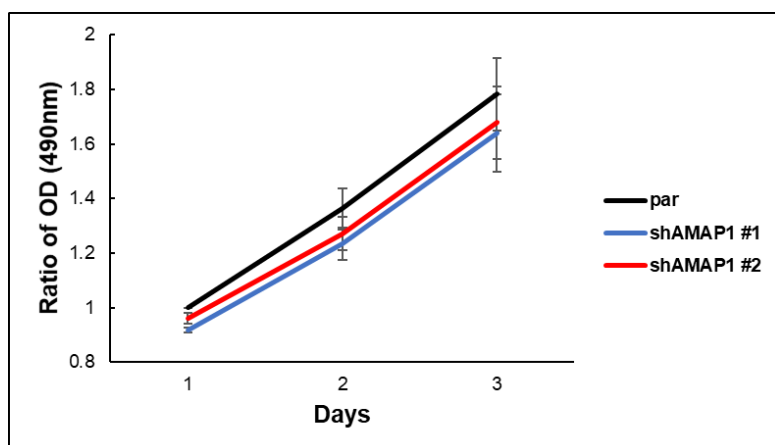


図 8-2 膵癌細胞株 *KPC* において *AMAP1* を発現抑制した際の細胞増殖能の比較

MTT アッセイにより *KPC* 細胞において *AMAP1* を発現抑制した際の細胞増殖能を求めた。1 日目のコントロール群 (*par*) の波長 490nm の吸光度を 1.0 として比較を行った。各群それぞれ測定日毎に 6well の吸光度を測定し平均値を測定し検討した。群間比較には *Student's t-test* を施行した。

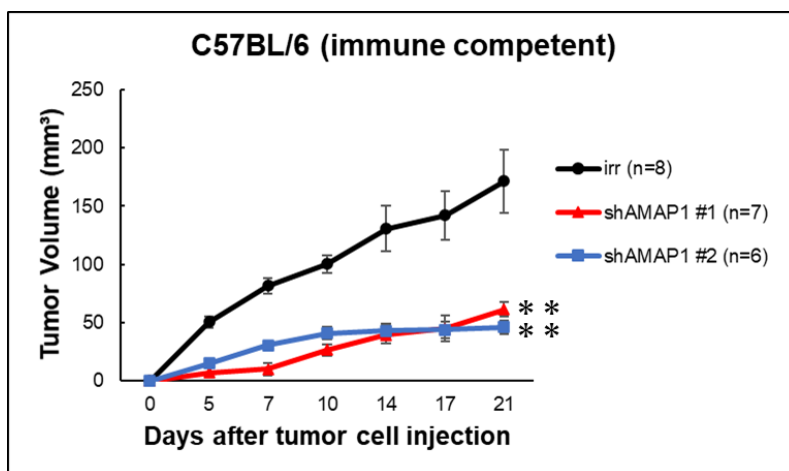


図 8-3 C57BL/6 マウス皮下腫瘍モデルにおける経時的腫瘍サイズ比較

KPC 細胞コントロール群 (irr) と AMAP1 発現抑制細胞 (shAMAP1) を C57BL/6 マウスの背部皮下に 2×10^5 個注入し，経時的にサイズを測定し体積を比較した．群間比較には Student's *t*-test を施行した．**は $P < 0.01$ を示す．

