

VCAM-1 を介した膵臓癌進展機序の解明

東京大学保健・健康推進本部

(現所属：東京大学医学部附属病院消化器内科)

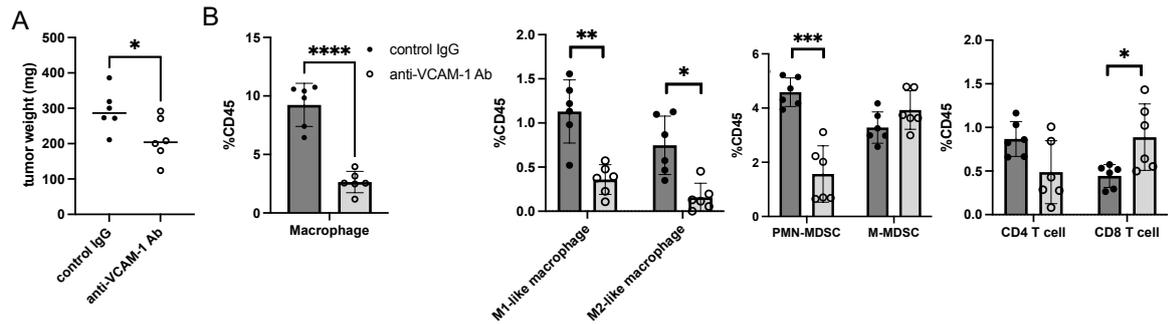
高橋 良太

【目的】膵臓癌は豊富な間質と免疫細胞の浸潤を持つ難治癌であり、腫瘍進展における微小環境の役割が重要であると考えられている。細胞接着因子vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)は炎症によって血管内皮に発現が誘導される細胞接着因子であるが、近年癌細胞における発現が報告されている。我々はVCAM-1がヒト及びマウス膵臓癌で高発現していることを見出した。VCAM-1中和抗体を膵臓癌モデルマウスに投与したところ全生存期間が延長し、腫瘍サイズも抑制されたことから、VCAM-1が膵臓癌の進展にも寄与していることが示唆された。本研究では膵臓癌におけるVCAM-1と炎症や腫瘍免疫との関わりについての解析をさらに進め、VCAM-1が免疫細胞浸潤に与える影響の詳細な解析やインテグリンとの結合の必要性について検討する。また免疫細胞との相互作用だけではなく、膵臓癌細胞におけるVCAM-1役割についても解析する。これらの解析によりVCAM-1が膵臓癌の進展を促進する機序を解明し、治療標的として確立することを目指す。

【方法】本研究では膵癌微小環境の解析モデルとして、広く用いられる、*LSL-Kras^{G12D/+}*; *LSL-Trp53^{R172H/+}*; *Pdx1-Cre*マウスを用いた。このマウス膵臓癌より細胞株を樹立し、野生型マウスの膵に移植することで同所移植モデルを作成し、VCAM-1中和抗体、インテグリン $\alpha 4\beta 1$ 中和抗体による治療実験に用いた。膵臓癌細胞に発現するVCAM-1の膵臓癌進展における役割をより詳細に解析するため、VCAM-1を膵上皮特異的にノックアウトする遺伝子改変マウス(*Vcam1^{fllox/fllox}*マウス)を上記膵臓癌マウスモデルと交配した。

【結果】まず膵臓癌における抗VCAM-1抗体治療の有効性を確認するため、広く用いられている膵臓癌モデルマウス(KPCマウス)から樹立した膵臓癌細胞株を用いて野生型マウスに対して同所移植を行い、移植7日後よりVCAM-1中和抗体を14日間投与した。回収した腫瘍の重量を測定したところ、VCAM-1中和抗体を投与したマウスにおいて腫瘍の重量増加が抑制されていた (Figure 1A)。フローサイトメトリーを用いて免疫細胞浸潤について評価したところ、VCAM-1中和抗体を投与したマウス腫瘍においては対照と比較してCD11b⁺F4/80⁺マクロファージ、CD11b⁺Ly6G^{hi}Ly6C⁻ polymorpho-nuclear-MDSC (PMN-MDSC)の浸潤減少、CD8⁺T細胞の増加が認められた (Figure 1B)。マクロファージのサブタイプではM1様マクロファージ、M2様マクロファージ共に減少が認められた。これらの結果から、膵臓癌においてVCAM-1は抗腫瘍免疫に関与している可能性が示唆された。

