

学位論文

膵がん悪液質に関連する因子に関する検討

2022年3月

鈴木 秀隆

## 要旨

我が国における膵がんの年間死亡者数は2019年で約3万6千人であり、がん種別の死亡数では第4位である。膵がん患者全体の5年生存率は9.9%であり、年間あたりの罹患数は死亡数にほぼ同数であるため、致死率の高い腫瘍性疾患として知られている。悪液質は膵がんの主な死因の一つとされ、膵がん初診時より高頻度に認められる難治性の代謝障害症候群である。本研究における主目的は、悪液質の原因となる腫瘍因子に着目し、その分子機序解明や腫瘍因子をターゲットとした臨床試験構築のための基盤情報を収集することである。本論文は「序論(第1章)、Interleukine-6/gp130経路による膵がん神経浸潤の促進(第2章)、血清Growth differentiation factor 15濃度高値の進行膵がん患者の臨床的特徴と腫瘍の特徴(第3章)、総括(第4章)」で構成されている。

## 第1章 序論

がん悪液質は、体重減少・骨格筋減少を主徴とする複合的な代謝異常であり、膵がん患者の75%に認められる予後不良因子である。コンセンサスに基づいた悪液質診断基準が2011年に設けられ、悪液質の治療開発が活発となっている。悪液質の原因となる悪液質腫瘍因子には、腫瘍浸潤促進因子と悪液質促進因子がある。著者は、がん悪液質に関わる腫瘍因子の分子機序の解明、及び臨床試験構築のための基盤的情報収集を目的としたトラン

スレーショナル研究として本研究を計画した。

膵がん悪液質は、初診時より高頻度に認められ、病期分類に関わらず悪液質頻度が一定であることから、原発巣での腫瘍因子が原因として有望であると考えられる。膵がんのほぼ全例に起こる腫瘍細胞の浸潤様式である神経浸潤は、骨格筋萎縮や体重減少、全身性炎症反応といった悪液質症状を引き起こすことが明らかとなっている。腫瘍が浸潤する神経には神経修復などに関与する神経栄養因子が豊富に存在し、神経栄養因子の中に全身性炎症を惹起する炎症性サイトカインである interleukine-6 (IL-6) がある。そのため、第 2 章において、膵がん悪液質との関連が深い神経浸潤を促進する腫瘍浸潤促進因子が IL-6 であるとの仮説を構築し、膵がん神経浸潤の分子機序について検討を行った。

現在、悪液質促進因子に対する阻害療法の臨床開発が進行している。悪液質促進因子の一つが growth differentiation factor 15 (GDF-15) である。GDF-15 は様々な疾患に関連するストレス応答性サイトカインとして知られ、脳幹の受容体を介して食欲を制御する分子である。血清 GDF-15 濃度高値と食欲不振の関連性や悪液質非臨床モデルに対する GDF-15 阻害療法による悪液質改善効果がすでに報告されており、臨床試験が進んでいるものの、進行膵がん患者に対する臨床試験はまだ実施されていない。そこで、第 3 章では、進行膵がん患者を対象とした GDF-15 阻害療法の臨床試験構築を見据えて、GDF-15 血清中濃度高値の進行膵がん患者の臨床的特徴や腫瘍の特徴について神経浸潤を含めて検討し、臨床試験構築の基盤となる情報の収集を計画した。

## 第2章 Interleukine-6/gp130 経路による膵がん神経浸潤の促進

IL-6 シグナル経路は、膵がん原発巣のみならず神経浸潤部でも活性化しているとされる。神経浸潤は、膵がん患者のほぼ全例で認められる腫瘍浸潤様式であり、高度となると切除不能に陥り、疼痛・悪液質の原因となる予後不良因子である。神経浸潤の治療開発研究は臨床意義が高く、国立がん研究センターで確立された神経浸潤の臨床病理学的特徴を再現する膵がん神経浸潤モデルマウス (N-inv モデル) を用いることで確実性の高い成果が期待できる。本章の研究の目的は、その N-inv モデルを用いて、IL-6 シグナル経路の活性と神経浸潤との関連性を検討することである。N-inv モデルはヒト膵がん細胞株を免疫不全マウスの坐骨神経に直接注入して作製し、比較対照には同様の細胞株を皮下移植したモデル (subcutaneous tumor model: SC モデル) を用いて、血清 IL-6 濃度と腫瘍組織での IL-6 遺伝子発現量を比較した。ヒト IL-6/IL-6 受容体 (R) の遺伝子発現を RNA 干渉により抑制した細胞株を用いた N-inv モデル、及び抗ヒト IL-6R 抗体であるトシリズマブや janus kinase (JAK) 2 阻害剤である AG490 を腹腔内投与した N-inv モデルを用い、RNA 非抑制細胞株を用いた N-inv モデル、及び対照薬を投与した N-inv モデルを比較対照として、神経浸潤の抑制効果を検討した。N-inv モデルにおける血清 IL-6 濃度は、SC モデルと比較して有意に高かった。N-inv モデルの腫瘍組織における IL-6 の mRNA 発現量は、SC モデルと比較して有意に高かった。AG490 投与群では、対照薬群と比較して腫瘍重量が抑制される傾向があった。ヒト IL-6/IL-6R の遺伝子発現を抑制した細胞株を用いた N-inv モデルでは、RNA 非抑制細胞

株を用いた N-inv モデルと比較して、浸潤距離が短縮した。トシリズマブ投与群でも、対照薬群と比較して浸潤距離が短縮する傾向が認められた。以上、N-inv モデルマウスを用いた検討により、膵がん神経浸潤部の IL-6 シグナル活性は高く、IL-6 シグナルの阻害により神経浸潤が抑制されることが明らかとなった。本研究によって、膵がんに対する IL-6 阻害療法は抗腫瘍効果が期待できることが示唆された。

### 第 3 章 血清 Growth differentiation factor 15 濃度高値の進行膵がん患者の臨床的特徴と腫瘍の特徴

GDF-15 は、がん、心疾患、糖尿病など様々な疾患に関連するストレス反応性サイトカインとして知られており、摂食、エネルギー消費、体重を調節する役割がある。循環血中の GDF-15 は、骨格筋萎縮、全身性炎症反応、全身状態悪化、食欲不振、予後不良を含む悪液質症状に関連すると考えられている。しかしながら、進行膵がんにおいて血清 GDF-15 濃度高値の患者の臨床的特徴や腫瘍の分子生物学的特徴は明らかにされておらず、本研究において明らかにすることで、腫瘍微小環境におけるストレス応答によって引き起こされる臨床症状の原因の究明に有益な情報が得られると考える。本章の研究の目的は、血清 GDF-15 濃度と臨床データ及び腫瘍における生物活性との関連性を検討することである。未治療の肝転移を有する進行膵がん患者及び良性膵疾患患者を対象とした。血清 GDF-15 濃度は酵素結合免疫吸着検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) kit を用いて測定

し、臨床データは化学療法開始前のものを抽出した。腫瘍におけるタンパク質量は、逆相タンパク質アレイ (reverse phase protein array; RPPA) を用いて解析を行った。良性膵疾患患者では、健常人と比較して血清 GDF-15 濃度が高いことが報告されており、その原因は良性膵疾患患者に認められる膵管内圧上昇であると考えている。進行膵がん患者においても良性膵疾患患者と同様に膵管内圧上昇が認められるため、腫瘍による血清 GDF-15 濃度の上昇を抽出するためには、膵管内圧上昇の影響を除外すべきであると考えた。そのため、血清 GDF-15 濃度のカットオフ値を良性膵疾患患者の血清中濃度の平均値に標準偏差の 2 倍を加えた値に設定することとし、カットオフ値を 3356.6 pg/mL とした。血清 GDF-15 濃度高値の患者の臨床的特徴は、全身状態の低下、C-reactive protein (CRP) 高値、carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) 高値、重篤な食欲不振であった。血清 GDF-15 濃度高値の患者の腫瘍において、Akt と c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化体のタンパク質量が多い特徴が認められた。第 2 章で着目した神経浸潤について検討したが、神経浸潤の有無によって血清 GDF-15 濃度に差は認められなかった。以上の結果から、血清 GDF-15 濃度高値の進行膵がん患者は、悪液質の特徴を有し、腫瘍において Akt や JNK を含めたシグナル経路が活性化していることが明らかとなった。また、血清 GDF-15 濃度高値の患者は、腫瘍量と関連する CA19-9 が高値であり、その腫瘍において、ストレス応答への関与が報告され、GDF-15 産生経路の上流に位置する Akt や JNK のリン酸化体が増加していたため、腫瘍量増大が原因となって起こるストレスへの応答の結果として、血中の GDF-15 が増加したことが示唆

される。本研究の研究成果は、循環血中の GDF-15 が、進行膵がんにおける悪液質症状と深く関連している可能性を示している。また、GDF-15 の生物学的活性阻害は、進行膵がん患者において、悪液質症状のひとつである食欲不振を改善させる効果が期待できることが示唆された。

#### 第4章 総括

膵がん患者のほぼ全例に起こる神経浸潤は、疼痛や悪液質の原因となる予後不良因子である。それを再現した神経浸潤マウスモデルやヒト膵がん細胞株を用いた非臨床的検討及び患者の検体・データを用いた臨床的検討から、IL-6 が神経浸潤の促進因子のひとつであることを明らかにした。進行膵がん患者に対して IL-6 シグナル経路の阻害薬を用いた臨床試験は、JAK 阻害薬であるルキシソリチニブや抗ヒト IL-6R 抗体であるトシリズマブを用いて実施されているものの、あまり良好な成績を残すことができていない。併用レジメンがゲムシタビン単独やカペシタビン単独であり、治療強度不足が原因となっている可能性が考察されており、現在ゲムシタビン + ナブパクリタキセル併用療法にトシリズマブを上乗せした臨床試験が実施されている。もともとのゲムシタビン + ナブパクリタキセル併用療法の抗腫瘍効果に加えて、トシリズマブによる神経浸潤抑制効果に伴う悪液質進行の抑制効果の可能性も期待される。

進行膵がん患者の臨床データと腫瘍における網羅的なタンパク質発現解析から、血清

GDF-15 濃度高値の進行膵がん患者が、悪液質の特徴を有し、腫瘍において Akt や JNK を含めたシグナル経路が活性化していることを明らかにした。本研究結果は、循環血中の GDF-15 が進行膵がんにおいて悪液質症状と関連している可能性を示している。現在、開発が進んでいる抗 GDF-15 抗体薬は、進行膵がん患者への投与によって食欲不振を改善させる可能性があり、さらに血清 GDF-15 濃度高値の患者を対象患者として設定することで、抗 GDF-15 抗体の効果がより強く得られることが示唆された。本研究では、神経浸潤と血清 GDF-15 濃度の関係性は認められなかった。第 2 章で扱った N-inv モデルは、先行研究から摂食量低下を伴わずに骨格筋萎縮や体重減少を起こすことが明らかとなっており、神経浸潤と食欲不振の直接的な関係は明らかとなっていない。それを踏まえ、第 3 章において、食欲不振と相関する血清 GDF-15 濃度と神経浸潤の有無との関連性を調べたが、明らかな関連性は認められなかった。

本研究では、悪液質の原因となる腫瘍浸潤促進因子についての検討で、膵がん神経浸潤の促進分子機序のひとつが IL-6/gp130 axis であることを明らかにし、悪液質促進因子である GDF-15 の血清中濃度高値の進行膵がん患者の臨床的特徴と腫瘍の分子生物学的特徴を明らかにした。本研究の成果によって、がん悪液質の原因となる悪液質腫瘍因子に着目したがん悪液質の新規治療を開発するために必要な悪液質腫瘍因子の候補、原因分子の阻害療法についての臨床試験構築へ向けた基盤情報を提供することができた。新規治療薬開発のための臨床試験の多くは、製薬企業が中心となって計画・実施されるが、臨床試験立案



に必要な基盤となる情報の提供には、大学・医療機関を含むアカデミアが中心的役割を担っている。本研究によって、がん悪液質の新規治療開発に直結し、製薬企業による新規治療開発を後押しするような基盤情報を得ることができたと考える。

## 目次

要旨	2
略語表	12
第1章 序論	14
1.1. 膵がんとは	14
1.2. 膵がんの治療法	15
1.3. 膵がん悪液質とその発症機序	17
1.4. 医薬品開発におけるアカデミアの役割と本研究の位置づけ	19
1.5. 本研究の目的	20
1.6. 膵がん神経浸潤	21
1.7. がん悪液質治療としての GDF-15 阻害療法とその臨床試験構築に必要な情報	23
1.8. 進行膵がん患者における GDF-15 カットオフ設定のための根拠	24
第2章 Interleukine-6/gp130 経路による膵がん神経浸潤の促進	26
2.1. 緒言	26
2.2. 研究方法	27
2.2.1. 細胞	27
2.2.2. マウスモデル	27
2.2.3. MRI	31
2.2.4. Wound healing assay	31
2.2.5. Chemotaxis assay	32
2.2.6. 免疫染色	33
2.2.7. 蛍光免疫染色	34
2.2.8. ELISA	35
2.2.9. ウェスタンブロット	35
2.2.10. フローサイトメトリー (FACS) 解析	36
2.2.11. リアルタイム RT-PCR	37
2.2.12. siRNA	38
2.2.13. Short hairpin RNA (shRNA)	39
2.2.14. PDAC 患者における神経浸潤の放射線学的評価	39
2.2.15. 免疫染色に用いた PDAC 患者の検体	40
2.2.16. 統計学的解析	40
2.3. 結果	41
2.3.1. <i>In vitro</i> 実験における IL-6 superfamily のヒト膵がん細胞株の浸潤に対する刺激活性	41
2.3.2. N-inv モデルにおける IL-6 と p-STAT3 の発現	46

2.3.3. IL-6 shRNA の N-inv モデルへの影響 .....	52
2.3.4. IL-6R と gp130 に対する RNA 干渉の細胞表面の受容体発現と N-inv モデルへの影響 .....	53
2.3.5. 抗 IL-6 抗体の N-inv モデルへの影響 .....	56
2.3.6. PDAC 患者における神経浸潤と血清中 IL-6 濃度 .....	57
2.4. 考察 .....	62
2.5. 小括 .....	69
第 3 章 血清 Growth differentiation factor 15 濃度高値の進行膵がん患者の臨床的特徴と腫瘍の特徴 .....	70
3.1. 緒言 .....	70
3.2. 研究方法 .....	72
3.2.1. 研究倫理 .....	72
3.2.2. 対象患者 .....	72
3.2.3. がん性悪液質とサルコペニアの定義 .....	72
3.2.4. 臨床データの収集方法 .....	73
3.2.5. ELISA .....	74
3.2.6. タンパク質発現解析 .....	74
3.2.7. 統計学的解析 .....	75
3.3. 結果 .....	76
3.3.1. 血清 GDF-15 濃度のカットオフ値 .....	76
3.3.2. 血清 GDF-15 濃度によるベースラインの臨床的特徴 .....	78
3.3.3. 血清 GDF-15 濃度と生存期間の関係 .....	82
3.3.4. 血清 GDF-15 濃度高値患者の腫瘍の特徴 .....	84
3.4. 考察 .....	87
3.5. 小括 .....	90
第 4 章 総括 .....	91
謝辞 .....	95
参考文献 .....	96
論文目録 .....	105

## 略語表

ATCC	American Type Culture Collection
BMI	body mass index
BSC	best supportive care
CA19-9	carbohydrate antigen 19-9
CeA	celiac artery (腹腔動脈)
CEA	carcinoembryonic antigen
CI	confidence Interval (信頼区間)
CRP	C-reactive protein
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECL	enhanced chemiluminescence
ECOG-PS	Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status Scale
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (酵素結合免疫吸着検定法)
ERK	extracellular regulated kinase
FAACT	functional assessment of anorexia/cachexia therapy
FACS	fluorescence-activated cell sorting (フローサイトメトリー)
FOV	field of view
FSC	forward scatter (前方散乱光シグナル)
FSE	fast spin echo
GDF-15	growth differentiation factor 15
GFRAL	glial cell-line derived neurotrophic factor family receptor $\alpha$ like
HE	hematoxylin eosin
Ig	immunoglobulin
IL-6	interleukin 6
IPMC	intraductal papillary mucinous carcinoma (膵管内乳頭粘液性がん)
IPMT	intraductal papillary mucinous tumor (膵管内乳頭粘液性腫瘍)
JAK	janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KPS	Karnofsky performance status
LI	labeling index
LIF	leukemia inhibitory factor
LV	ロイコボリン
m-	mouse-
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDASI-J	Japanese version of the MD Anderson Symptom Inventory