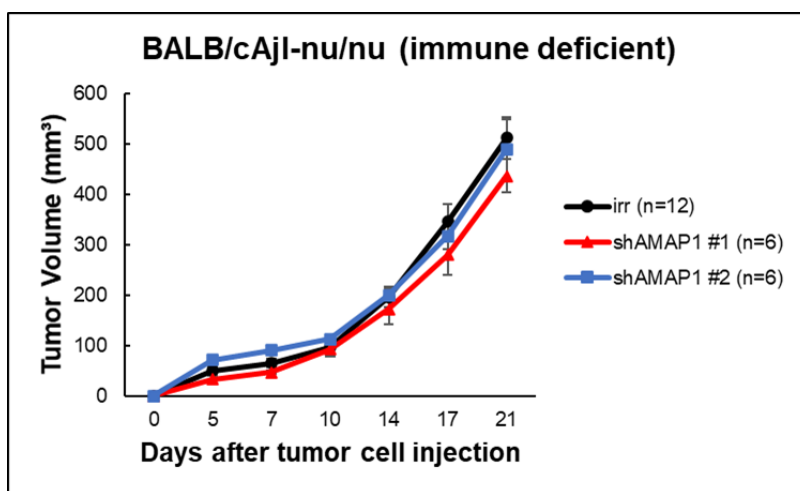


図 8-4 BALB/cAjl-nu/nu マウス皮下腫瘍モデルにおける経時的腫瘍サイズ比較

KPC 細胞コントロール群 (irr) と AMAP1 発現抑制細胞 (shAMAP1) を BALB/cAjl-nu/nu マウスの背部皮下に 2×10^5 個注入し，経時的にサイズを測定し体積を比較した．群間比較には Student's *t*-test を施行した．

8 マウス皮下腫瘍モデルにおける AMAP1 発現抑制と線維化，PD-L1 発現との関連

C57BL/6 マウスを用いて形成した皮下腫瘍を，KPC 細胞注入後 14 日目に摘出し，免疫染色を行った．線維化の評価は Sirius Red 染色を用いて行い，定量

化には Image J を使用した．図 9-1 に各群の代表的な染色図を示す．図 9-2 に示すように，AMAP1 発現抑制により有意に線維化の減少を認めた．PD-L1 染色は，H score を算出して評価を行った．図 9-3 に各群の代表的な染色図を示す．図 9-4 に示すように，AMAP1 発現抑制により有意に PD-L1 発現の減少を認めた．

