

Keap1-Nrf2 経路は炎症性膵発癌に寄与するか？

東北大学大学院 医学系研究科 消化器病態学分野

鍋 島 立 秀

I 要 旨

膵癌間質は癌進展促進作用を有するが、そのメカニズムは完全には明らかになっていない。間質細胞の中でも線維化形成に重要な役割を果たす膵星細胞について、酸化ストレス応答機構が癌進展促進作用に寄与しているかを検証した。酸化ストレス応答の中核制御分子、Nrf2 欠損は膵星細胞の増殖・生存に寄与していた。膵星細胞の培養上清は癌細胞を酸化ストレスから保護する作用を有し、その効果は Nrf2 に依存していた。癌細胞・膵星細胞混合移植実験では Nrf2 が腫瘍形成促進に重要であることが示された。酸化ストレス応答は癌細胞のみならず、間質においても癌進展に重要である。

II 目 的

膵癌における特徴的な組織像は、時として腫瘍細胞よりも豊富に存在する線維化である。膵癌の線維化は免疫細胞や抗癌剤に対する物理的な障壁として機能するのみならず、癌細胞との相互作用によって癌促進的な微小環境を構築している。特に線維化形成の過程で中心的な役割を果たす膵星細胞は種々の増殖因子・サイトカインによって膵癌細胞の機能を変化させ、癌進展に伴って自身も活性化される。この過程は「治癒しない創傷」とも称されるが、単純な膵星細胞の除去はむしろ癌進展を促進させることが知られており、真に標的とすべき膵星細胞の機能は未解明である。

我々は酸化ストレス応答機構の中核を担う分子、Nrf2 の欠損を膵癌モデルマウスに付加することで膵癌伸展における酸化ストレス応答機構の寄与を明らかにした¹⁾。Nrf2 欠損膵癌モデルマウスにみられる特徴の一つは、前癌病変周囲への炎症細胞浸潤の減少である。この結果は酸化ストレス応答機構が膵星細胞を含めた間質細胞と膵癌細胞の相互作用維持に必要であることを示唆するものである。しかしながらこのモデルでは膵癌細胞・膵星細胞の両方で Nrf2 が欠損しているため、膵星細胞における Nrf2 経路活性化の意義は明らかになっていない。本研究計画の目的は、膵星細胞での Nrf2 活性化が膵癌進展にもたらす影響を明らかにすることである。

III 方 法

1 Nrf2 欠損が慢性膵炎に与える影響の確認

全身性に Nrf2 を欠損する Nrf2 ノックアウトマウスと、野生型マウスにおいて 1 時間ごとに 50mg/kg のセルレイン腹腔内投与を 7 回/day、週 3 回を 4 週間にわたり実施する慢性膵炎モデルを作成し、組織学的変化を評価した。

2 Nrf2 欠損初代培養膵星細胞の細胞機能検証

先行研究にて野生型マウス及び Nrf2 欠損マウス由来不死化膵星細胞は樹立済みであったが、SV40 導入による不死化処理の影響を排除した比較のため初代培養細胞を樹立した。各初代培養細胞における Nrf2 発現をリアルタイム PCR、ウエスタンブロットで確

認し、同質量の膵組織から培養可能な膵星細胞数を評価した。

3 Nrf2 欠損による膵癌細胞・膵星細胞間相互作用の変化の確認

野生型および Nrf2 欠損不死化膵星細胞株の培養上清を分離し、KPC マウス由来膵癌細胞に与える影響を検証した。それぞれの細胞を sub-confluent の状態まで培養し、1% FBS 添加 DMEM で 24 時間培養後に上清を採取。フィルター滅菌後に刺激実験に使用した。KPC マウス由来膵癌細胞株を 5000/well の密度で 96well plate に播種し、コントロール培地 (1% FBS 添加 DMEM) または膵星細胞培養上清に所定の濃度の H_2O_2 を加えて 24 時間処理後、MTT アッセイにて細胞生存率を評価した。6cm ディッシュに播種した KPC マウス由来膵癌細胞株にも同様の処理を行い、Nrf2 標的遺伝子産物の発現変化を確認した。

4 膵星細胞による腫瘍形成促進作用に Nrf2 が与える影響の解明

膵星細胞による膵癌進展促進作用に Nrf2 が寄与しているか確認するため、混合移植実験を行った。ヌードマウス背部皮下に KPC マウス

由来膵癌細胞株 1×10^6 個 /injection、KPC マウス由来膵癌細胞株 1×10^6 個 + 野生型膵星細胞株 1×10^6 個 /injection、KPC マウス由来膵癌細胞株 1×10^6 個 + Nrf2 欠損膵星細胞株 1×10^6 個 /injection にて皮下腫瘍を作成し、1 週間ごとに腫瘍体積を算出 ($V (\text{mm}^3) = 0.5 \times (\text{短径})^2 \times \text{長径}$) した。摘出皮下腫瘍について α SMA 陽性細胞の多寡を免疫染色で評価した。