MST	median survival time
nal-IRI	イリノテカンのナノリポソーム製剤 (オニバイド®)
N2O	亜酸化窒素
N-inv モデル	神経浸潤マウスモデル
OD	optical density (光学密度)
OS	overall survival (全生存期間)
OSM	oncostatin M
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (末梢血単核球)
PBS	phosphate buffered saline
PDAC	pancreatic ductal adeno carcinoma (膵管腺がん)
PE	phycoerythrin
PFS	progression free survival (無増悪生存期間)
p-	phosphorylated
PVST	perivascular soft tissue (血管周囲脂肪組織)
QOL	quality of life (生活の質)
-R	-receptor
RPPA	reverse phase protein array (逆相タンパクアレイ)
SC モデル	subcutaneous tumor モデル (皮下腫瘍モデル)
SCID	severe combined immunodeficiency (重度免疫不全)
SCT	serous cystic tumors (膵漿液性嚢胞腫瘍)
SD	standard deviation
shRNA	short hairpin RNA
sIL-6R	soluble interleukine 6 receptor (可溶型インターロイキン 6 受容体)
SMA	superior mesenteric artery (上腸間膜動脈)
SMI	skeletal muscle mass index (骨格筋量指数)
SSC	side scatter (側方散乱光シグナル)
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TWEAK	tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis
5-FU	フルオロウラシル

## 第 1 章 序論

### 1.1. 膵がんとは

膵臓に生じる上皮系悪性腫瘍は、膵管や腺房組織といった外分泌腺から生じる膵管がんや膵管内乳頭粘液性腫瘍、腺房細胞がんを含む外分泌腫瘍と、神経内分泌がんのように内分泌腺から生じる内分泌腫瘍に大別される(1)。この中で、膵管がんは膵上皮系腫瘍のおよそ 90%を占め、一般的に膵がんとは膵管がんのことを指す。

国立がん研究センターのがん登録・統計によると、日本における 2019 年の膵がんの罹患患者数は年間 40,400 人、死亡者数は年間 35,700 人と推計されており、全がん種のなかで、罹患患者数で 6 位、死亡者数では 4 位である。また、日本における膵がんへの罹患率は緩徐に増加傾向にある(2)。一般に、膵がんの好発年齢は 65～74 歳で、男性がわずかに多い(3)。膵がんの予後に関する報告をみると、5 年相対生存率は 9.6%と全がん種の中で最悪であったが、5 年生存率は 1993～2008 年間でほぼ横ばいで推移している(2)。膵がんの予後は、罹患率が増加している一方で改善に乏しく、依然として不良であると言える。病期別の予後は、Surveillance Epidemiology and End Results のデータでは限局病変の 5 年生存率は 41.6%、局所病変の 5 年生存率は 14.4%、転移病変の 5 年生存率は 3.0%であった(3)。

## 1.2. 膵がんの治療法

膵がんは診断時に約 80% が切除不能であり、ほとんどの膵がん患者に対して化学療法が実施される。膵がんに対する化学療法は近年まで開発が進展しておらず、進展の兆しは、1997年に報告された北米で行われた切除不能進行膵がんに対するフルオロウラシル (5-FU) 療法とゲムシタビン単独療法の第Ⅲ相臨床試験である (4)。この試験において、ゲムシタビン単独療法は 5-FU 療法に対して全生存期間 (OS) の有意な延長と疼痛などの症状緩和効果を示した。これ以降、治療開発が進み、2005年に北米を中心に行われた第Ⅲ相試験にて有効性が示されたゲムシタビン + エルロチニブ併用療法は、ゲムシタビン単独療法よりも有意に OS は延長したが (5)、その差はわずか数週間であった。その後、2010年に ACCORD11 試験 (6) において、5-FU、ロイコボリン (LV)、イリノテカン、オキサリプラチンの併用療法である FOLFIRINOX 療法がゲムシタビン単独療法と比較して、有意な生存期間中央値 (MST) の延長を示し、大幅な OS 及び無増悪生存期間 (PFS) の延長、抗腫瘍効果の改善が認められた。また、2011年に切除不能進行膵がん患者に対するゲムシタビン単独療法に対する S-1 療法の非劣性とゲムシタビン + S-1 (GS) 療法の優越性を検証した国内第Ⅲ相試験である GEST 試験が実施された (7)。この試験の結果では、GS 療法の優越性は示されなかったが、S-1 療法の非劣性が証明され、切除不能進行膵がんの標準治療の一つとなった。さらに、2013年にゲムシタビン + ナブパクリタキセル併用療法とゲムシタビン単独療法を比較した第Ⅲ相試験である MPACT 試験 (8) が欧米を中心に行われ、ゲムシタビン + ナブパク

リタキセル併用療法がゲムシタビン単独療法よりも有意に MST が延長したことが示された。

『膵癌診療ガイドライン 2019 年版』では、遠隔転移を有する膵がんの 1 次治療として、FOLFIRINOX 療法とゲムシタビン + ナブパクリタキセル併用療法が第 1 選択として推奨されているが、何らかの理由でこれらの治療が適さない患者では、ゲムシタビン単独療法、S-1 療法、ゲムシタビン + エルロチニブ併用療法が推奨されている (9)。2 次治療については、2016 年に転移性膵がん患者の 2 次治療において、イリノテカンのナノリポソーム製剤 (nal-IRI)、LV、5-FU の併用療法 (nal-IRI+5-FU/LV 療法)、nal-IRI 単剤療法、LV と 5-FU の併用療法 (5-FU/LV 療法) の 3 つの治療を比較した第Ⅲ相試験 (NAPOLI-1 試験) の結果が報告され、nal-IRI+5-FU/LV 療法は、5-FU/LV 療法と比較して、OS、PFS を有意に延長することが示された (10)。NAPOLI-1 試験の結果から、転移性膵がんの 2 次治療の選択肢として、nal-IRI+5-FU/LV 療法が推奨されている。

上記のように治療の開発が進んでいるにも関わらず、膵がん患者の死亡者数の減少や予後の延長を達成できていないことから、殺細胞性抗がん剤を用いて腫瘍縮小効果を狙った化学療法のみでは膵がん患者の治療として十分ではない可能性が考えられた。そこで、着目した病態が、膵がん患者において初診時より高頻度に認められ、膵がん患者の主な死因のひとつである「がん悪液質」である。



### 1.3. 膵がん悪液質とその発症機序

がん悪液質は、体重減少・骨格筋減少を主徴とする複合的な代謝異常である (11)。悪液質の診断基準は、確固たるものは未だ確立されていないが、臨床で広く用いられている国際的にコンセンサスが得られている診断基準では、①過去 6 ヶ月間の体重減少>5%、②BMI<20 かつ体重減少>2%、③サルコペニアかつ体重減少>2%、①~③のいずれかを満たすものとされている (11)。がん悪液質は進行性であり、「前悪液質」、「悪液質」、「不応性悪液質」の 3 つの段階に分類される。不応性悪液質まで進行すると化学療法に対する抵抗性や全身状態の悪化、生命予後不良 (3 ヶ月未満) となるため、不応性悪液質になる前から積極的に介入することが望ましいとされる。また、膵がん悪液質は、初診時より高頻度に認められ、病期分類に関わらず、その頻度が一定であるため、腫瘍縮小効果を狙った化学療法に加えて、がん悪液質に対する治療を行うことで、膵がん患者の生命予後を改善する可能性がある。

がん悪液質の発症機序は、宿主-腫瘍間相互作用をきっかけとして、代謝調節不全が起こり、食欲低下や体重減少などの悪液質症状が出現すると考えられている(12) (図 1)。

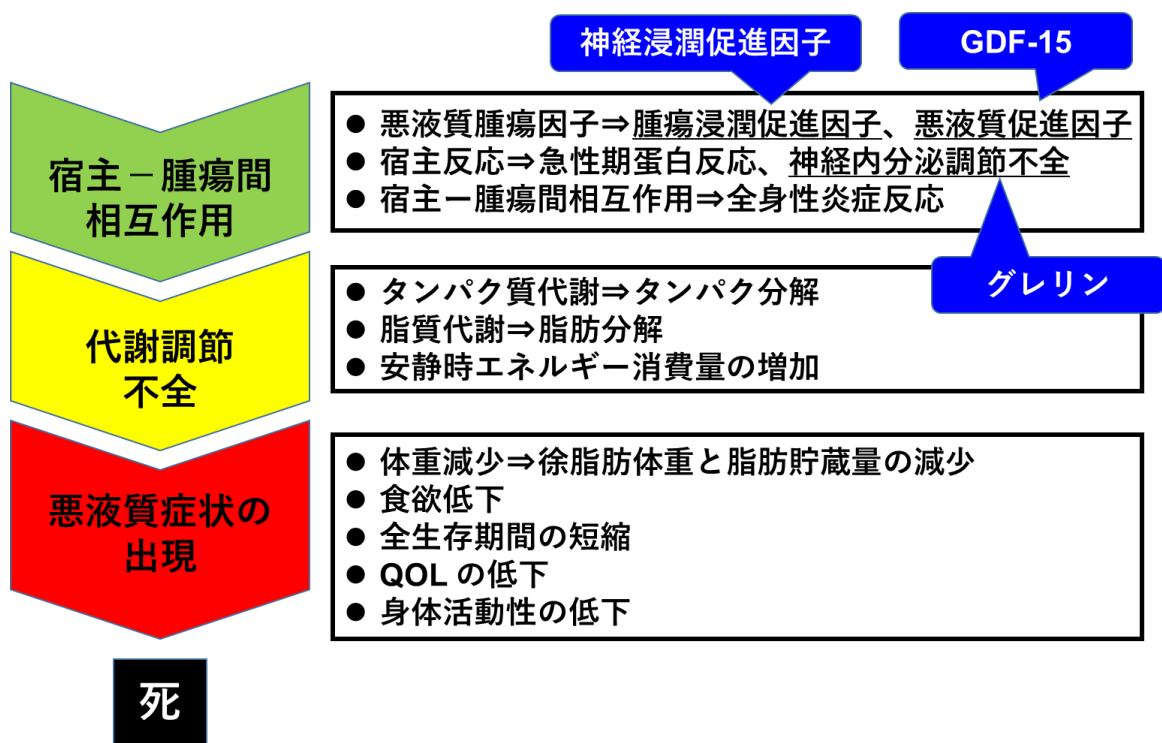


図 1. がん悪液質の発症機序

(日本がんサポーターブケア学会『がん悪液質：機序と治療の進歩』一部改変)

現在、この発症機序に基づいた悪液質治療薬の開発が進められている。宿主－腫瘍間相互作用の宿主反応のひとつである神経内分泌調節不全に着目して開発されたのが、グレリン受容体作動薬であるアナモレリンである。新規悪液質治療薬として 2021 年に世界で初めて本邦で承認されたアナモレリンは、グレリン受容体に結合することで、グレリン様作用を発現し、がん悪液質患者に対する食欲不振の改善効果や筋肉量及び体重の増加が示されている (13)。その一方で、アナモレリンの倦怠感、握力、6 分間歩行への有効性は、プラセボと有意差がなく、悪液質で発現する全ての症候に対して有効ではないとされている。また、薬物治療だけでなく、運動療法や栄養療法などさまざまな介入の有用性を検討した

臨床試験が実施されているものの、悪液質に対して著明な有効性を示した報告はほとんどなく、薬物療法以外の治療法は確立されていない。がん悪液質に対する治療の開発は求められている分野であるが、明確な分子機序が解明されておらず、開発を進めるためには、分子機序解明の手掛かりとなる研究が必要不可欠である。膵がん悪液質は、初診時から高頻度に認められ、病期分類に関わらず悪液質頻度が一定であることから、原発巣での腫瘍因子が原因として重要であると考え、悪液質腫瘍因子に着目した。悪液質腫瘍因子には、腫瘍の浸潤に関わる腫瘍浸潤促進因子と悪液質症状を悪化させる悪液質促進因子がある(14)。腫瘍浸潤促進因子を考える上で、がん悪液質に伴う全身性炎症反応に着目し(15)、膵がんのほぼ全例に起こり、全身性炎症反応を惹起する腫瘍細胞の神経浸潤を研究対象とした。また、悪液質促進因子としては、食欲不振との関連性が多数報告されており、その抗体が食欲不振改善効果を有することが示されている GDF-15 に着目した。

#### 1.4. 医薬品開発におけるアカデミアの役割と本研究の位置づけ

がん悪液質に関する研究を実施する上で、著者は 1.3. で示したように「悪液質腫瘍因子」に着目したが、研究を構築する上で、医薬品開発におけるアカデミアの役割を考えた。医薬品開発は、「標的探索」、「化合物合成」、「非臨床試験」、「臨床試験」の流れで進められ、その全てを通過した医薬品が承認され、実臨床にて使用される(図 2)。基礎研究では、主にアカデミア(大学・医療機関等)が実施し、その情報を製薬企業へ提供する。応用研究

から臨床試験までの工程は、化合物最適化や薬効安全性薬物動態評価などの技術を有する製薬企業が多くを担う (16)。一方で、開発対象の医薬品の効果をより適切に評価できる臨床試験の構築のために必要な臨床情報の提供は、アカデミア (医療機関) の役割である。そこで、がん悪液質に対する新規治療開発に対し、アカデミアの立場として、研究 1：膵がん悪液質の腫瘍要因に関する基礎研究、及び 研究 2：新規悪液質治療の構築に資する基盤情報を収集する臨床研究を実施することを計画した。

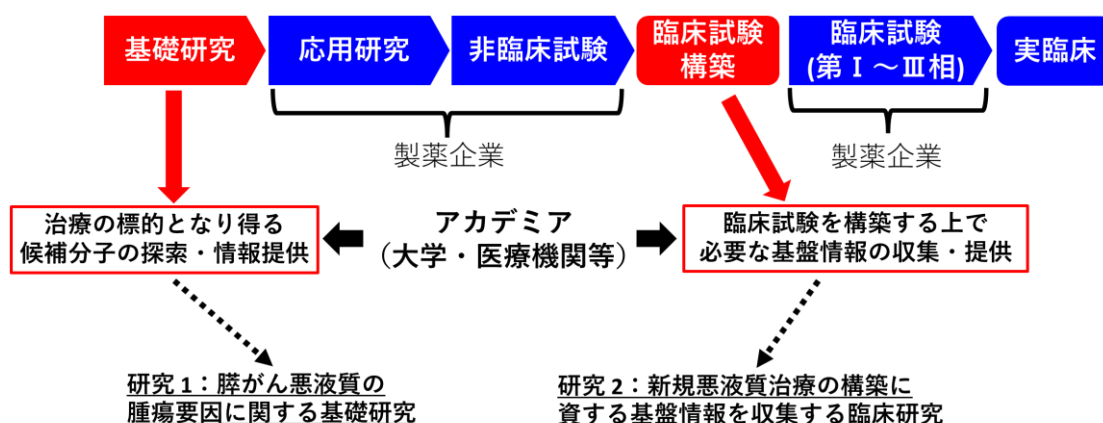


図 2. 医薬品開発におけるアカデミアの役割と本研究の立ち位置

### 1.5. 本研究の目的

本研究では、悪液質の原因となる悪液質腫瘍因子に着目し、その分子機序解明や腫瘍因子をターゲットとした臨床試験構築のための基盤情報を収集することで、悪液質機序に基づいた新規治療の開発に必要な情報を得ることを目的とした。本研究は、2 つの研究からなり、第 2 章では膵がん悪液質の腫瘍要因に関する基礎研究として N-inv モデル を用いた