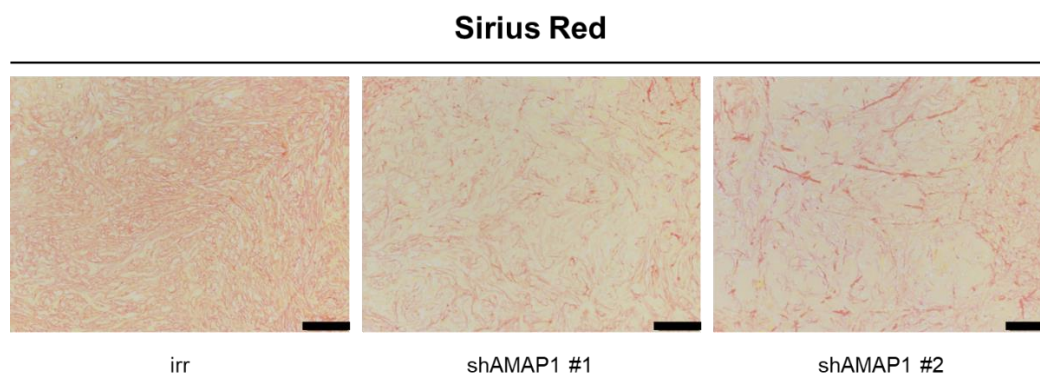


図 9-1 C57BL/6 マウス皮下腫瘍の Sirius Red 染色

C57BL/6 マウス皮下腫瘍の Picro Sirius red 試薬による代表的な染色例．スケールバーは 50 μm を表す．

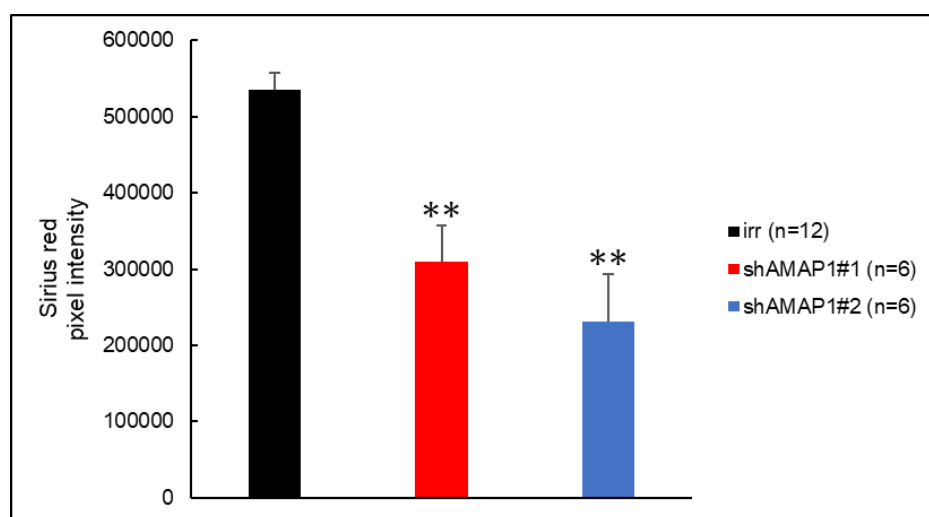


図 9-2 C57BL/6 マウス皮下腫瘍における線維化の評価

Picro Sirius red 試薬により染色した C57BL/6 マウス皮下腫瘍を Image J を用いて定量化し評価した．群間比較には Student's *t*-test を施行した．**は $P < 0.01$ を示す．

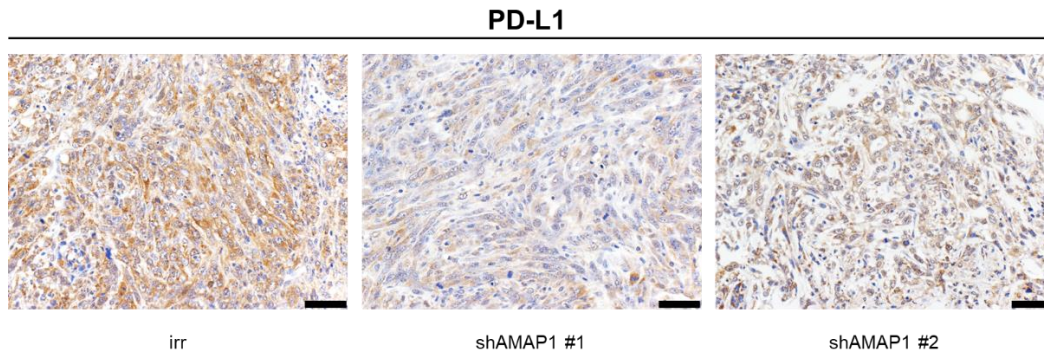


図 9-3 C57BL/6 マウス皮下腫瘍の PD-L1 染色

C57BL/6 マウス皮下腫瘍の抗 PD-L1 抗体による代表的な染色例。スケールバーは 50 μm を表す。

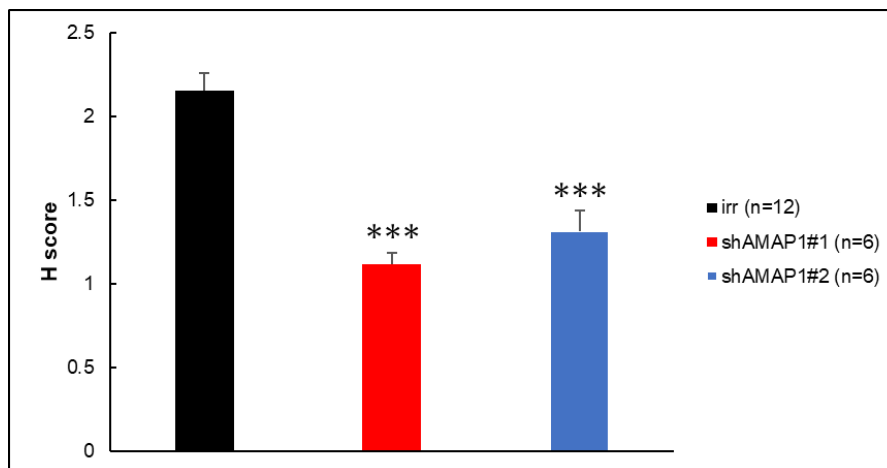


図 9-4 C57BL/6 マウス皮下腫瘍における PD-L1 発現の評価

抗 PD-L1 抗体により染色した C57BL/6 マウス皮下腫瘍を H score を用いて定量化し評価した。群間比較には Student's *t*-test を施行した。***は $P < 0.001$ を示す。