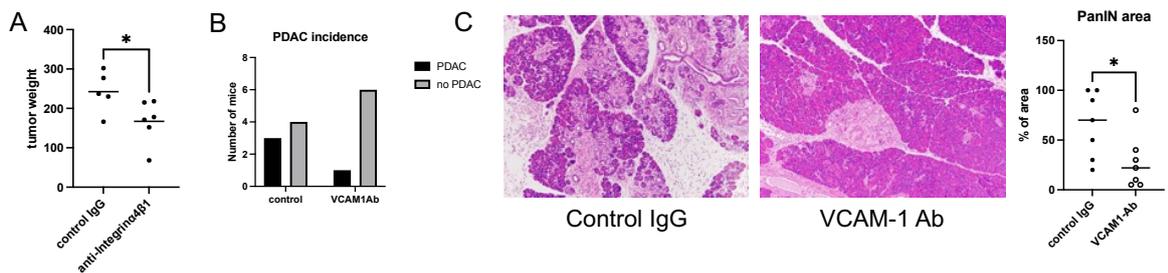
Figure 1



血管内皮細胞において、VCAM-1はインテグリン $\alpha 4\beta 1$ を介して免疫細胞と結合することが知られている。そこで膵臓癌においてもVCAM-1-インテグリン結合が腫瘍進展に役割を持つ可能性についても検討することとした。膵臓癌細胞の同所移植モデルを用いて抗インテグリン $\alpha 4\beta 1$ 中和抗体を投与し、その治療効果についても検討した。膵臓癌細胞株移植7日後より抗インテグリン $\alpha 4\beta 1$ 中和抗体を14日間投与して腫瘍を回収し重量を比較したところ、抗インテグリン $\alpha 4\beta 1$ 中和抗体投与群において腫瘍重量の増加抑制が認められた (Figure 2A)。腫瘍における免疫細胞浸潤についても検討したところ、M2様マクロファージの減少やCD8⁺T細胞の増加などVCAM-1中和抗体投与時と類似した変化が認められた。これらの結果からVCAM-1中和抗体による膵臓癌に対する治療効果の一部はインテグリンとの結合を介したものである可能性が示唆された。

次にVCAM-1が膵臓癌の発癌過程に与える影響について検討した。KPCマウスに対して、発癌以前の10週齢よりVCAM-1中和抗体を投与開始し、20週齢で膵組織を回収して発癌有無について組織学的に検討した。対照群で発癌が認められたのは7匹中3匹であったのに対してVCAM-1中和抗体投与群では7匹中1匹であった (Figure 2B)。また前癌病変であるPanINの発生についても評価したところ、膵全体におけるPanINの占める割合において、VCAM-1中和抗体投与群において有意な抑制が認められた (Figure 2C)。これらの結果からVCAM-1中和抗体による膵発癌抑制効果が示唆された。