浸潤促進分子の探索、第3章では新規悪液質治療の構築に資する基盤情報を収集する臨床研究として血清 GDF-15 濃度高値となる膵がん患者集団の臨床的特徴の探索を行った。

## 1.6. 膵がん神経浸潤

膵がん悪液質に関わる腫瘍要因として着目した神経浸潤とは、腫瘍が腺管構造を形成しながら、神経周膜と神経内膜の間にある神経周囲腔を連続伸展する浸潤様式であり (17)、悪液質、痛み、予後不良と関連することが報告されている (18, 19)。国立がん研究センター東病院にて確立されたヒト膵がん神経浸潤マウスモデル (N-inv モデル) は、ヒト膵がん細胞株を重度免疫不全マウスの坐骨神経に直接注入することで、神経浸潤を病理学的・形態学的に再現したモデルであり (20)、悪液質病態の特徴である体重減少・骨格筋異化、全身性炎症反応を有することが明らかとなっている (21) (図3)。

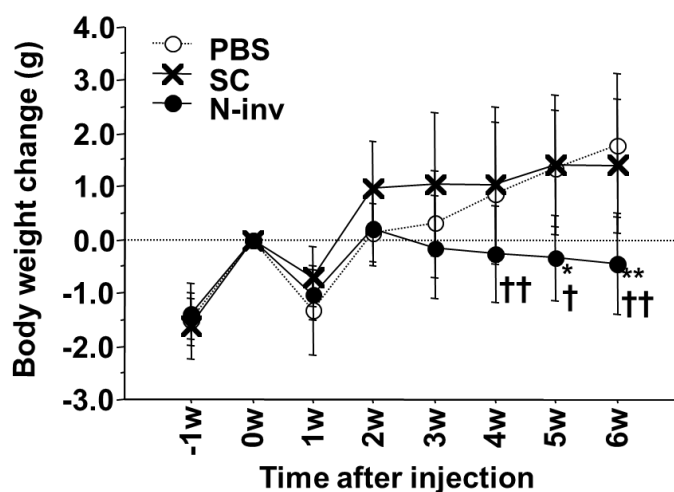


図3. 神経浸潤による体重減少

N-inv : 神経浸潤マウスモデル、SC : 皮下腫瘍モデル、PBS : PBS 坐骨神経注入モデル  
(Imoto A, et al. Int J Cancer. 2012;131:2795-807.)

N-inv モデルの神経浸潤の特徴として、腫瘍が決まって中枢方向へ進展していくことが明らかとなっている(20) (図 4)。しかしながら、中枢方向へ決まって浸潤していく原因は解明されておらず、神経浸潤の分子機序として、中枢方向へ腫瘍を誘引する液性因子によって浸潤が促進されている可能性を考えた。この考えに基づき、腫瘍を中枢側へ誘引する液性因子が、神経の中枢側で高発現しているという仮説を構築した (図 4)。臨床における膵がん患者の神経浸潤は、N-inv モデルと異なり、中枢・末梢の両側へ進行するものの、神経浸潤促進分子を探索する上で、N-inv モデルにおいて腫瘍を中枢側へ誘引する液性因子の検討は有用であると考えられる。

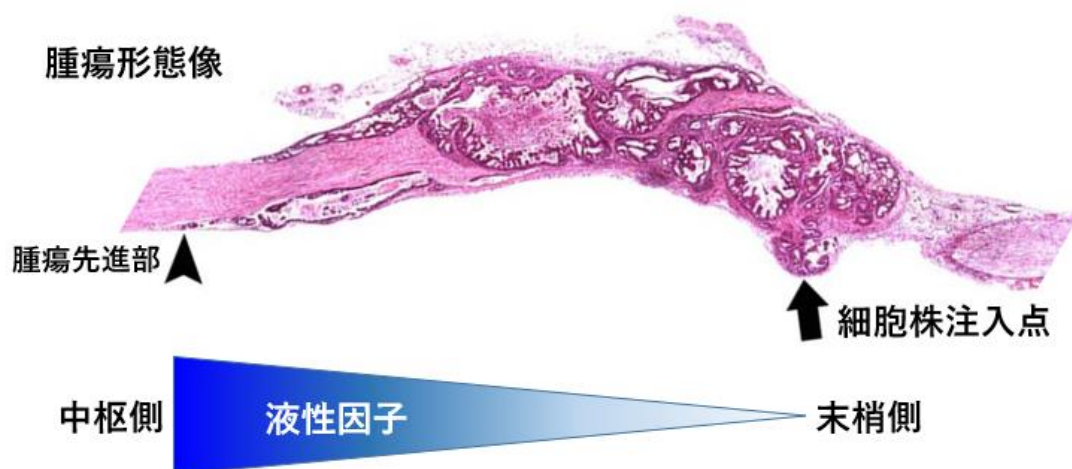


図 4. 神経浸潤の仮説

上の図は N-inv モデルの腫瘍形態像を示した hematoxylin eosin (HE) 染色の画像を示している。細胞株注入点から神経に沿って腫瘍が連続伸展している様子が確認できる。

液性因子の候補として注目した分子は、神経に豊富に存在する神経栄養因子である。神経栄養因子は、神経障害部位のシュワン細胞から分泌される液性因子であり、分泌後に軸

索輸送されて、神経細胞死の抑制や軸索伸長と発芽の促進に関与する (22)。神経栄養因子に含まれる分子には、interleukin 6 (IL-6) を含む IL-6 superfamily や epidermal growth factor、fibroblast growth factor などといったがんの増殖や浸潤と関連する分子が多く含まれている。また、悪液質の特徴である全身性炎症反応を惹起させる炎症性サイトカインには、神経栄養因子として挙げた IL-6 が含まれている (23, 24)。先行研究において、IL-6 の細胞内シグナルの下流に存在する signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の活性化が神経浸潤促進に関与していることが報告されており (25)、IL-6 が神経内を浸潤する腫瘍細胞に作用することで浸潤を促進している可能性が考えられた。そのため、IL-6 が神経浸潤促進分子であることを立証することを目的とする研究を計画した。悪液質の原因となる神経浸潤の分子機序を解明することで、悪液質腫瘍因子に基づく新規悪液質治療開発につながると考えた。

### 1.7. がん悪液質治療としての GDF-15 阻害療法とその臨床試験構築に必要な情報

近年、新規悪液質治療として、悪液質促進因子の阻害療法の臨床開発が進んでいる。悪液質促進因子のひとつである GDF-15 は、ストレス応答性サイトカインであり、食欲調節に直接関与することが知られている (26, 27)。がん患者において、食欲不振を有する患者は、食欲不振のない患者と比べて GDF-15 の血清中濃度が高値であることが報告され (28)、臨床における食欲不振と血清 GDF-15 濃度の関係性は明らかとなっている。また、悪液質の

非臨床モデルにおいて、GDF-15 阻害療法によって悪液質改善効果が認められている (29)。

以上より、GDF-15 の阻害療法は、がん悪液質の新規治療法として有望であると考えた。

進行膵がん患者においてこの GDF-15 阻害療法の臨床試験を立案するにあたり、その有効

性を明瞭にするためには、阻害療法の特性上、対象患者集団として血清 GDF-15 濃度高値

の患者を選定する必要がある。そこで、血清 GDF-15 濃度高値の進行膵がん患者を対象と

した臨床試験を立案するために、以下の情報収集を計画した。

- ① 対象患者の選定根拠としての血清 GDF-15 濃度のカットオフ値
- ② 血清 GDF-15 濃度高値患者の患者背景のデータ
- ③ 臨床試験の観察期間設定のための血清 GDF-15 濃度高値患者の予後データ
- ④ 血清 GDF-15 濃度高値の患者集団におけるプライマリーエンドポイントとなり得る  
食欲不振の程度を示すデータ
- ⑤ 血清 GDF-15 濃度高値の分子生物学的な裏付けや今後の研究につながるような探索  
的検討を目的とした腫瘍組織における分子生物学的特徴

#### 1.8. 進行膵がん患者における GDF-15 カットオフ設定のための根拠

血清 GDF-15 濃度高値の進行膵がん患者においては、膵臓に腫瘍が存在することで、  
solid stress の要因となり得る膵管内圧上昇があることが想定される。Solid stress とは、ある  
組織による周囲の組織への物理的な圧力と逆に周囲組織が形を保とうとして働く外部応力



の総和と定義されている (30)。膵管内圧上昇は、良性膵疾患患者でも認められる状態であり、良性膵疾患患者の健常人に対する GDF-15 濃度高値は既に報告されている (31)。膵管内圧上昇に加えて、腫瘍における solid stress に対するストレス応答が加わることで、さらに血清 GDF-15 濃度が増加する可能性が考えられる。この仮説を裏付ける既報として、膵がんにおける solid stress 増加に伴う GDF-15 産生増加が報告されている (32)。以上のことから、腫瘍の影響による血清 GDF-15 濃度の上昇を抽出するためには、良性膵疾患でも認められるような膵管内圧上昇による血清 GDF-15 濃度への影響を除外する必要がある (図 5)。

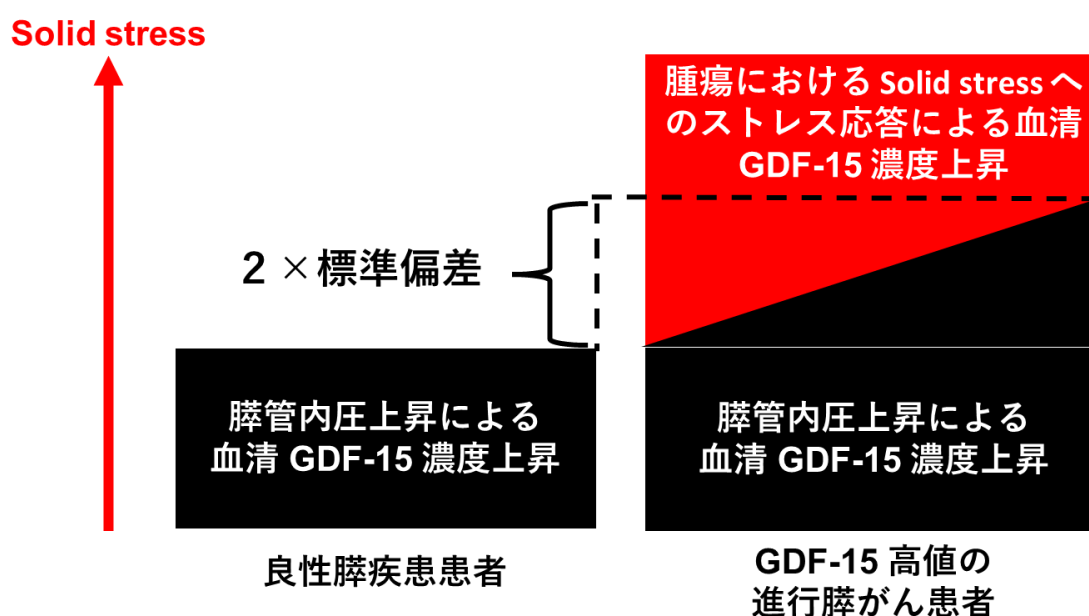


図 5. 膵がん患者における血清 GDF-15 濃度上昇の要因についての仮説

## 第 2 章 Interleukine-6/gp130 経路による膵がん神経浸潤の促進

### 2.1. 緒言

神経浸潤は、殆どの膵管腺がん (PDAC) に認められる腫瘍の浸潤様式であり、重要な予後因子の一つである (18, 33, 34)。神経浸潤は、全身性炎症反応 (21)、疼痛 (35, 36)、悪液質 (19)、そして生活の質 (QOL) の悪化の原因となる。ヒト膵がん細胞株である MiaPaCa-2 を移植することで作製した神経浸潤モデル (N-inv モデル) マウスを用いた先行研究において、神経浸潤の増悪が STAT3 のリン酸化に依存していることが明らかとなった (25)。また MiaPaCa-2 は、別の先行研究において IL-6 の刺激により IL-6 の濃度依存的に STAT3 のリン酸化が起こると報告されている (37)。IL-6 や leukemia inhibitory factor (LIF)、oncostatin M (OSM) を含む IL-6 superfamily は、gp130 との相互作用によって、Janus kinase (JAK)/STAT 経路を活性化する (38)。著者は、これらの報告から、IL-6 superfamily/gp130 経路が STAT3 を介して、神経浸潤を促進すると仮説を立てた。

著者の所属する研究グループが先行研究で確立した N-inv モデルは、ヒト膵がん細胞株を重度免疫不全 (SCID) マウスの坐骨神経に注入することで作製する (20)。このモデルは、PDAC 患者の神経浸潤の形態学的特徴や臨床症状を再現しており (21, 36)、腫瘍細胞の高い浸潤能や STAT3 活性化を示すことがわかっている (20, 25)。そのため、N-inv モデルは神経浸潤における IL-6 superfamily/gp130 経路の関わりについて解明するために適切なモデルであると考えた。後述する本研究の結果から、N-inv モデルにおいて IL-6/gp130 経路が腫瘍細

胞の神経浸潤を促進することが示されたため、著者はヒト IL-6 受容体 (R) 抗体であるトシリズマブを N-inv モデルへ投与した。トシリズマブは、膜結合型 IL-6R と可溶型 IL-6R (sIL-6R) の両方に結合し、gp130 分子の二量体形成を阻害することで、JAK/STAT 経路を抑制する (39, 40)。

本研究では、以下の3点について主に評価することを計画した。

- A) 膵がん細胞株の浸潤に対する IL-6 の刺激能
- B) N-inv モデルの神経浸潤に対する IL-6/gp130 経路阻害による影響
- C) PDAC 患者における神経浸潤と IL-6・gp130 発現レベルの関係

## 2.2. 研究方法

### 2.2.1. 細胞

2種類のヒト膵がん細胞株 [Capan-1 (RRID: CVCL\_0237)、BxPC-3 (RRID: CVCL\_0186)] を American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) から購入して各実験に用いた。それぞれの細胞株は、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で、ATCC が推奨する培養プロトコルに従って培養した。

### 2.2.2. マウスモデル

ヒト膵がん細胞株として Capan-1 を用いて、先行研究 (20) と同様にして N-inv モデルと

SC モデルを作成した。6 週齢の SCID マウスに対して、麻酔用マスクを用いて、酸素中のイソフルラン濃度 4-5% にて麻酔導入を行い、モデル作製処置の間、酸素中のイソフルラン濃度 2-3% にて麻酔維持を行った。左足の坐骨神経を大腿骨レベルまで露出後、 $2.5 \times 10^4$  個の Capan-1 を含む  $2.5 \mu\text{L}$  の phosphate buffered saline (PBS) をマイクロシリンジ (Hamilton, Reno, NV) と 30G 注射針 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) を用いて露出した坐骨神経へ注入した (図 6)。

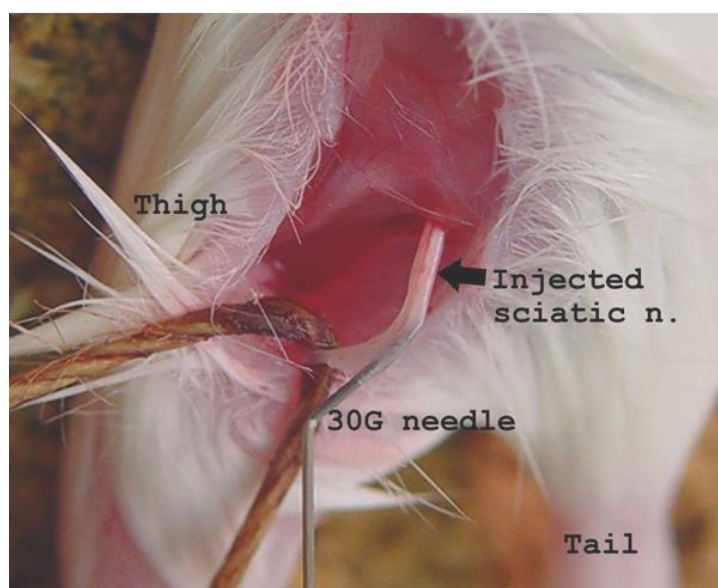


図 6. 神経浸潤マウスモデル作製の様子

JAK2 の阻害薬である AG490 ( $n = 6$ ;  $0.5 \text{ mg/kg}$ ; Calbiochem, San Diego, CA) もしくは dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液 ( $n = 4$ ,  $1\%/1 \text{ mL/body}$ ) は、N-inv モデルに対して、モデル作製後 14 日目から 28 日目まで 1 日 1 回腹腔内投与した (図 7)。