9 マウス皮下腫瘍モデルにおける抗マウス PD-1 抗体を用いた治療実験

C57BL/6 マウスを用いたマウス皮下腫瘍モデルに対して、コントロール群にはマウス IgG、治療群には抗マウス PD-1 抗体をそれぞれ 1mg/kg 腹腔内投与を行い、腫瘍の体積で評価を行った。図 10-1 で示すように、抗マウス PD-1 抗体投与群では、初回投与後より腫瘍の形成能の低下を認めた。腫瘍細胞注入後第 21 日目で比較すると、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形成能は有意に低下し、AMAP1 発現抑制細胞で

比較すると IgG 投与群と比較し抗マウス PD-1 抗体投与群では有意に腫瘍形成能は低下していた (図 10-2)。

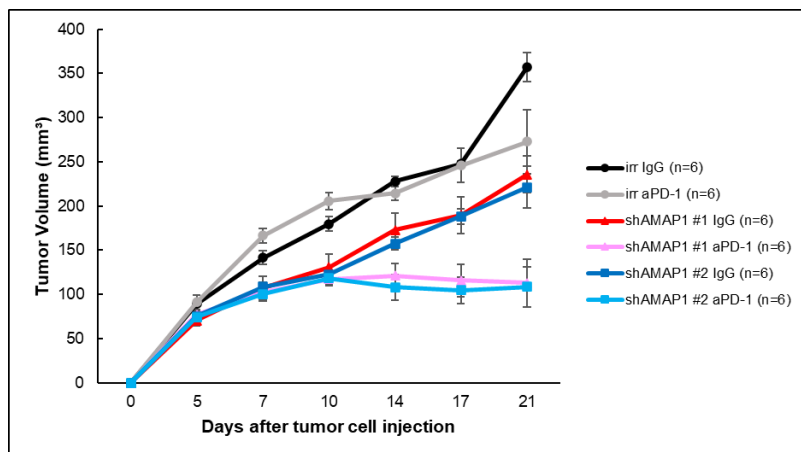


図 10-1 抗マウス PD-1 抗体を用いた治療実験における経時的腫瘍サイズ比較
KPC 細胞コントロール群 (irr) と AMAP1 発現抑制細胞 (shAMAP1) を C57BL/6 マウスの背部皮下に注入し、形成したマウス腫瘍モデルにマウス IgG 抗体と抗マウス PD-1 抗体を腹腔内投与し、経時的にサイズを測定した。

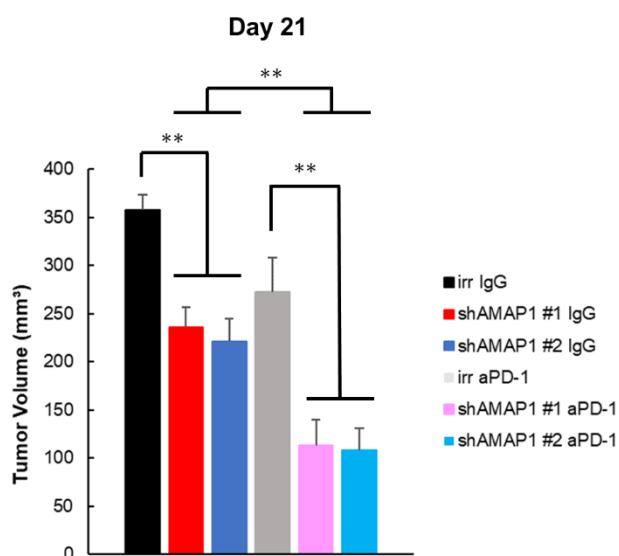


図 10-2 抗マウス PD-1 抗体を用いた治療実験における細胞注入後第 21 日目の腫瘍サイズ比較

治療実験を行ったマウスの皮下腫瘍を、KPC 細胞注入後 21 日目の体積で比較した。群間比較には Student's t-test を施行した。**は $P < 0.01$ を示す。