IV 結果

1 Nrf2 欠損はセルレインによる慢性膵炎の悪化を来さない

野生型および Nrf2 欠損マウスへセルレイン反復投与を行い、膵組織の変化を比較したところ、(図 1) に示すように線維化形成や腺房細胞の脱落・実質の委縮はほぼ同程度であった。Nrf2 欠損は急性膵炎と同様、慢性膵炎の悪化にも寄与しないとの結果であった。

2 Nrf2 欠損は初代培養膵星細胞の増殖を抑制する

野生型マウス及び Nrf2 欠損マウス膵より膵星細胞を分離し、初代培養を行った。Nrf2 欠損マウス由来膵星細胞での Nrf2 消失が確

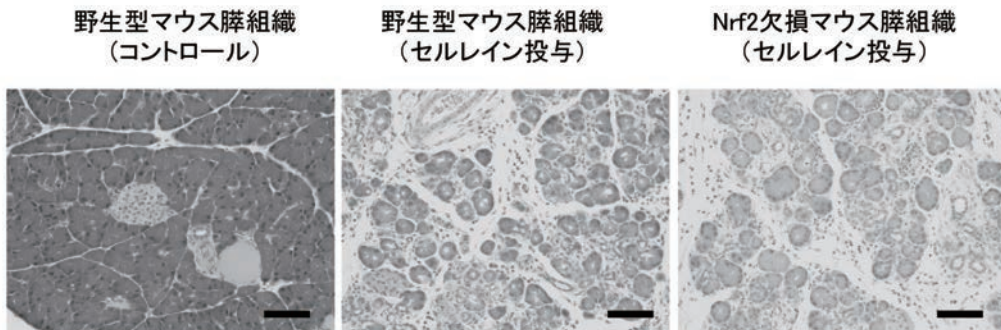


図 1
セルレイン週 3 回投与、4 週間経過後の野生型および Nrf2 欠損マウス膵組織
Black bar: 100 μ m

認められ、同質量の膵組織から得られる膵星細胞の細胞数は Nrf2 欠損マウスで少ないとの結果であった。Nrf2 欠損により膵星細胞の増殖が低下することを確認した (図 2)。

3 Nrf2 欠損は膵星細胞の癌細胞保護効果を減弱させる

1% FBS 添加 DMEM で培養した KPC マウス由来膵癌細胞は H_2O_2 投与により細胞生存率が低下したが、野生型不死化膵星細胞株の培養上清中で H_2O_2 を投与した場合には細胞生存率が増加した。この作用は Nrf2 欠損膵星細胞の培養上清では失われており、野生型膵星細胞は酸化ストレスから癌細胞を保護しているとの結果であった (データ提示せず)。また、1% FBS 添加 DMEM 中での H_2O_2 投与は癌細胞における Nqo1 発現を

誘導した。野生型膵星細胞培養上清中での H_2O_2 投与ではこの誘導作用は消失しており、培養上清が H_2O_2 の消去に寄与していると考えられた (図 3)。Nrf2 欠損膵星細胞の培養上清ではこの作用は認められなかった。

4 Nrf2 は膵星細胞の腫瘍形成促進作用に寄与する

ヌードマウス皮下移植モデルの解析を行った結果、KPC マウス由来膵癌細胞の単独移植に比べ野生型膵星細胞株との混合移植では移植 3 週間後の時点で有意に皮下腫瘍のサイズ増大がみられた。これに対し 損膵星細胞株との混合移植腫瘍では単独移植腫瘍に比べサイズ増大がなく、膵星細胞の腫瘍形成促進作用が失われていた (データ提示せず)。