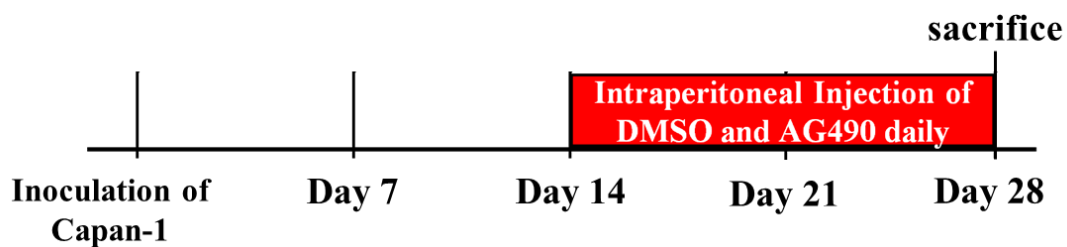


図 7. AG490 投与スケジュール

また、追加実験として実施した AG490 投与実験では、両側の坐骨神経に Capan-1 を注入して両側に神経浸潤させた N-inv モデルに対して、モデル作製後 3 日目から 14 日目まで 1 日 1 回、図 7 の実験と同量の AG490、DMSO を腹腔内投与した (図 8)。n 数は評価可能な神経内腫瘍の数とした。

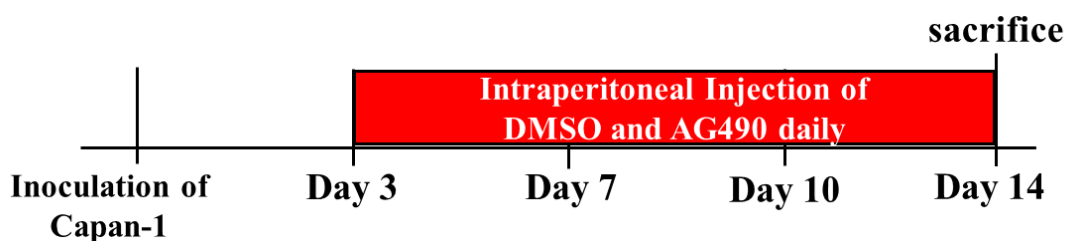


図 8. 追加実験の AG490 投与スケジュール

抗 IL-6R 抗体であるトシリズマブ (n = 6; Chugai Pharm. Co., Tokyo, Japan) もしくはヒト Immunoglobulin (Ig)G (n = 4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) は、N-inv モデルに対して、いずれも 5  $\mu$ g/体重 g の投与量で、モデル作製後 7 日目から 21 日目まで 1 週間に 2 回 腹腔内投与した (図 9)。

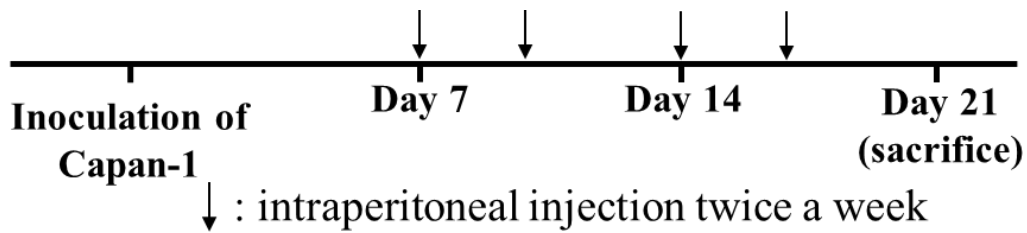


図9. トシリズマブ投与スケジュール

剖検は、薬剤の投与がある場合には、最終投与の 2 時間後に実施した。剖検の際には、マウスの呼吸が止まり、死に至るまで、5% 濃度のイソフルランを持続吸入させた。人道的エンドポイントは以下のように設定した。

- (a) 最大体重の 30% 以上の体重減少が認められた場合
- (b) 異常行動が認められるようになった場合
- (c) 腫瘍壊死を伴う皮膚潰瘍が認められた場合

マウスが上記の人道的エンドポイントに達した場合、5% 濃度のイソフルランの持続吸入によって人道的に安楽死させる。脳、心臓、肺などの生命維持に重要な臓器は安楽死後にただちに摘出するが、この方法は、American Veterinary Medical Association guidelines に従った動物の死亡判定を確実に行う方法として認められた倫理的に許容される手法である。

すべての動物実験は、国立がん研究センターの動物実験委員会のガイドラインに従って行われた。なお、本研究における動物実験の実施については、国立がん研究センター動物実験倫理委員会によって承認されている（承認番号：K17-001）。

### 2.2.3. MRI

3 匹の N-inv モデルに対して、モデル作製後 21 日目、28 日目、35 日目に MRI を実施した。すべての画像は 3-T whole-body scanner (Signa HDx; GE Medical Systems, Milwaukee, WI) を用いて撮像された。高周波送信と信号受信には、研究用に開発されたボディコイルとソレノイドコイル（直径 35 mm）をそれぞれ使用した。撮像するマウスは、吸入器を用いて、O<sub>2</sub> と亜酸化窒素（N<sub>2</sub>O）の 1 : 1 の混合ガスに対して混合して 1~2% の濃度にしたイソフルランで麻酔導入した。麻酔導入後、腹臥位でマウスをクレードルに固定し、ソレノイドコイルの中央に置いた。坐骨神経の冠状 T2 強調画像は、脂肪抑制 fast spin echo (FSE) シーケンスを用いて取得された。繰り返し時間/実行エコー時間= 3500/60 ms、エコートレイン= 8 の条件で撮像された T2 強調画像は、スライス厚 1 mm、スライスギャップなし、field of view (FOV) 40 mm、マトリックス 256×256 の条件で取得した。データ取込回数は 4 回に設定した。

### 2.2.4. Wound healing assay

1 well 当たり  $3.0 \times 10^5$  個の Capan-1 を測定開始日の前日に 24-well の培養プレートに播種して 24 時間培養し、その後、一晚無血清条件下で培養した。1000  $\mu$ L ピペット用のチップを用いて、培養してできた細胞の単層を一直線にこすり、直線の無細胞域を作製した。無細胞域を作製した well に対して、PBS を用いて 2 回洗浄することで非接着細胞を除去した

後、無血清培地を加えた。各 well 内は、対物 10 倍の顕微鏡 (ECLIPSE TE300; Nikon, Tokyo, Japan) 下で 0 時間後、24 時間後に撮影を行った。浸潤距離は、Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて解析した。いずれの検討においても、3 回繰り返して同様の実験を行った。浸潤距離の計算には以下の式 1 を用いた。

Scratch healing distant ( $\mu\text{m}$ ) = scratch width at 0 h ( $\mu\text{m}$ ) - scratch width at 24 h ( $\mu\text{m}$ )...式 1

別の方法として、Incucyte® Scratch Wound Assay (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI) を用いて、企業が推奨するプロトコルに従って、無細胞域の細胞占有面積割合を測定することで、細胞の遊走能を算出した。1 well 当たり  $6.0 \times 10^5$  個の Capan-1 を測定開始日の前日に 96-well ImageLock cell migration plates (Essen Bioscience) に播種して 24 時間培養した。その後、セミコンフルエントになった細胞の単層面に 96-pin WoundMaker (Essen Bioscience) を用いて無細胞域を作製し、無血清培地もしくは IL-6 と sIL-6R のリコンビナントタンパク質 (共に R&D Systems, Minneapolis, MN) を含む無血清培地を添加した。細胞の遊走能は、無細胞域作製 24 時間後に “scratch wound” のスキャン設定で測定した。

#### 2.2.5. Chemotaxis assay

Chemotaxis assay は、企業 (BD Biosciences, Bedford, MA) から推奨されたプロトコルに従



って実施した。1 well 当たり  $2.0 \times 10^5$  個の Capan-1 を Falcon® Permeable Support for 24-well Plate with 8.0  $\mu\text{m}$  Transparent PET Membrane (BD Biosciences) に播種し、誘引物質が存在する下部チャンバーへ遊走された細胞数を測定した。遊走細胞は Mayer's hematoxylin (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) にて染色を行い、対物 20 倍にて 9 ヲ所の無作為に選択した領域にて評価を行った。いずれの検討においても、3 回繰り返して同様の実験を行った。

### 2.2.6. 免疫染色

クエン酸バッファー (pH 6.0) または Tris-EDTA (pH 9.0) の中に浸漬し、マイクロウェーブを用いて熱処理による抗原賦活化を行った後、検体スライドを表 1 に記載した抗体と 4 °C で一晩反応させた。mouse IL-6 の 1 次抗体は、室温で 30 分で反応させた。リン酸化 (p-)STAT3 の免疫染色は、対物 40 倍にて近位浸潤先進部と遠位浸潤先進部にて評価を行い、定量には labeling index (LI) を用いて評価した。p-STAT3 LI は以下の式 2 で算出した。

$$\text{p-STAT3 LI} = (\text{評価領域内の p-STAT3 陽性腫瘍細胞の核の数}) / (\text{評価領域内の全腫瘍細胞の核の数}) \times 100 \dots \text{式 2}$$

表 1. 免疫染色に用いる 1 次抗体

Antibodies	Mono/polyclonal	Source	Dilution	Catalog No.	Manufacturer
IL-6	Polyclonal	Rabbit	1:50	sc-7920	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX
gp130	Polyclonal	Rabbit	1:200	sc-655	Santa Cruz Biotechnology
pSTAT3 (Tyr705)	Monoclonal	Rabbit	1:500	#9145	Cell Signaling Technology Japan
mouse IL-6	Polyclonal	Goat	1:500	sc-1265	Santa Cruz Biotechnology

近位浸潤先進部と遠位浸潤先進部は、それぞれ腫瘍細胞の注入点から近位側と遠位側に位置する神経内腫瘍の先端と定義した。N-inv モデルの腫瘍を注入した坐骨神経は採取後、4% パラホルムアルデヒドにて4℃で一晩浸漬して固定し、パラフィンで包埋した。包埋した坐骨神経は、神経の長軸方向に3 $\mu$ m厚で薄切し、連続切片を作製した。切片のひとつに対してHE染色を行い、浸潤先進部の評価を行った。

膵頭部のPDAC患者の切除検体における原発部位と神経浸潤部位の浸潤先進部を用いて、gp130の免疫染色を行った。原発巣の神経浸潤先進部は、原発巣全体の末端でかつ周囲の組織の中へ最も大きく浸潤している部分とした。原発巣の浸潤先進部において、3か所ランダムに抽出された部分を対物20倍で評価した。神経浸潤先進部の選択方法は、先行研究(18)と同様に行った。gp130の陽性面積割合は、Axio Vision version 4.7.1 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて、腫瘍部位面積に対するgp130陽性面積の割合として算出した。陽性面積割合は、患者毎に3か所の平均値として算出した。

### 2.2.7. 蛍光免疫染色

Tris-EDTA (pH 9.0) の中に浸漬し、マイクロウェーブを用いて熱処理による抗原賦活化を行った後、検体スライドを表2に記載した抗体と室温で1時間反応させた。その後、スライドをPBSで洗い、chicken anti-goat IgG (Alexa Fluor® 488; Thermo Fisher Scientific) と donkey anti-rabbit IgG (Alexa Fluor® 555; Thermo Fisher Scientific) の抗体混合液と室温で30分間反応

させる。核染色は、DRAQ5 (1:1000; Cell Signaling Technology Japan) を用いた。画像は、共焦点顕微鏡 (LSM 5 PASCAL; Carl Zeiss, Tokyo, Japan) を使用して撮影した。

表 2. 蛍光免疫染色に用いる 1 次抗体

Antibodies	Mono/polyclonal	Source	Dilution	Catalog No.	Manufacturer
S100	Polyclonal	Rabbit	1:100	Z0311	Agilent, Santa Clara, CA
mouse IL-6	Polyclonal	Goat	1:500	sc-1265	Santa Cruz Biotechnology

### 2.2.8. ELISA

細胞培養液中のヒト IL-6 とヒト sIL-6R の濃度の定量は、ELISA キット (共に R&D Systems) を用いて、企業推奨のプロトコルに則り、2 回繰り返し測定を行った。培養上清は、回収後に pore size 0.22  $\mu\text{m}$  のマイクロフィルター (Millipore, Bedford, MA) を用いてろ過処理した。

### 2.2.9. ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは、先行研究 (20) と同様に行った。20  $\mu\text{g}$  の全細胞タンパク質を 4-20% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、ポリフッ化ビニリデン膜 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 上に転写した。メンブレンは 5% nonfat dry milk を含む Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST) (Tris-HCl, pH 7.5, Tween 0.1%) もしくは Blocking One-P (Nacalai Tesque, Tokyo, Japan) で室温、1 時間でブロッキングを行い、その後、表 3 に示す 1

次抗体を添加して、4°Cで一晩インキュベーションした。検出には、enhanced chemiluminescence (ECL) Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva, Tokyo, Japan) による化学発光法を用いた。検出されたバンドの光学密度 (OD) は Image J software (National Institutes of Health) を用いて算出した。リン酸化タンパク質量の標準化は、以下の式 3 を用いて行った。

$$\text{OD (normalized)} = \text{OD (リン酸化タンパク質)} / \text{OD (総タンパク質)} \dots \text{式 3}$$

各測定時間のリン酸化タンパク質量は 0 分後の量を 1.0 として、0 分後の量に対する相対量として算出された。ローディングコントロールには  $\beta$ -actin を用いた。

表 3. ウェスタンブロットに用いる 1 次抗体

Antibodies	Mono/polyclonal	Source	Dilution	Catalog No.	Manufacturer
STAT3	Monoclonal	Mouse	1:1000	#9139	Cell Signaling Technology Japan
pSTAT3 (Tyr705)	Monoclonal	Rabbit	1:500	#9145	Cell Signaling Technology Japan
Erk1/2	Polyclonal	Rabbit	1:1000	#9102	Cell Signaling Technology Japan
pErk1/2 (Thr202/Tyr204)	Monoclonal	Mouse	1:1000	#9106	Cell Signaling Technology Japan
Akt	Polyclonal	Rabbit	1:1000	#9272	Cell Signaling Technology Japan
pAkt (Ser473)	Polyclonal	Rabbit	1:1000	#9271	Cell Signaling Technology Japan
$\beta$ -actin	Monoclonal	Mouse	1:1000	#3700	Cell Signaling Technology Japan

## 2.2.10. フローサイトメトリー (FACS) 解析

FACS による測定には、それぞれ  $2 \times 10^5$  個の細胞を用いた。末梢血単核球 (PBMC) は Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Heparin N (BD Biosciences) を用いて、2

人の研究者 (H.S. と S.M.) の全血から分画した。研究者由来の全血の使用については、国立がん研究センター倫理委員会にて承認されている (K2011-001)。PBMC は分画後、ただちに使用した。PBMC 及び Capan-1 は、mouse anti-human gp130-phycoerythrin (PE) (R&D Systems) と mouse anti-human CD126-fluorescein isothiocyanate (Diacclone, Besancon, France) を添加して染色した。mouse anti-human gp130-PE との 1 次抗体反応後は、2 次抗体として anti-mouse IgG1-allophycocyanin を添加してさらに染色した。FACS は、BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences) を用いて実施した。PBMC と Capan-1 は、前方散乱光シグナル (FSC) と側方散乱光シグナル (SSC) の特徴で識別された。gp130 と IL-6R の陽性の閾値は、それぞれの細胞におけるアイソタイプコントロールの IgG で反応させた場合の 99 パーセントイル値とした。データの解析には、C6 Plus software version 1.023.1 (BD Biosciences) を用いた。