【考察】

本研究では、マウス皮下腫瘍モデルにおいて、AMAP1 を抑制することで線維性間質が減少し、腫瘍増殖能の低下を認めたことから、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唆された。

組織線維化と癌の浸潤及び転移の関わりは 1950 年代に初めて報告されている (Desmeules et al., 1955、Themel et al., 1955)。線維化は、上皮細胞への傷害の結果、間葉系細胞が間質に浸潤および増殖して形成され、最終的に臓器機能不全をもたらす (Wynn et al., 2007)。細胞外マトリックスである線維組織は、臓器に癒痕形成をもたらす線維性サイトカインおよび成長因子の産生を促進する。それにより、異種細胞が増殖し、腫瘍発生性微小環境の形成を促進して、癌細胞の浸潤を促進すると考えられている (Alexander et al., 2016)。

膵臓癌は、豊富な線維性間質を特徴としており、線維性間質は癌の増殖、浸潤、転移や抗癌剤に対する抵抗性獲得に重要な役割を果たしている (Erez et al., 2010)。膵臓癌のシグナル伝達経路の一つである Hedgehog 経路の阻害剤を使用すると、線維性間質の量が減少し、抗がん剤であるゲムシタビンの血管内輸送が促進されたという報告も認められる (Kayed et al., 2006、Maitra et al., 2010)。また、膵臓癌の間質には強くビタミン D 受容体が発現しており、ビタミン D 受容刺激薬を投与すると、癌の周りの炎症と間質反応が強く抑制され、その結果薬剤が癌に取り込まれ、化学療法の効果が高まることが報告されている (Sherman et al., 2014)。

しかしながら、膵臓癌の間質反応が必ずしも癌の増殖を支持するものではないという報告も散見される。Rhim らは、膵臓癌が分泌する Shh が間質反応の引き金であるという知見に基づいて、Shh を欠損させた膵臓癌モデルマウスを作成し、間質反応が Shh で誘導されるかを検討したところ、Shh 欠損モデルマウスでは間質反応が強く抑えられたが、癌の増殖は高まるという結果となった。この効果は、血管新生を抑制することで消失するため、間質反応は血管新生を抑制して癌の増殖を抑えるという結論に至っている (Rhim et al., 2014)。一方、Özdemir らは、間質の活性化線維芽細胞を薬剤で除去できるようにしたマウスモデルを用いて、膵臓癌増殖に及ぼす線維芽細胞の役割を研究し、線維芽細胞を除去すると膵臓癌の増殖が亢進することを報告している (Özdemir et al., 2014)。臨床的にも、間質反応の強い膵臓癌患者の方が予後良好であるという報告もされており (Bever et al., 2014)、膵臓癌の間質反応の意義については未だ不明な点が多い。いずれにせよ、本研究の結果を踏まえると腫瘍組織内の間質が膵臓癌の特徴に大きな役割を果たしており、血管新生や免疫回避に影響していると考えられる。

本研究では、ヒト膵臓癌切除検体を用いた検討により、AMAP1 と PD-L1 の

相関関係が認められた。さらにマウス皮下腫瘍モデルにおける免疫染色の検討でも、AMAP1 を発現抑制することで PD-L1 の発現量の低下を認め、AMAP1 と PD-L1 の関連が示唆される結果となった。

近年、免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療は急速に進歩しており、2010 年に悪性黒色腫に対して細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4;CTLA-4) 抗体の有効性が報告され (Hodi et al., 2010), 2014 年以降は、様々な癌腫に対する抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体の有効性が多数報告されている。抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体は、使用が承認されている癌腫に対して 20~30%の有効性が示されており、臨床試験段階の癌腫においても 20%程度有効であると報告されている (Foley et al., 2016)。

