

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 武内 慎太郎

学位論文題名

Studies on the differentiation of myeloid cells under the chemotherapy-treated human pancreatic cancer microenvironment

(ヒト膵癌化学療法下の微小環境におけるミエロイド細胞の分化に関する研究)

【背景と目的】

膵癌は早期診断が困難であり、進断時に手術可能症例は約 2 割にすぎない。たとえ根治的切除がなされたとしても術後、高率に再発を来すため、現在は術後の化学療法がスタンダードとなり、さらに術前治療の臨床試験が盛んに行われている。このように膵癌治療において化学療法は治療成績改善の鍵であり、近年、いくつか有効なレジメンが報告されてきている。しかし、いまだに多くの症例では化学療法抵抗性であり、その治療反応を改善させるための新たな知見が待たれる。

近年、腫瘍微小環境に関する研究が多く報告されており、その構成要素である線維芽細胞や免疫細胞、血管内皮細胞などは VEGF や EGF など多くのサイトカインや成長因子を癌細胞に供給し、その増殖を促進したり、TGF- β などを介して上皮間葉転換を進め、その浸潤や転移と関連すると言われる。とりわけ膵癌は、活性型の KRAS 遺伝子により種々のサイトカインやケモカインの発現を介して炎症環境を形成する作用が強い癌種であり、その増殖や浸潤、転移はこのような腫瘍微小環境に大きく依存していると報告されている。膵癌由来の分泌因子によって特に強く影響を受けるのがマクロファージ、単球、顆粒球などのミエロイド細胞であり、膵癌の進行や転移を促進する。

ミエロイド細胞の中で、特に、近年注目されているものとして Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)がある。MDSC は骨髄由来の未分化な細胞であり、健常な状態ではほとんど末梢血液内に存在しないが、担癌状態において抗腫瘍免疫を抑制し、あるいは血管造生を促進するなど腫瘍進行を促進する細胞群であり、腫瘍周囲の単球や顆粒球の多くは MDSC の形質を有すると言われる。膵癌における最近の研究では、遺伝子改変マウスを用いた実験によって、膵癌の発生と進行には KRAS 遺伝子由来の GM-CSF の発現を介した MDSC の誘導が必須であることがわかり、膵癌微小環境における MDSC の重要性が提唱された。しかし、実際にヒト膵癌においてこのような機構が働いているか、さらに抗癌剤投与によりどのような変化が生じるかは明らかとなっていない。

これらの背景を元に、本研究ではヒト膵癌微小環境のうち特にミエロイド細胞に着目し、抗癌剤投与により膵癌微小環境においてミエロイド細胞がどのような分化形態を示すのかを明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

本研究で使用したヒト検体は、医師主導自主臨床研究のプロトコールに従い同意を得た健常人または患者より採取したものである。ヒト膵癌由来の因子がミエロイド細胞の分化へ与える影響を解析するため、ヒト膵癌細胞株の培養上清を用いた *in vitro* の実験系を構築

した。ミエロイド細胞としては、健常人より容易に分離・採取が可能な CD14 陽性単球を用いた。ヒト膵癌細胞株(Capan-1)の培養上清を通常、ならびに Gemcitabine (GEM)を投与した条件にて採取し、健常人より採取分離したヒト単球に作用させた。培養 6 日目の単球の遺伝子・蛋白発現を RT-PCR、フローサイトメトリーにて解析した。また、ヒト膵癌細胞株 (Capan-1, Panc-1) に GEM や 5-fluorouracil (5-FU) を投与した際のサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現の変化や、細胞内シグナルや転写因子の変化を RT-PCR、ELISA または Western blotting、レポーターアッセイにて解析した。さらに、培養した単球と CD4 陽性 T 細胞または CD8 陽性 T 細胞との共培養を行い、³H チミジンアッセイにてその増殖抑制能を解析した。これらの遺伝子・蛋白発現や T 細胞の増殖抑制能を、膵癌細胞の培養上清で GM-CSF を特異的抗体で中和した条件でも行った。さらに、複数のヒト膵癌細胞株(PANC-1, Capan-1, Capan-2, MIAPaCa-2, PK-1, BxPC-3, PCI-43, PCI43-P5)の GM-CSF 発現スクリーニングを RT-PCR にて行い、手術症例の病理組織検体(N=68)の免疫組織化学染色を用いて膵癌組織の GM-CSF 染色強度のスコアリングを行い、その予後との相関を統計学的に解析した。また、術前に化学療法を受けた膵癌の手術検体(N=9)と、同時期に化学療法を受けていない膵癌の手術検体(N=6)の間質における MDSC 関連マーカー(CD14, HLA-DR, CD66b)の免疫組織化学染色を行い、発現細胞数の数や割合を統計学的に比較した。

【結果】

in vitro の系で、Capan-1 の培養上清により分化したヒト単球は、HLA-DR の発現低下や NOS2 の発現上昇など、MDSC に特徴的な遺伝子・蛋白発現を有し、T 細胞の増殖を抑制した。さらに GEM 投与後に採取した Capan-1 の培養上清により分化した単球では、これらの遺伝子・蛋白発現や T 細胞抑制能は非投与時より顕著となった。Capan-1 や PANC-1 に GEM や 5-FU を投与すると、複数の炎症性サイトカインやケモカインの発現上昇が確認され、このうち GM-CSF の発現が高度であった。また、同条件においては膵癌細胞の MAPK シグナルや NFκ-B の発現が増強していた。Capan-1 の培養上清から特異的抗体を用いて GM-CSF を中和すると、培養上清により分化する単球の T 細胞の増殖抑制能が解除された。GM-CSF は複数のヒト膵癌細胞株において発現が確認され、ヒト膵癌組織における GM-CSF の発現は、膵癌患者の予後不良と相関していた。術前に化学療法を行ったヒト膵癌組織において、CD14 陽性細胞中の HLA-DR 陽性を示す細胞の数と割合は、化学療法未施行群と比較して有意に少なく、CD66b 陽性細胞は化学療法未施行群と比べて有意に多かった。

【考察】

in vitro、ヒトの組織検体を用いた実験結果より、膵癌は GM-CSF の発現を介してその微小環境に MDSC を誘導する可能性が示された。さらに化学療法により GM-CSF の発現はより高度となり、MDSC の形成やその免疫抑制能が促進される可能性が示された。MDSC は化学療法抵抗性や腫瘍免疫の抑制に関連する細胞群であり、このような GM-CSF を介した MDSC の形成は、膵癌の進行や化学療法抵抗性獲得に関連していることが考えられる。また、GM-CSF をはじめ MDSC の産生を引き起こす因子を同定し治療の標的とすることは、新規治療法としての可能性はもちろん、化学療法時の併用治療の手段となり得ると考えられた。

【結論】

本研究により、ヒト膵癌微小環境においては抗癌剤投与により膵癌細胞から GM-CSF の産生が増え、微小環境における MDSC の形成が促進される可能性があることが判明した。