#### **2.2.11. リアルタイム RT-PCR**

RNA 抽出、逆転写、リアルタイム RT-PCR は、先行研究 (20) と同様に実施した。プライマーの配列は、Takara Bio (Shiga, Japan) によって設計されたものを用いた (表 4)。相対遺伝子発現量は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法を用いて、GAPDH をそれぞれのサンプルのハウスキーピング遺伝子として算出した (41)。

表 4. リアルタイム PCR に用いたプライマー

Species	Target mRNA	Primer sequence (5'-3')		Amplicon size (bp)
		Forward	Reverse	
Human	GAPDH_TaqMan	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	66
Human	IL6_TaqMan	ACCGGAACGAAAGAGAAG	GAAGGCAACTGGACCGAAG	88
Human	IL6R_TaqMan	GATTCTGCAAAATGCGACAAG	TGTGGGCAGTGGTACTGAAG	60
Human	gp130_TaqMan	TGTTGGCAAATCAGATGCAG	AAGATCCATTACAGGGTGTAGTAGC	76
Human	GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	ATGGTGGTGAAGACGCCAGT	136
Human	gp130	GAAGCAAGTGGGATCCTATGAA	CTGTAGCCTTGTAGTATGGGATGGA	89
Human	IL-6R	TGAGCTCAGATATCGGGCTGAAC	CGTCGTGGATGACACAGTGATG	86
Human	OSMR	CCTGACCCTTACAAGAGCAGCA	AGGCTTAGTCAACTCGGTTTCTGTG	183
Human	LIFR	TGATCCTCAGCACAAGCAGAGATA	GGTCGTAATGCCAGGTGAGGA	188
Human	IL11R	AGACCCTGGATGGTGCCTTG	AGAAGTTCTCATAGTCGGCTGCTTG	102
Human	FGFR2	AGCAGGAGCATCGCATTGG	CATCCAGGTGGTACGTGTGATTG	147
Human	EGFR	CGVVVTGACTGAGGACAGCATA	GGGTTTCAGAGGCTGATTGTGATAGA	126
Human	CTNFR	CATTCCCAACACCTTCAATGTGAC	AATGTGGCAGCGTTCCTTGAG	91
Human	GFRA1	AAGAAGTGCCTGCGCATTTACTG	GGAAATGTGCTCCACTTGCTGAA	158
Human	GFRA2	TGCTTCACAGAGCTCACGACAA	CTCGGTTCCCACAGCTACAA	150
Human	TrkA	TGGATAGCCTCCACCACCTG	AGATGCTGCTGGTTCTCGATGTA	70
Human	TrkB	AAGGTGGCCAGATGCTGTC	TGTTATGTGCTTGTGTGCTGAA	129
Human	TrkC	TCCGCATGAACATCAGTCAGTG	GATCCAGAGCCATTGCAAGTGATA	109
Mouse	GAPDH	AAATGGTGAAGTCCGGTGTG	TGAAGGGTCCGTTGATGG	118
Mouse	IL6	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC	112
Mouse	LIF	AAACGGCCTGCATCTAAGGTCTC	CAGTGCAGAACCAGCAGCAGTAA	105
Mouse	OSM	ACACAGAATCACTCTTGGAGCCCTA	GTGCGGAGTGTGTCCTCA	117
Mouse	bFGF	GGACGGCTGCTGGCTTCTAA	CCAGTTCGTTTCAGTGCCACATAC	109
Mouse	EGF	CATCATGGTGGTGGCTGTCTG	CACTTCCGCTTGGTCCATCA	109

### 2.2.12. siRNA

siRNA 添加の前に、 $3.0 \times 10^5$  個の Capan-1 を 6-well のマルチプレートにて 48 時間培養した。siRNA は、IL-6R (sense, 5'-CGACUCUGGAAACUAUUCATT-3'; antisense, 5'-UGAAUAGUUUCCAGAGUCGTG-3'; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) と gp130 (sense, 5'-GGCAUGCCUAAAAGUUACUTT-3'; antisense, 5'-UGAAUAGUUUCCAGAGUCGTG-3'; Thermo Fisher Scientific) を標的として作製された。コントロール siRNA として、Silencer<sup>®</sup> Negative Control #1 siRNA (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

### 2.2.13. Short hairpin RNA (shRNA)

shRNA 発現用レンチウイルスベクター (LV) を用いた持続的な RNA 干渉は、先行研究 (20) と同様の方法で実施した。ベクターは、標準的なクローニング手順を用いて構築した。標的とする遺伝子配列と LV-shRNA-IL-6 と LV-shRNA-luciferase の遺伝子配列は図 10 に示した。

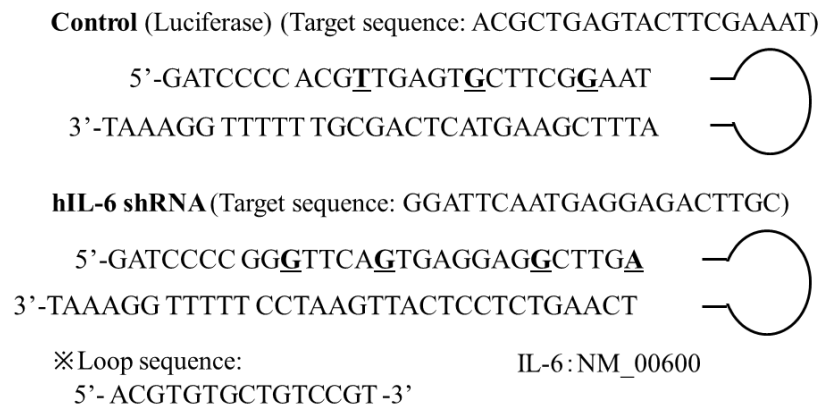


図 10. 標的とする遺伝子配列と shRNA の遺伝子配列

### 2.2.14. PDAC 患者における神経浸潤の放射線学的評価

本検討の対象患者は、病理学的に進行膵がんと診断され、国立がん研究センター東病院にて 2008 年 6 月から 2011 年 3 月までに治療された 46 人の患者であり、患者背景は以下の通りである [男性/女性 = 18/28 人、年齢中央値 (範囲) = 65.5 (44-85) 歳、原発巣部位 (頭部/体部/尾部) = 21/20/5 人]。血清中の IL-6 と sIL-6R の濃度は ELISA 法を用いて測定された。CT 画像における神経浸潤の重症度による分類は、先行研究 (21) と同様に行った。その概略は、

National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology: Pancreatic Adenocarcinoma (42) に従い、神経浸潤の重症度は、上腸間膜動脈 (SMA) 及び腹腔動脈 (CeA) 周囲の血管周囲脂肪組織 (PVST) の進行度に従って高度神経浸潤と低度神経浸潤に分類した。低度神経浸潤は、PVST によって SMA と CeA のいずれも完全に囲まれていない状態であり、高度神経浸潤は、PVST によって SMA もしくは CeA が完全に囲まれた状態と定義した。なお、本研究における患者検体や患者情報の利用については、国立がん研究センター倫理審査委員会にて承認されている (K2011-001)。

#### **2.2.15. 免疫染色に用いた PDAC 患者の検体**

1992 年 9 月から 2004 年 1 月までの間に国立がん研究センター東病院で膵十二指腸切除術が行われた PDAC 患者から得られた検体を使用した。各検体は、免疫染色用に膵頭神経叢の長軸方向に沿って薄切した。

#### **2.2.16. 統計学的解析**

データは、特に明記しない限り、平均値±標準偏差 (SD) で表現した。2 群間の有意差検定には、両側検定で対応のない Student's t-test を用いた。3 群以上の検定には、ANOVA with a post hoc test を用いた。PDAC 患者の全生存期間 (OS) の比較には、log-rank 検定を用いた。PDAC 患者の生存期間中央値は、95% 信頼区間 (CI) と共に計算され、95% CI は Brookmeyer



and Crowley 法を用いて決定された。P < 0.05 を有意差ありと判断した。統計解析は、JMP® version 11 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて実施した。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. *In vitro* 実験における IL-6 superfamily のヒト膵がん細胞株の浸潤に対する刺激活性

Capan-1 と BxPC-3 において、IL-6R、OSMR、LIFR の明らかな mRNA 発現が認められた (図 11)。

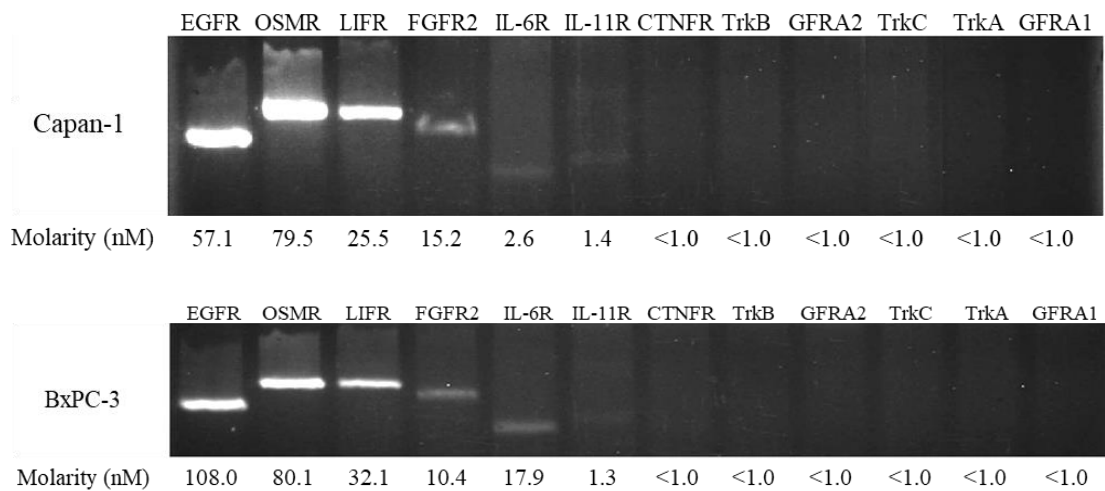


図 11. Capan-1 と BxPC-3 における神経栄養因子関連受容体の遺伝子発現  
上段：Capan-1、下段：BxPC-3。mRNA 発現はモル濃度 (nM) で表記した。

受容体の mRNA 発現が認められた IL-6、LIF、OSM の刺激活性を調べるために、それぞれのリコンビナントタンパク質を用いて、膵がん細胞株である Capan-1 と BxPC-3 において wound healing assay や chemotaxis assay を行った。その結果、IL-6 superfamily の中でも、IL-

6 が Capan-1・BxPC3 の両方の膵がん細胞株において最も強く細胞の遊走及び化学遊走を促進した。それぞれの実験の結果を以下に示す。

Wound healing assay : 1 ng/mL vs. 10 ng/mL vs. 100 ng/mL (mean  $\pm$  SD): IL-6 43.33  $\pm$  89.08 mm vs. 246.39  $\pm$  127.46 mm vs. 319.72  $\pm$  117.87 mm,  $F(2, 30) = 15.509, p < 0.0001$ ; LIF 42.22  $\pm$  80.47 mm vs. 168.89  $\pm$  158.27 mm vs. 128.89  $\pm$  98.36 mm,  $F(2, 24) = 2.748, p = 0.084$ ; OSM 197.78  $\pm$  72.13 mm vs. 241.11  $\pm$  62.41 mm vs. 251.11  $\pm$  90.80 mm,  $F(2, 24) = 1.251, p = 0.304$  (図 12)。

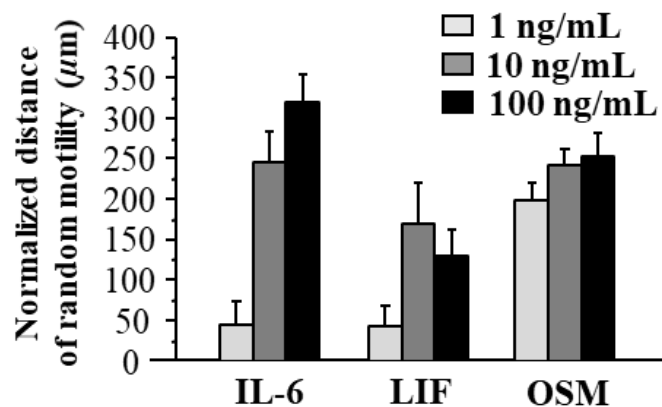


図 12. Capan-1 における IL-6 superfamily の Wound healing assay

それぞれの結果はリコンビナントタンパク質を添加していない群の結果で標準化したものを示している。各群  $n=9$  で実施した。エラーバーは SD を示している。

Chemotaxis assay : 1 ng/mL vs. 10 ng/mL vs. 100 ng/mL (mean  $\pm$  SD): Capan-1, IL-6 0.40  $\pm$  1.30 cells vs. 4.20  $\pm$  1.14 cells vs. 7.20  $\pm$  2.30 cells,  $F(2, 12) = 20.988, p = 0.0001$ , LIF 2.33  $\pm$  3.21 cells vs. 2.67  $\pm$  1.53 cells vs. 0.00  $\pm$  1.00 cells,  $F(2, 6) = 1.390, p = 0.319$ , OSM 0.33  $\pm$  0.00 cells vs. -0.67  $\pm$  0.00 cells vs. 0.33  $\pm$  1.00 cells,  $F(2, 6) = 3.000, p = 0.125$  (図 13)。BxPC-3, IL-6 -1.00  $\pm$  0.89 cells

vs.  $2.80 \pm 4.09$  cells vs.  $9.40 \pm 6.34$  cells,  $F(2, 12) = 7.199$ ,  $p = 0.009$ , LIF  $0.33 \pm 0.58$  cells vs.  $-0.33 \pm 0.58$  cells vs.  $0.00 \pm 1.00$  cells,  $F(2, 6) = 0.600$ ,  $p = 0.579$ , OSM  $0.33 \pm 2.65$  cells vs.  $2.00 \pm 0.58$  cells vs.  $3.67 \pm 2.89$  cells,  $F(2, 6) = 1.596$ ,  $p = 0.278$  (図 14)。

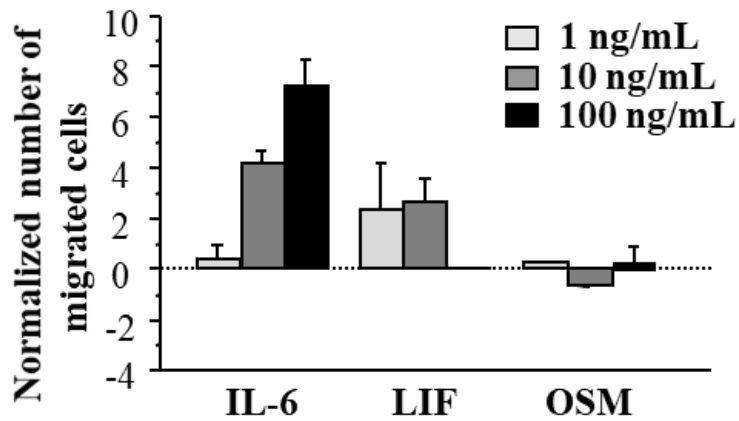


図 13. Capan-1 における IL-6 superfamily の chemotaxis assay  
それぞれの結果はリコンビナントタンパク質を添加していない群の結果で標準化したものを示している。各群  $n=9$  で実施した。エラーバーは SD を示している。