膵臓癌は豊富な線維性間質により、腫瘍組織内にリンパ球浸潤が起こりにくく、免疫療法の効果が発揮しにくい癌微小環境を有していることが指摘されている (Clark CE et al., 2007)。また、膵臓癌は PD-L1 の発現が低く、腫瘍特異的変異抗原 (neoantigen) の発現も少ないため、免疫チェックポイント阻害薬が効きにくい癌種とされており (Pardoll DM., 2012), 各種癌患者に抗 PD-L1 抗体を投与した臨床研究において、膵臓癌に対する効果は認められなかったという報告もある (Brahmer JR et al., 2012)。膵臓癌の免疫チェックポイント阻害剤の効果増大目的として、さまざまな分子を標的とした研究が報告されている。

FAK においては、FAK 阻害剤が間質反応を低下させ、CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の浸潤を誘導することが報告されており、低濃度のゲムシタビンと抗 PD-1 抗体の併用に、さらに FAK 阻害剤を加えることで治療効果が上昇することが示されている (Jiang et al., 2016)。IL-6 を標的とした研究では、抗 PD-1/PD-L1 抗体との併用により、腫瘍内に浸潤する T 細胞の増加と、腫瘍内における T 細胞の表現型を変化させるとされている (Mace TA et al., 2016)。また、癌関連線維芽細胞から発生する CXCL12 を標的とした研究でも、抗 PD-1/PD-L1 抗体との併用により、腫瘍における免疫回避機構を抑制できると報告されている (Feig C et al., 2013)。

先行研究において、PD-L1 は主に細胞辺縁部のアクチンに富む形質膜構造に局在すること、ARF6、もしくは AMAP1 発現抑制した細胞では、PD-L1 の局在性は失われ、形質膜での局在が減少するという結果を得た。また、ARF6-AMAP1 経路はインテグリンの細胞内部から細胞表面へリサイクリングを促進することから、同様の解析を行った結果、PD-L1 のリサイクリングに関しても同様に促進することを見出した。本研究における治療実験の結果からは、AMAP1 の発現抑制を介した線維性間質の減少及び PD-L1 の形質膜局在の低下により、抗腫瘍効果を維持した免疫細胞の腫瘍への到達が容易となり、腫瘍形成の抑制が亢進したと推察される。加えて抗 PD-1 抗体を併用することにより、顕著な腫瘍形成

能の低下が観察された。このことから、腫瘍組織周辺において疲弊状態にあった抗腫瘍性リンパ球の再活性化が抗 PD-1 抗体により誘導され、更なる腫瘍形成能の低下を惹起したと推察される。

現在、免疫チェックポイント阻害薬はがん薬物療法の大きな柱になっており、免疫チェックポイント阻害薬単独から、分子標的薬、化学療法、放射線療法などとの併用による複合的免疫治療の開発が進められている。

本研究結果からも AMAP1 と PD-L1 を繋ぐ詳細なシグナル経路は明らかではないが、ARF6-AMAP1 経路は膵臓癌の免疫回避機構に関連していると考えられる。

【結論】

①本研究から得られた新知見

- ・膵臓癌細胞のマウス皮下腫瘍モデルを用いた研究で、AMAP1 を発現抑制することで皮下腫瘍の線維性間質が減少することを認めた.
- ・ヒト膵癌切除検体を用いた免疫組織化学染色の検討において、AMAP1 発現程度と線維性間質量、AMAP1 発現程度と PD-L1 発現程度に相関を認めた.
- ・マウス皮下腫瘍モデルを用いた治療実験において、AMAP1 発現抑制に加え、抗 PD-1 抗体を併用することで腫瘍形成能が有意に低下することが示された.

②新知見の意義

これまで、膵臓癌の線維性間質に関し、間葉形質シグナルを介した悪性度や免疫細胞に関連した腫瘍微小環境との関係が明らかでない部分があった. 本研究の結果は、膵臓癌における線維化の役割や腫瘍微小環境の解析において重要な知見であると考ええる.

③本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

線維性間質の評価において、膵臓癌細胞をマウスの膵臓に注入し、作成した腫瘍モデルで評価を行っている研究も散見される. 膵臓腫瘍モデルにおいても AMAP1 を抑制することで線維性間質に変化がみられるかを検討する. また、ヒト膵癌切除検体において、TMA ではなく腫瘍全体像で評価を行うことが必要であると考ええる.