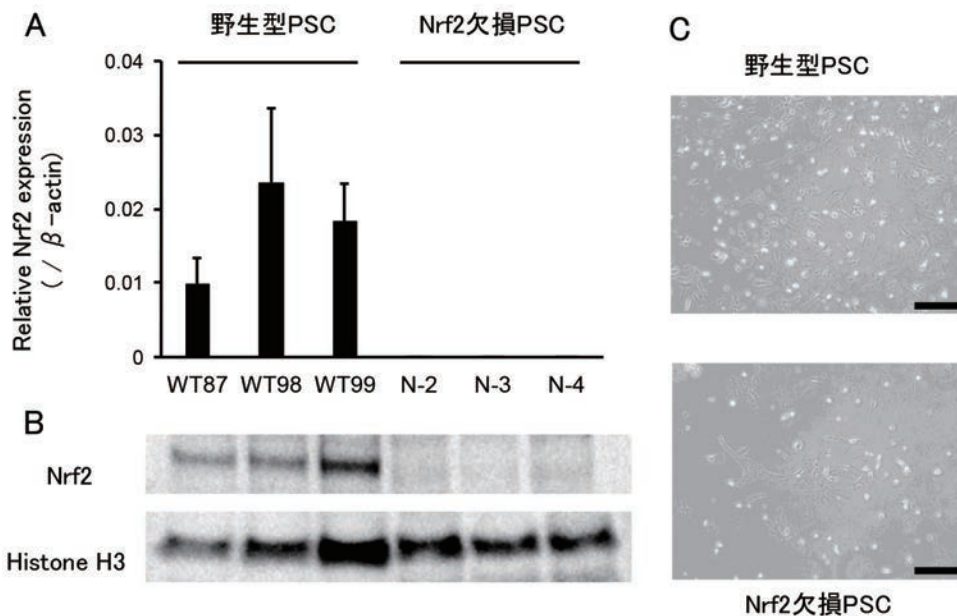


図 2

- A: 野生型初代培養 PSC および Nrf2 欠損 PSC での Nrf2 発現量のリアルタイム PCR による比較 (N=4)
- B: 野生型初代培養 PSC および Nrf2 欠損 PSC での Nrf2 発現量のウエスタンブロットによる比較
- C: 同質量の膵組織から得られた野生型初代培養 PSC および Nrf2 欠損 PSC の顕微鏡像 (Black bar; 100 μ m)

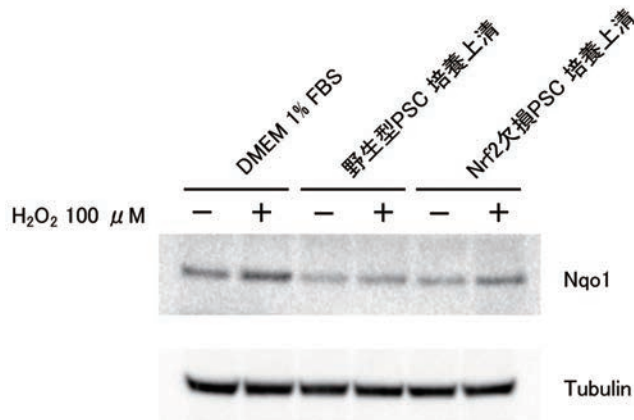


図 3

コントロール及び野生型 PSC、Nrf2 欠損 PSC 培養上清中での H₂O₂ 処理後の KPC マウス由来膵癌細胞株における Nqo1 発現誘導のウエスタンブロットによる比較(H₂O₂ 処理 12 時間後)

皮下移植腫瘍の組織を解析した結果、野生型膵星細胞との混合移植腫瘍では線維性間質がみられた。この間質細胞は α SMA 陽性を示していた。Nrf2 欠損膵星細胞との混合移植腫瘍では間質細胞は α SMA 陽性を示す間質細胞は少ないとの結果であった (データ提示せず)。

膵星細胞と癌細胞の混合移植実験では、既報²⁾の通り癌進展促進作用が確認された。Nrf2 欠損膵星細胞ではこの作用も消失しており、癌進展を促進する微小環境において、膵星細胞をはじめとした間質細胞における酸化ストレス応答機構は重要な役割を果たすと考えられる。

V 考 査

今回の検討により、膵星細胞での Nrf2 欠損は細胞増殖や生存を抑制することが確認された。先行研究では急性膵炎モデルで Nrf2 欠損による炎症の増悪は認めていなかったが、慢性膵炎モデルでも同様の結果であった。炎症の過程で膵星細胞が酸化ストレスによって細胞死に至った可能性などが考えられる。

野生型膵星細胞の培養上清は H₂O₂ 投与による膵癌細胞の生存率低下を抑制する効果を有していた。野生型膵星細胞培養上清中での H₂O₂ 投与は膵癌細胞での酸化ストレス応答活性化を抑制しており、培養上清中の物質が直接 H₂O₂ を消去した可能性が考えられた。Nrf2 欠損膵星細胞ではこのような効果が消失しており、Nrf2 の標的遺伝子が産生にかかわる分子の寄与が推測される。

VI 結 語

膵星細胞における酸化ストレス応答機構は癌進展に寄与する。一方、その詳細なメカニズムや癌促進作用のメディエーターは同定されておらず、今後の検討が必要である。

参考文献

- 1) Hamada S, Taguchi K, Masamune A, Yamamoto M, Shimosegawa T. Nrf2 promotes mutant K-ras/p53-driven pancreatic carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2017;38:661-670.
- 2) Yoshida N, Masamune A, Hamada S, Kikuta K, Takikawa T, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T. Kindlin-2 in pancreatic stellate cells promotes the progression of pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2017;390:103-114.