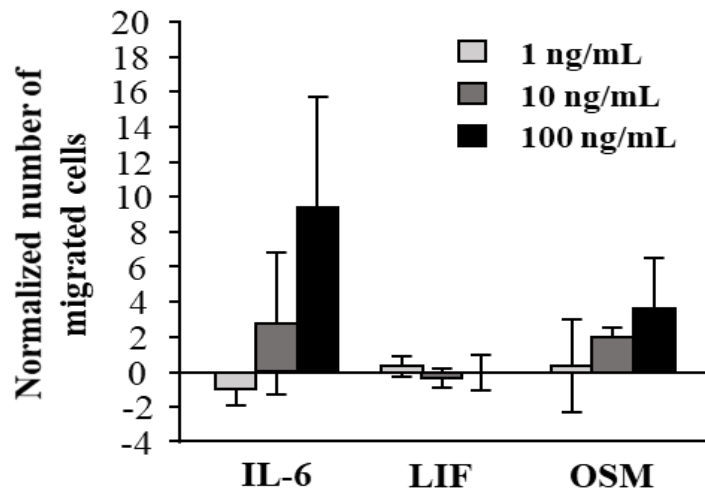


図 14. BxPC-3 における IL-6 superfamily の chemotaxis assay  
それぞれの結果はリコンビナントタンパク質を添加していない群の結果で標準化したものを示している。各群  $n=9$  で実施した。エラーバーは SD を示している。

また、図 15 に示すように、Capan-1 における IL-6 による刺激のシグナル活性への影響は、刺激開始から 15 分後に最も強く現れることがわかった (0 min vs. 5 min vs. 15 min vs. 60 min vs. 8 h vs. 24 h: 1.00 vs. 1.59 vs. 2.65 vs. 1.52 vs. 0.92 vs. 1.15; 図 15)。

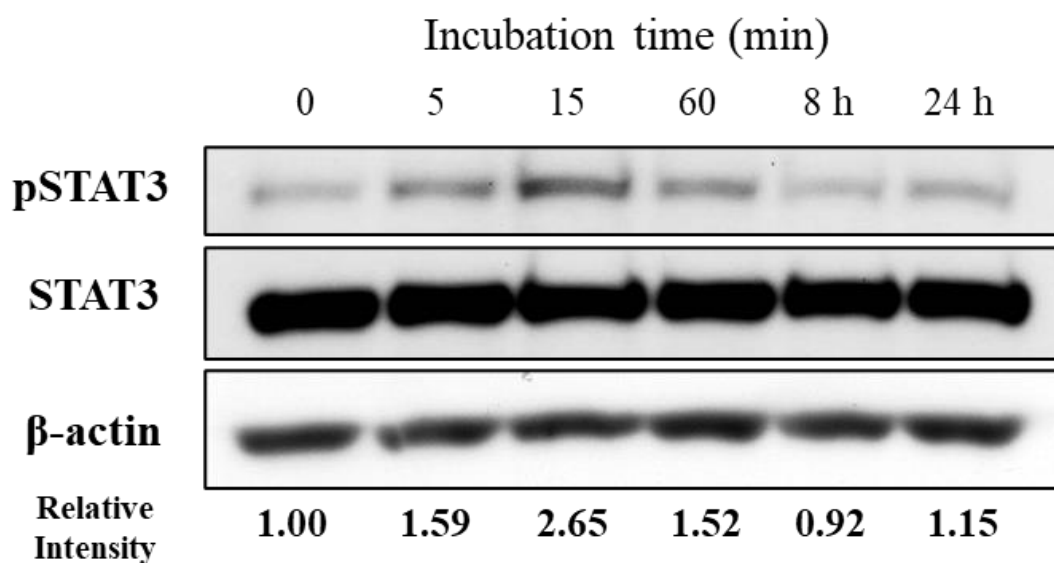


図 15. Capan-1 の IL-6 刺激条件下における p-STAT3 のウェスタンブロットの結果  
細胞は 24 時間血清飢餓状態にした後、IL-6 (10 ng/mL) を含む培地を添加して、図中に示した時間に細胞懸濁液を採取した。0 分時点は、リコンビナントタンパク質を含まない培地を添加した。p-STAT3 の量を total STAT3 に対して相対的に定量した結果をバンドの下部に示した。

ヒト PBMC は、細胞膜表面に IL-6R と gp130 を発現していることが知られており (43)、抗 IL-6R 抗体と抗 gp130 抗体が機能していることを PBMC の FACS の結果から確認した (図 16)。

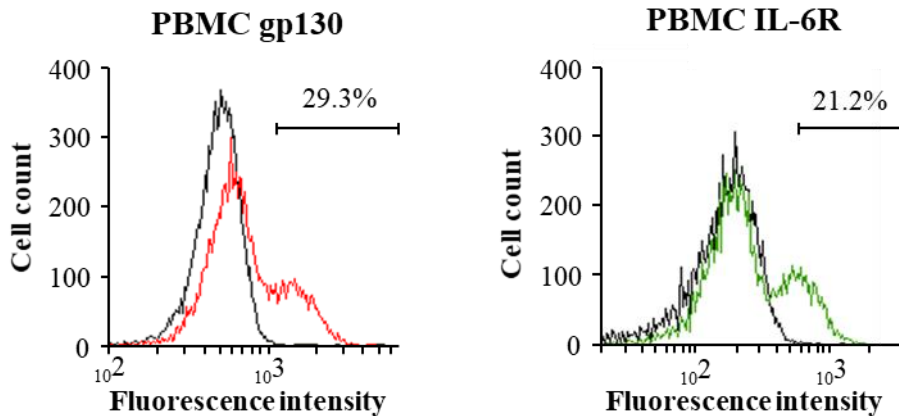


図 16. PBMC の細胞膜表面における gp130 と IL-6R の発現  
 黒線：Isotype control、赤線：gp130、緑線：IL-6R

Capan-1 の細胞膜表面では、gp130 は検出されたが、IL-6R は検出されなかった (図 17)。

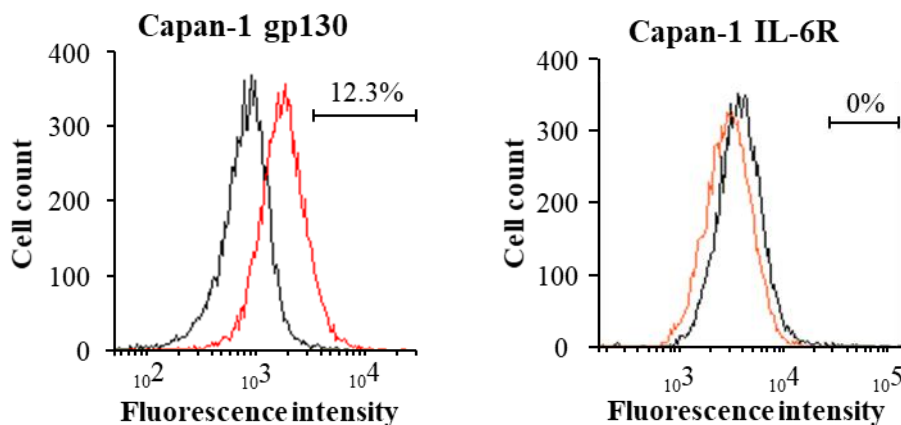


図 17. Capan-1 の細胞膜表面における gp130 と IL-6R の発現  
 黒線：Isotype control、赤線：gp130、オレンジ線：IL-6R

膜結合型 IL-6R が Capan-1 の細胞膜上に検出されなかったため、IL-6 の細胞内シグナル伝達は、sIL-6R を介することが予想された。そこで、Capan-1 からの IL-6 及び sIL-6R の分泌を確認するために、Capan-1 の細胞培養液中の IL-6 と sIL-6R の濃度を ELISA 法にて測定

した。その結果、IL-6 と sIL-6R の濃度は、それぞれ  $80.27 \pm 0.92$  pg/mL と  $3.72 \pm 0.22$  pg/mL と検出可能であった。さらに、IL-6 と sIL-6R のリコンビナントタンパク質による共刺激は、Capan-1 の遊走を有意に促進した (IL-6 + sIL-6R vs. control:  $43.26 \pm 12.88$  vs.  $35.02 \pm 7.52$ ,  $p = 0.012$ ; 図 18)。

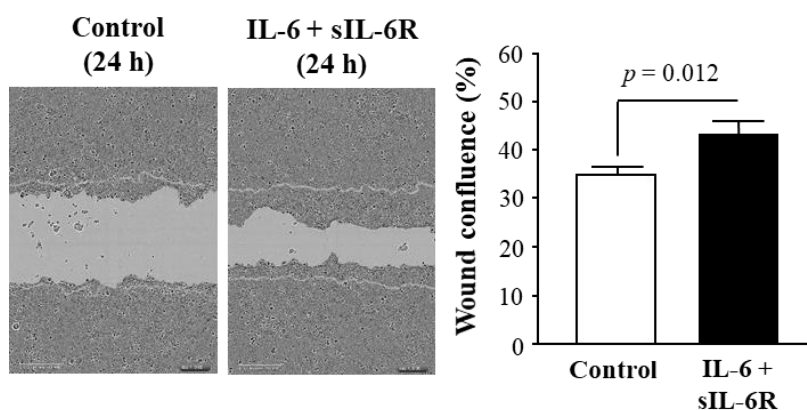


図 18. Capan-1 における IL-6+sIL-6R 刺激による Wound healing assay

左：刺激開始から 24 時間後の各群の無細胞域の様子 (対物 10 倍)。Control はリコンビナントタンパク質無添加培地とした。右：無細胞域の細胞占有割合 (%) を比較したグラフ。エラーバーは SD を示している。

### 2.3.2. N-inv モデルにおける IL-6 と p-STAT3 の発現

図 19 は、腫瘍細胞移植後 35 日目の N-inv モデルの環状 T<sub>2</sub> 強調 FSE-MRI 画像である。環状 T<sub>2</sub> 強調画像における腫瘍の長軸方向のサイズは、3 匹のマウスの平均値として、移植後 21 日目に  $3.20 \pm 0.65$  mm、28 日目に  $5.55 \pm 1.25$  mm、35 日目に  $8.17 \pm 1.09$  mm であった (図 13、図 20)。

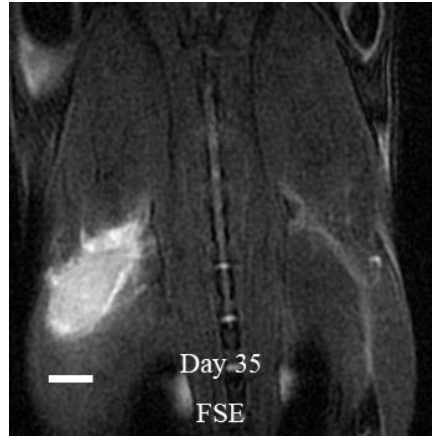


図 19. 移植後 35 日目の神経内腫瘍の環状 FSE 画像  
スケールバーは 2 mm を示している。

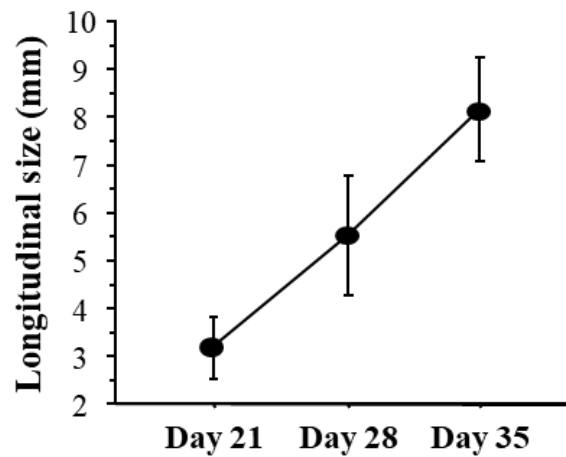


図 20. N-inv モデルにおける腫瘍細胞移植後の腫瘍の長軸方向の大きさの経時的変化  
エラーバーは SD を示している。

N-inv モデル (n = 8) と SC モデル (n = 6) におけるヒト IL-6 とマウス IL-6 の血清中濃度を各モデル作製 28 日後の血清サンプルを用いて ELISA 法にて測定した。その結果、ヒト IL-6 の血清中濃度は、SC モデルと比較して N-inv モデルでは有意に高かった (N-inv vs. SC =  $0.485 \pm 0.300$  vs.  $0.023 \pm 0.038$  pg/mL,  $p = 0.004$ , 図 21) 。一方、マウス IL-6 の血清中濃度

は、N-inv モデル、SC モデル、PBS モデル (n = 4) の 3 群間に有意な差は認められなかった (N-inv vs. SC vs. PBS =  $0.005 \pm 0.009$  vs.  $0.001 \pm 0.002$  vs.  $0.006 \pm 0.012$  pg/mL、 $F(2, 15) = 0.524$ 、 $p = 0.603$ )。

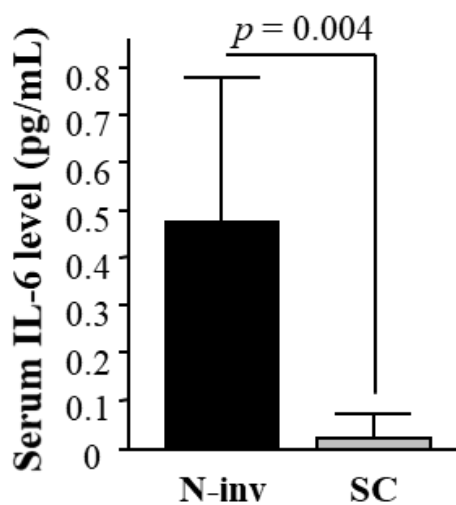


図 21. N-inv モデルと SC モデルにおける血清 IL-6 濃度の比較  
エラーバーは SD を示している。

モデル作製後 28 日目において、N-inv モデル (n = 7) の腫瘍の IL-6 mRNA 相対発現量は、SC モデル (n = 6) の腫瘍と比較して、有意に高かった (N-inv tumor vs. SC tumor =  $2.289 \pm 1.048$  vs.  $0.656 \pm 0.512$ 、 $p = 0.002$ 、図 22)。



## IL-6 mRNA level

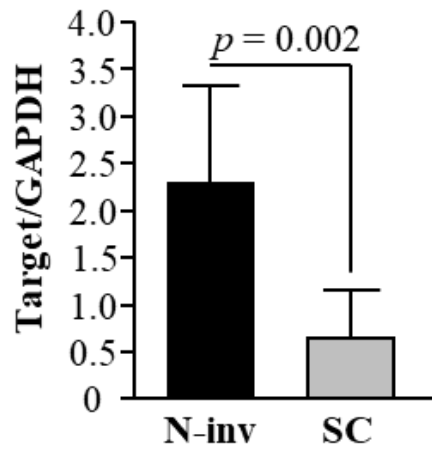


図 22. N-inv モデルと SC モデルの腫瘍における IL-6 mRNA 相対発現量の比較  
IL-6 の mRNA 発現量は、GAPDH に対する相対発現量として算出した。エラーバーは SD を示している。

N-inv モデルの腫瘍の近位側で IL-6 タンパク質の明らかな発現が認められた (図 23)。

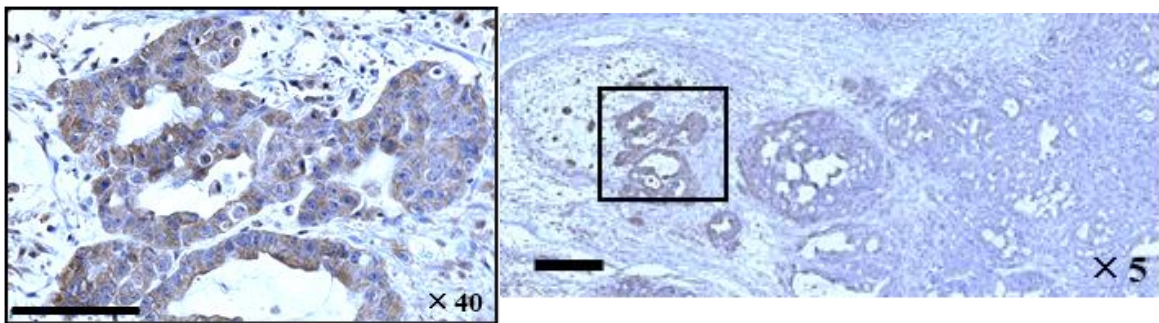


図 23. N-inv モデルの腫瘍先進部における IL-6 タンパク質発現  
左図は、対物 40 倍の顕微鏡画像であり、スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示している。右図は、対物 5 倍の顕微鏡画像であり、スケールバーは 250  $\mu\text{m}$  を示している。