本研究においては、AMAP1 と PD-L1 の関わりを示すことはできたが、それらを繋ぐ蛋白質を同定し、分子機序の解析を行うことでより具体的な治療法につながる結果が得られると考える.

④今後の課題

今回検討した PD-L1 だけではなく、免疫抑制的環境形成に関わる多くの因子を総合的に検討していくことが重要である.

謝辞

本研究の機会を与えて頂いた，北海道大学医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ 平野聡 教授，ならびに医学研究院 生化学分野 分子生物学教室 佐邊壽孝 教授に深く感謝致します．また，本研究において直接ご指導頂いた大阪大学免疫学フロンティア研究センター 橋本茂 准教授，ならびに北海道大学医学研究院 生化学分野 分子生物学教室 橋本あり 助教に心から感謝申し上げます．最後に，本研究を支えてくださった，消化器外科学教室Ⅱ，ならびに生化学分野 分子生物学教室の全ての皆様に心より御礼を申し上げます．

利益相反

開示すべき利益相反状態はありません。

引用文献

Alexander, Z.E., Su'a, B., Hill, C.T., Lyndon, M.P., Singh, P.P., Hill, A.G. The effect of oral simvastatin on fibrinolytic activity after colorectal surgery-a pilot study. *J. Surg. Res.* *205*, 28-32.

Bever, K.M., Sugar, E.A., Bigelow, E., Sharma, R., Laheru, D., Wolfgang, C.L., Jaffee, E.M., Anders, R.A., De Jesus-Acosta, A., Zheng, L., (2014). The prognostic value of stroma in pancreatic cancer in patients receiving adjuvant therapy. *HPB.* *17*, 292-298.

Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q., Hwu, W.J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., et al. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* *366*, 2455-2465.

Clark, C.E., Hingorani, S.R., Mick, R., Combs, C., Tuveson, D.A., Vonderheide, R.H. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res.* *67*, 9518-9527.

Desmeules, R., Giroux, M., Beaulieu, M., Richard, P. (1955). Neoplastic aspect of a case of interstitial pulmonary fibrosis. *Labal Med.* *20*, 1315-1325.

Donaldson, J.G., Jackson, C.L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* *12*, 362-375.

Egawa, S., Toma, H., Ohigashi, H., Okusaka, T., Nakao, A., Hatori, T., Maguchi, H., Yanagisawa, A. and Tanaka, M. (2012). Japan Pancreatic Cancer Registry ; 30th year anniversary : Japan Pancreatic Society. *Pancreas.* *41*, 985-992.

Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner.

Cancer Cell. *17*, 135-147.

Feig, C., Jones, J.O., Kraman, M., Wells, R.J., Deonarine, A., Chan, D.S., Connell, C.M., Roberts, E.W., Zhao, Q., Caballero, O.L., et al. (2013). Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *110*, 20212- 20217

Foley, K., Kim, V., Jaffee, E., Zheng, L. (2016). Current progress in immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Lett.* *381*, 244-251.

Gillen, S., Schuster, T., Meyer Zum Buschenfelde, C., Friess, H. and Kleff, J. (2010). Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer : A systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLos Med.* *7*, e1000267.

Hashimoto, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Kojima, C., Yamamoto, H., Tsutsumi, T., Higashi, M., Mizoguchi, A., Yagi, R., Sabe, H. (2004). A novel mode of action of an ArfGAP, AMAP2/PAG3/Papa lpha, in Arf6 function. *J. Biol. Chem.* *279*, 37677-37684.

Hashimoto, S., Hirose, M., Hashimoto, A., Morishige, M., Yamada, A., Hosaka, H., Akagi, K., Ogawa, E., Oneyama, C., Agatsuma, T., et al (2006). Targeting AMAP1 and cortactin binding bearing an atypical src homology 3/proline interface for prevention of breast cancer invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *103*, 7036-7041.