Figure 2

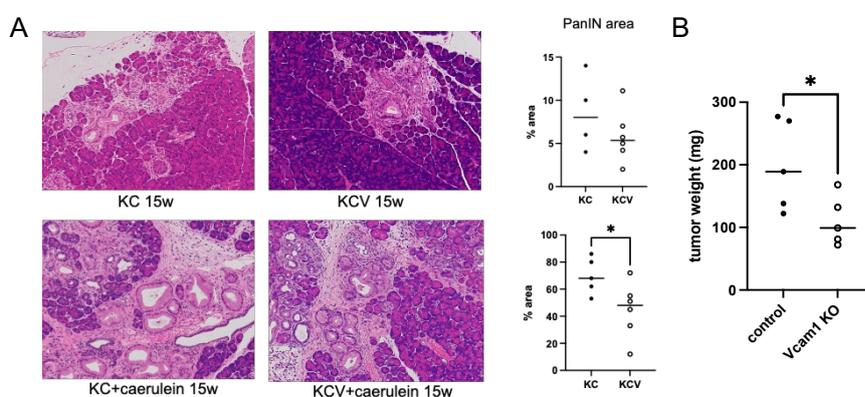


次に遺伝子改変マウスを用いてVCAM-1の膵癌発生・進展における役割を検討することとした。LSL-*Kras*^{G12D/+}; *Pdx1-cre*; *Vcam1*^{fllox/fllox}マウス(KCVマウス)を作成し膵上皮特異的に変異型*Kras*を発現すると共にVCAM-1をノックアウトし、膵腫瘍についてKCマウスと比較した。15週齢においては両者ともに癌の発生は見られず、PanINの発生についてはKCVマウスにおいて抑制される傾向が認められた (Figure 3A上段)。膵癌の発生を促進するためにセルレインを7週齢で投与し15週齢で解析したところ、KCVマウスにおけるPanINの発生は有意に抑制されていた (Figure 3A下段)。

またCRISPR-Cas9を用いて膵臓癌細胞株においてVCAM-1のノックアウトを行い、野生型マウスを用いて

同所移植を行った。移植3週間後に腫瘍を回収し重量を計測したところ、VCAM-1ノックアウト腫瘍は対照と比較して腫瘍重量の増加が抑制されていた (Figure 3C)。腫瘍内の免疫細胞浸潤についてフローサイトメトリーを用いて解析したところM2様マクロファージやPMN-MDSCの減少、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞の増加が認められ、やはり抗腫瘍免疫の改善が示唆された。この腫瘍から単離したEpCAM⁺腫瘍細胞、CD45⁺免疫細胞についてRNAシーケンスによる遺伝子発現解析を行ったところ、VCAM-1をノックアウトした腫瘍細胞において細胞増殖や血管新生に関わる遺伝子セットの発現低下が認められた。また免疫細胞においてはVCAM-1ノックアウト腫瘍から単離したものにおいて炎症に関連した様々な遺伝子セットの発現低下が認められた。さらにマクロファージやMDSCを単離して遺伝子発現解析を行い、VCAM-1ノックアウト腫瘍においてこれらの免疫細胞が発現する抗腫瘍免疫抑制に関わるサイトカインが低下していることを見出した。

Figure 3



【考察】本研究では、同所移植モデルや遺伝子改変マウスモデルを用いて膵臓癌の発生・進展におけるVCAM-1の役割を検討し、VCAM-1が膵臓癌の治療標的となりうるだけでなく癌の発生・進展過程にも寄与することが示唆された。VCAM-1が膵臓癌細胞の細胞増殖を抑制することも示唆されているが、マクロファージ、MDSC、T細胞を介した抗腫瘍免疫への影響が認められており、特にインテグリン $\alpha 4\beta 1$ を介した免疫細胞との結合による抗腫瘍免疫抑制機序がVCAM-1による抗腫瘍免疫抑制機序において重要であると考えられた。これらの免疫細胞におけるサイトカイン産生の変化も示唆されているが、詳細については今後の検討課題である。

KCVマウスの解析でもVCAM-1の膵上皮特異的なノックアウトが膵腫瘍進展を抑制する結果が得られており、VCAM-1を介した抗腫瘍免疫の抑制が癌の発生過程においても重要である可能性が示唆されている。一方KPCマウスと*Vcam1*^{fl^{ox}/fl^{ox}}マウスを交配したKPCVマウスの表現型は解析中であり、膵の自然発癌モデルにおけるVCAM-1ノックアウトの効果については今後検討を進める。