N-inv モデルの腫瘍の中核側先進部における IL-6 シグナル活性を検討するために、モデル作製 28 日後の N-inv モデル (n = 33) の腫瘍における p-STAT3 陽性パターンについて免疫

染色法を用いて検討した。その結果、p-STAT3 LIの平均値は、中枢測で  $7.391 \pm 9.734\%$ 、末梢測で  $1.819 \pm 2.782\%$  であり、中枢測で有意に高いことが明らかとなった ( $p = 0.032$ 、図 24)。

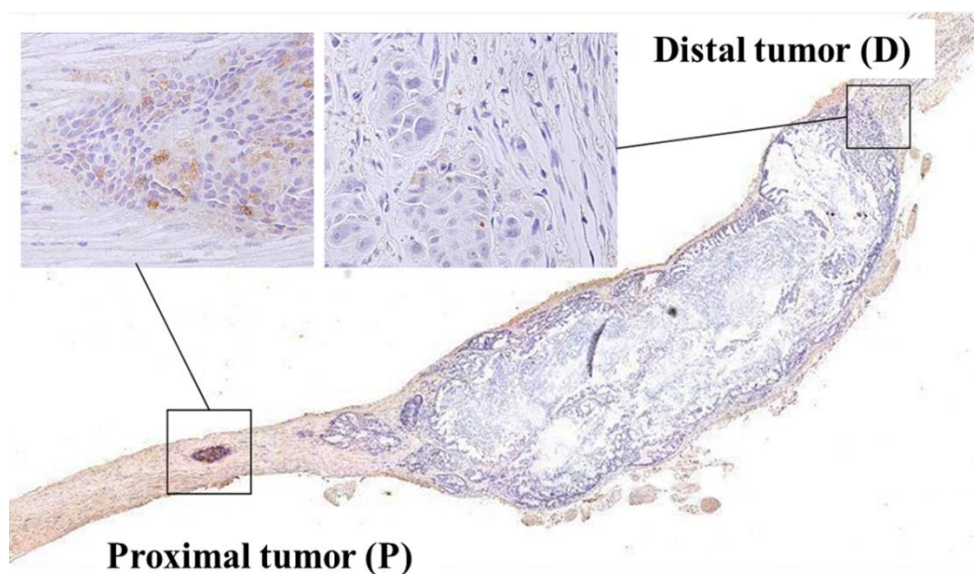


図 24. N-inv モデルの腫瘍の中枢側・末梢側の先進部における p-STAT3 陽性パターン  
左上小図の茶色の部分が p-STAT3 陽性の部分を表している。

N-inv モデルに対する JAK2 阻害薬 AG490 の投与による腫瘍部位の p-STAT3 と腫瘍浸潤への影響を検討するために、N-inv モデルに対して、AG490 を投与した群 ( $n = 6$ ) と DMSO を投与した群 ( $n = 4$ ) の p-STAT3 LI 平均値と腫瘍重量を比較した。その結果、AG490 投与群における p-STAT3 LI 平均値は、DMSO 投与群と比較して有意に低かった (AG490 vs. DMSO =  $1.526 \pm 0.924$  vs.  $9.728 \pm 4.184\%$ 、 $p = 0.001$ 、図 25)。腫瘍重量は、AG490 投与群が DMSO 投与群と比較して低い傾向が認められた (AG490 vs. DMSO =  $0.027 \pm 0.020$  vs.  $0.072 \pm 0.060$

g、 $p = 0.119$ 、図 26)。さらに、AG490 投与による神経浸潤距離への影響を検討する目的で実施した AG490 の追加実験では、AG490 投与群 ( $n = 7$ ) は、DMSO 投与群 ( $n = 7$ ) と比較して、浸潤距離が有意に短いことが明らかとなった (AG490 vs. DMSO =  $2.750 \pm 1.614$  vs.  $5.143 \pm 1.380$  mm、 $p = 0.011$ 、図 27)。

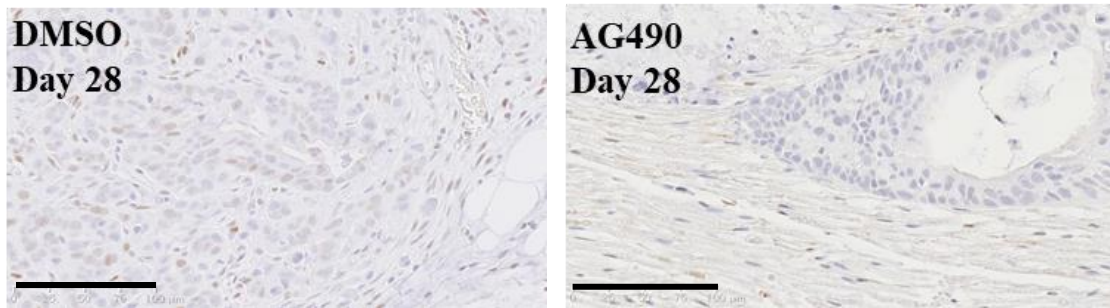


図 25. AG490 投与による N-inv モデルの腫瘍近位側先進部の p-STAT3 発現抑制  
スケールバーは  $100 \mu\text{m}$  を示している。

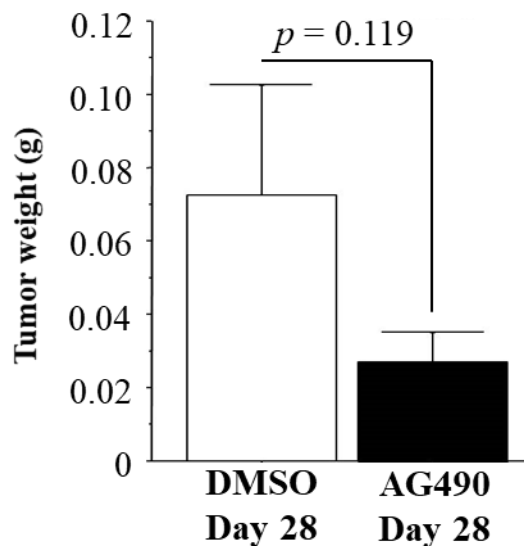


図 26. AG490 投与による N-inv モデルの神経内腫瘍重量の増加抑制  
エラーバーは SD を示している。

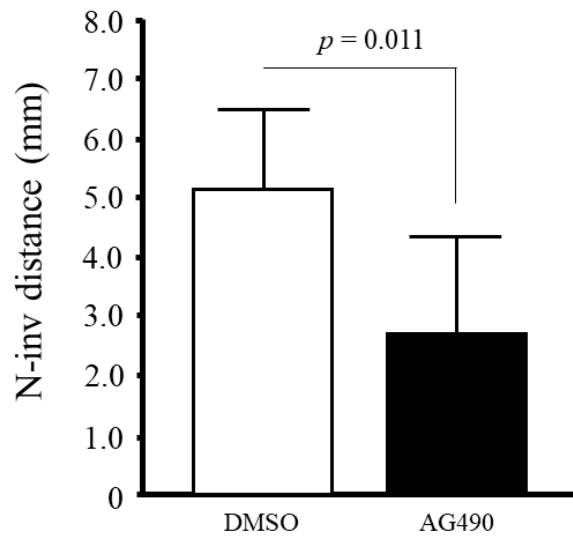


図 27. AG490 による N-inv モデルの神経浸潤の抑制  
エラーバーは SD を示している。

### 2.3.3. IL-6 shRNA の N-inv モデルへの影響

樹立した Capan-1 IL-6 shRNA クローンは、コントロールである Capan-1 luciferase shRNA クローンと比較して、ヒト IL-6 mRNA 発現が有意に低いことが確認され、IL-6 shRNA による RNA 干渉効果が得られていることが確認できた (感染 24 時間後の平均 RNA 干渉率 = 99%、図 28)。樹立したそれぞれのクローンを用いて N-inv モデルを作製した場合、モデル作製 14 日後の神経浸潤は、Capan-1 IL-6 shRNA クローンでは抑制されていた [IL-6 shRNA vs. control shRNA (mean): 1.7 vs. 4.2 mm、 $p = 0.070$ 、図 29]。

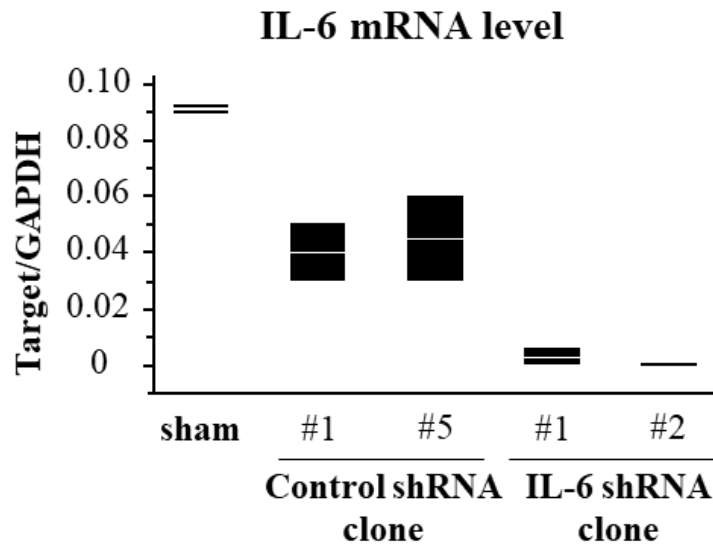


図 28. Capan-1 における IL-6 shRNA による IL-6 mRNA 発現抑制効果  
IL-6 の mRNA 発現量は、GAPDH に対する相対発現量として算出した。

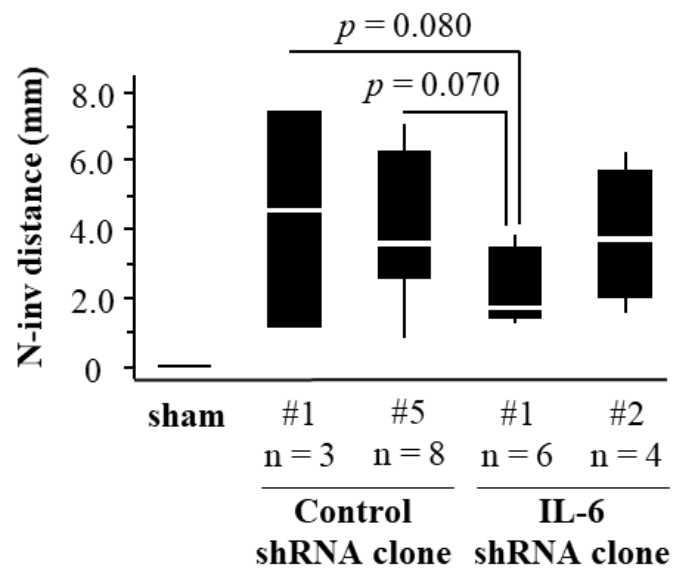


図 29. IL-6 shRNA による N-inv モデルの神経浸潤の抑制効果

#### 2.3.4. IL-6R と gp130 に対する RNA 干渉の細胞表面の受容体発現と N-inv モデルへの影響

トランスフェクション試薬を用いて、IL-6R、gp130 のそれぞれの siRNA と negative

control siRNA を Capan-1 へ導入した。IL-6R siRNA 導入 Capan-1 と gp130 siRNA 導入 Capan-1 は、control siRNA 導入 Capan-1 と比べて、標的 mRNA 発現がそれぞれ低いことがわかり、各 siRNA によって良好な RNA 干渉効果が得られていることを確認した [siRNA 導入後 24 時間後の RNA 干渉率：IL-6R = 74% (図 30)、gp130 = 48% (図 31、図 32)]。IL-6R、gp130、negative control それぞれの siRNA 導入 Capan-1 を用いて N-inv モデルを作製したところ、モデル作製 14 日後の神経浸潤は、IL-6R、gp130 いずれの siRNA 導入 Capan-1 も control siRNA 導入 Capan-1 と比較して抑制される傾向が認められた [targeted-RNAi vs. RNAi negative control (mean  $\pm$  SD): IL-6R RNAi 2.719  $\pm$  1.880 mm vs. 4.688  $\pm$  2.459 mm,  $p = 0.250$ ; gp130 RNAi 2.219  $\pm$  1.996 mm vs. 4.206  $\pm$  0.874 mm,  $p = 0.118$ ; 図 33]。

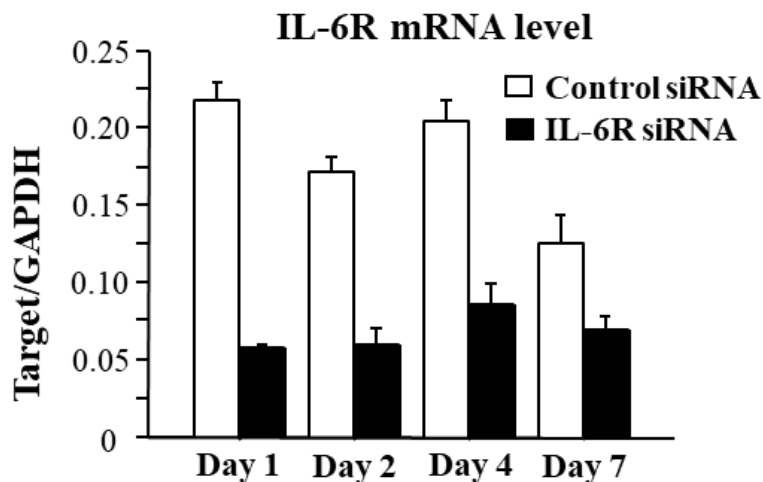


図 30. Capan-1 における IL-6R siRNA による IL-6R mRNA 発現抑制

各測定は  $n = 5$  で行った。IL-6R の mRNA 発現量は、GAPDH に対する相対発現量として算出した。エラーバーは SD を示している。Targeted-RNAi vs. RNAi control (mean  $\pm$  SD); Day1 0.057  $\pm$  0.004 vs. 0.217  $\pm$  0.012,  $p = 0.003$ ; Day2 0.060  $\pm$  0.010 vs. 0.172  $\pm$  0.009,  $p = 0.007$ ; Day4 0.086  $\pm$  0.013 vs. 0.204  $\pm$  0.014,  $p = 0.013$ ; Day7 0.069  $\pm$  0.009 vs. 0.125  $\pm$  0.018,  $p = 0.061$ .

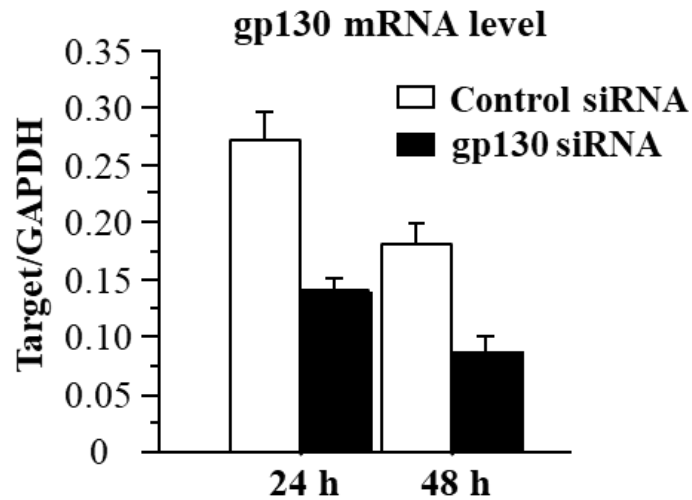


図 31. Capan-1 における gp130 siRNA による IL-6R mRNA 発現抑制

各測定は  $n = 5$  で行った。gp130 の mRNA 発現量は、GAPDH に対する相対発現量として算出した。エラーバーは SD を示している。Targeted-RNAi vs. RNAi control (mean  $\pm$  SD); 24h  $0.140 \pm 0.012$  vs.  $0.271 \pm 0.027$ ,  $p = 0.024$ ; 48h  $0.087 \pm 0.014$  vs.  $0.181 \pm 0.018$ ,  $p = 0.028$ .