Hashimoto, S., Mikami, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Hashimoto, A., Onodera, Y., Furukawa, S., Handa, H., Oikawa, T., Okada, Y., et al (2016). Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. *Nat commun.* *7*, 10656.

Hashimoto, S., Furukawa, S., Hashimoto, A., Tsutaho, A., Fukao, A., Sakamura, Y., Parajuli, G., Onodera, Y., Otsuka, Y., Handa, H., et al (2019). ARF6 and AMAP1 are major targets of KRAS and TP53 mutations to promote invasion, PD-L1 dynamics, and immune evasion of pancreatic cancer. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA. *35*, 17450-17459.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 711-723.

Jiang, H., Hedge, S., Knolhoff, B.L., Zhu, Y., Herndon, J.M., Meyer, M.A., Nywening, T.M., Hawkins, W.G., Shapiro, I.M., Weaver, D.T., et al. (2016). Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat Med.* *22*, 851-860.

Kayed, H., Kleeff, J., Osman, T., Keleg, S., Büchler, M.W., Friess, H. (2006). Hedgehog signaling in the normal and diseased pancreas. *Pancreas.* *32*, 119-129.

Laklai, H., Miroshnikova, Y.A., Pickup, M.W., Collisson, E.A., Kim, G.E., Barrett A.S., Hill, R.C., Lakins, J.N., Schlaepfer, D.D., Mouw, J.K., et al. (2016). Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nat. Med.* *22*, 497-505.

Liu, Y., Loijens, J.C., Martin, K.H., Karginov, A.V., Parsons, J.T. (2002). The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly. *Mol. Bio. Cell.* *13*, 2147-2156.

Mace, T.A., Shakya, R., Pitarresi, J.R., Swanson, B., McQuinn, C.W., Loftus, S., Nordquist, E., Cruz-Monserrate, Z., Yu, L., Young, G., et al (2016). IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut.* *67*, 320-332.

Maitra, A. (2010). Tracking down the hedgehog's lair in the pancreas. *Gastroenterology.* *138*, 823-825

Mazaki, Y., Hashimoto, S., Sabe, H. (1997). Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal

adhesion proteins. *J. Biol. Chem.* *272*, 7437-7444.

Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., Wei, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Yano, H., et al (2008). GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat. Cell. Biol.* *10*, 85-92.

Onodera, Y., Hashimoto, S., Hashimoto A., Morishige, M., Mazaki, Y., Yamada, A., Ogawa, E., Adachi, M., Sakurai, T., Manabe, T., et al (2005). Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *EMBO J.* *24*, 963-973.

Otsuka, Y., Sato, H., Oikawa, T., Onodera, Y., Nam, J.M., Hashimoto, A., Fukunaga, K., Hatanaka, K.C., Hatanaka, Y., Matsuno, Y., et al (2016). High expression of EPB41L5, an integral component of the Arf6-driven mesenchymal program, correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma of the tongue. *Cell commun signal.* *14*, 28

Özdemir, B.C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J.L., Zheng, X., Wu, C.C., Simpson, T.R., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C., Novitskiy, S.V., et al. (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell.* *25*, 719-734.

Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* *12*, 252-264.

Rhim, A.D., Oberstein, P.E., Thomas, D.H., Mirek, E.T., Palermo, C.F., Sastra, S.A., Dekleva, E.N., Saunders, T., Becerra, C.P., Tattersall, I.W., et al. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* *25*, 735-747.

Sherman, M.H., Yu, R.T., Engle, D.D., Ding, N., Atkins, A.R., Tiriach, H., Collisson, E.A., Connor, F., Van, Dyke, T., Kozlov, S., et al. (2014). Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell.* *159*, 80-93.

Themel, K.G., Luders, C.J. (1955). The role of tuberculous scars in the pathogenesis of peripheral lung carcinoma; a contribution to the symptomatology of cancer of the pulmonary scars. *Dtsch. Med. Wochenschr.* *80*, 1360-1363.

Wittinghofer, A. (2014). Ras superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms. Springer, Wien.

Wynn, T.A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. invest.* *117*, 524-529.

国立がん研究センターがん情報サービス. がん登録・統計 (2020).
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html