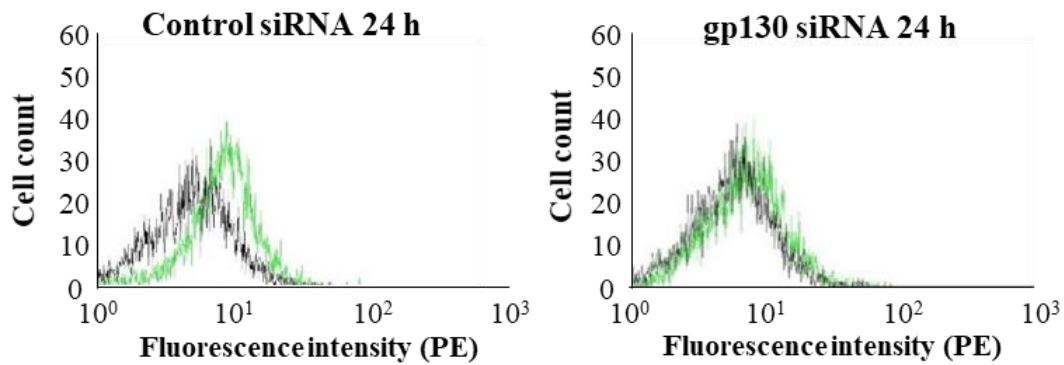


図 32. Capan-1 における gp130 siRNA による細胞膜表面の gp130 発現抑制

左図が Control siRNA、右図が gp130 siRNA を導入した Capan-1 の細胞膜表面の gp130 発現の FACS データをヒストグラムで表現したものである。黒線：Isotype control、緑線：gp130。

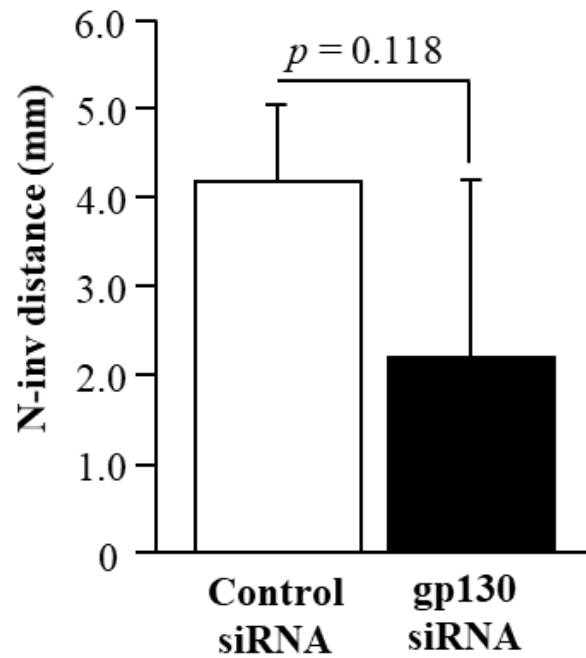


図 33. gp130 siRNA による N-inv モデルの神経浸潤の抑制効果  
各群 n = 5 で実施した。エラーバーは SD を示している。

### 2.3.5. 抗 IL-6 抗体の N-inv モデルへの影響

トシリズマブは、抗ヒト IL-6R 抗体であり、sIL-6R と膜結合型 IL-6R の両方を介する IL-6 シグナルに対する阻害作用を有する (44)。トシリズマブ投与群は IgG 投与群と比較して、モデル作製 21 日後の神経浸潤が抑制される傾向が認められた (IgG vs. anti-IL-6R antibody =  $7.375 \pm 2.823$  vs.  $4.479 \pm 2.442$  mm、 $p = 0.122$ 、図 34)。一方で、マウス IL-6R に対する特異抗体をモデル作製 7 日後から 21 日後まで週 2 回腹腔内投与した実験では、抗マウス IL-6R 抗体投与群は、コントロールの rat IgG 投与群と比較して、神経浸潤を抑制することができなかった (rat IgG vs. anti-mouse IL-6 antibody =  $0.865 \pm 0.623$  vs.  $1.561 \pm 0.755$  g、 $p = 0.173$ )。



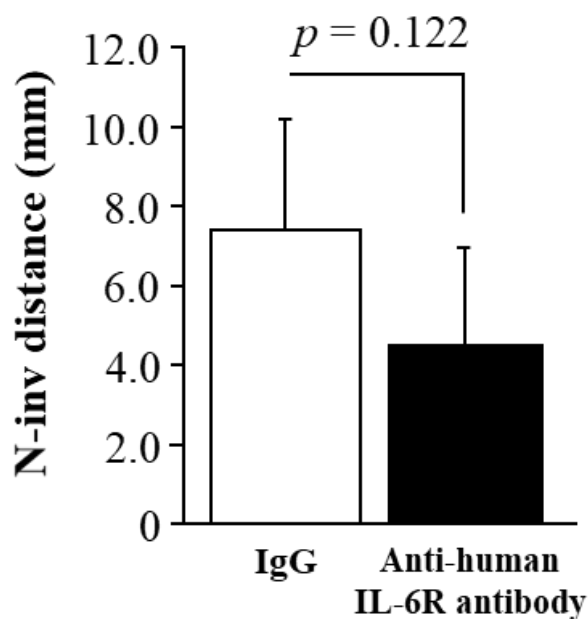


図 34. 抗 IL-6R 抗体 による N-inv モデルの神経浸潤の抑制効果  
エラーバーは SD を示している。

### 2.3.6. PDAC 患者における神経浸潤と血清中 IL-6 濃度

CT 画像における SMA と CeA の PVST の進行度は、臨床的に神経浸潤の重症度を反映することが報告されている (45)。本研究では、神経浸潤の程度を SMA と CeA の PVST の進行度を指標として、46 人の進行 PDAC 患者の CT 画像で評価した。対象患者のうち、21 人が高度神経浸潤群 [男性/女性 = 8/13 人、年齢中央値 (範囲) = 65 (55-79) 歳、原発巣部位 (頭部/体部/尾部) = 10/10/1 人]、25 人が低度神経浸潤群 [男性/女性 = 10/15 人、年齢中央値 (範囲) = 67 (44-85) 歳、原発巣部位 (頭部/体部/尾部) = 11/10/4 人] に分類された (図 35)。

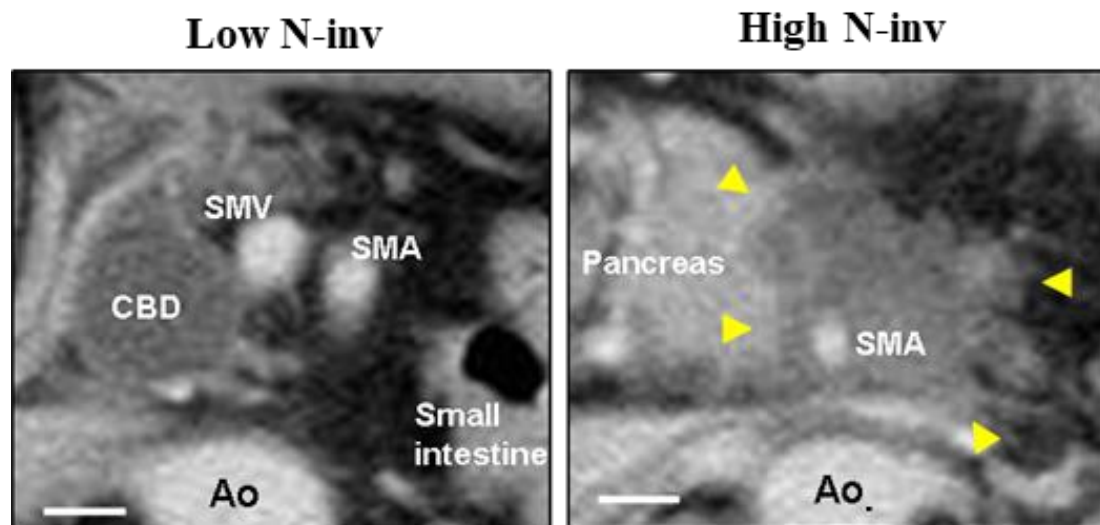


図 35. 各群の膵臓周囲の主要血管における腫瘍浸潤の様子を示す代表画像  
 左図：低度神経浸潤群、右図：高度神経浸潤群。右図の黄色の矢頭は腫瘍の範囲を示している。Ao：腹部大動脈、CBD：総胆管、SMA：上腸間膜動脈、SMV：上腸間膜静脈。

高度な神経浸潤を有する患者の OS は軽度神経浸潤の患者と比較して予後不良であった [OS 中央値 (95% CI)：高度神経浸潤群 vs. 低度神経浸潤群 = 334 日 (289–353 日) vs low N-inv 372 日 (276–519 日),  $p = 0.059$ ; 図 36]。また、高度の神経浸潤は痛みの程度の指標としてのオピオイド使用率の高値と関連することが示唆された (高度神経浸潤群 vs. 低度神経浸潤群 = 33% vs. 16%,  $p = 0.169$ )。

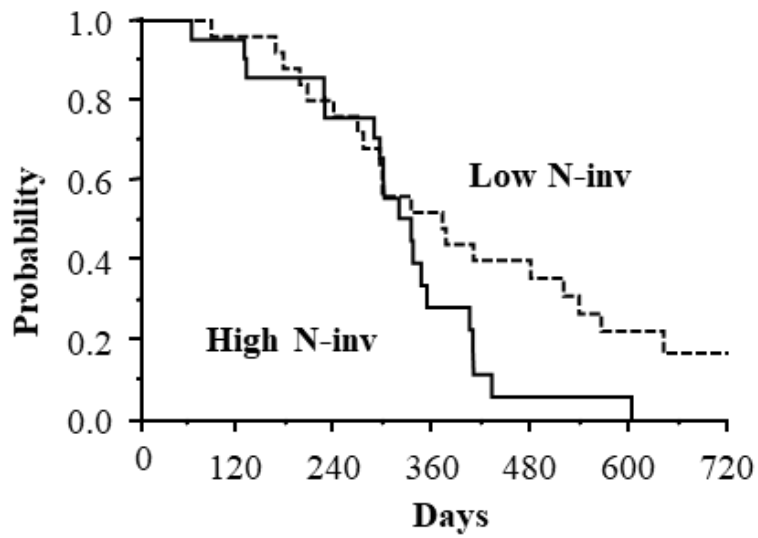


図 36. 神経浸潤の重症度と全生存期間  
 実線：高度神経浸潤群、点線：低度神経浸潤群

全身性炎症反応の指標となる血清 CRP 濃度は、高度神経浸潤群において、低度神経浸潤群と比較して高い傾向があった (高度神経浸潤群 vs. 低度神経浸潤群 =  $1.136 \pm 2.010$  vs.  $0.300 \pm 0.422$  mg/mL、 $p = 0.075$ 、図 37)。

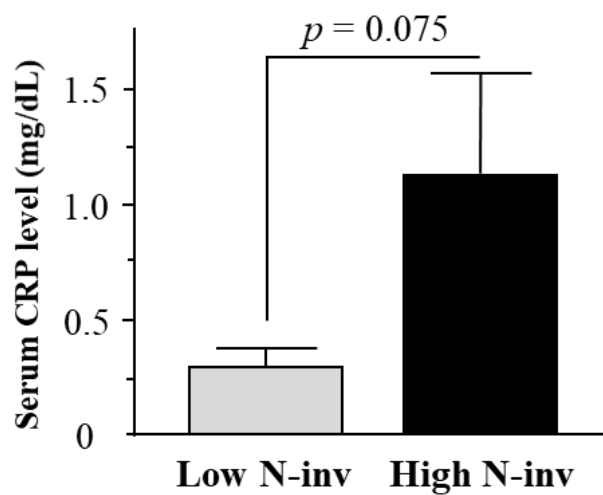


図 37. 神経浸潤の重症度と血清 CRP 濃度 (mg/dL)  
 エラーバーは SD を示している。

血清 IL-6 濃度は、高度神経浸潤群において、低度神経浸潤群と比較して有意に高かった (高度神経浸潤群 vs. 低度神経浸潤群 =  $2.512 \pm 2.345$  vs.  $1.053 \pm 0.707$  pg/mL、 $p = 0.006$ 、図 38)。その一方で、sIL-6R の血清中濃度については両群間で有意な差が認められなかった (高度神経浸潤群 vs. 低度神経浸潤群 =  $24.462 \pm 6.818$  vs.  $25.856 \pm 7.189$  ng/mL、 $p = 0.506$ )。

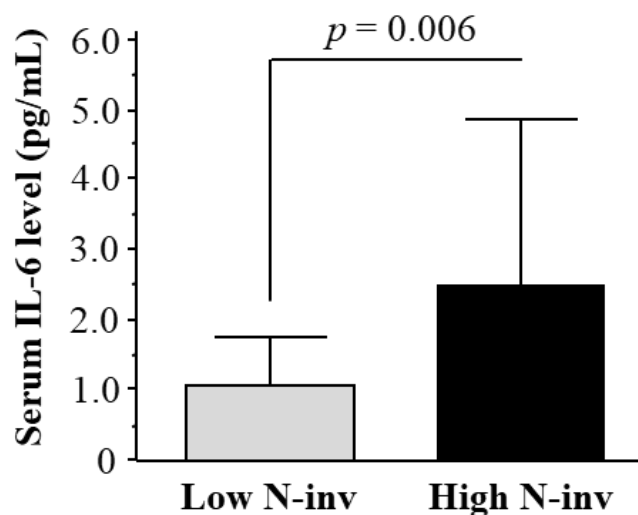


図 38. 神経浸潤の重症度と血清 IL-6 濃度 (pg/mL)  
エラーバーは SD を示している。

腫瘍における gp130 の発現は、膵頭部に原発巣がある PDAC 患者の切除検体において評価された。神経浸潤先進部 (n = 24) における gp130 の陽性面積割合は、原発巣の先進部 (n = 26) と比較して有意に高いことが明らかとなった (神経浸潤先進部 vs. 原発巣先進部 =  $0.342 \pm 0.216$  vs.  $0.204 \pm 0.199$ ,  $p = 0.024$ ; 図 39, 40)。

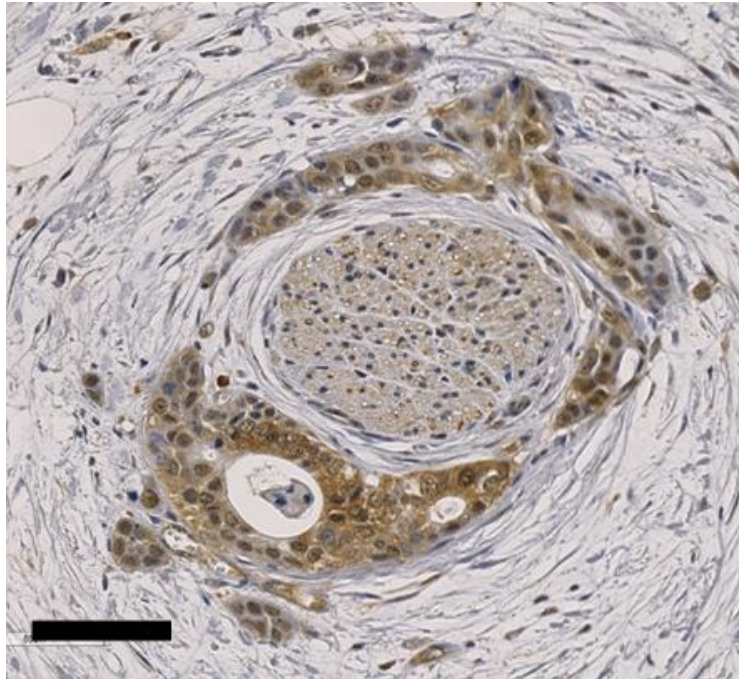


図 39. 患者組織の神経浸潤先進部における gp130 発現  
茶色の部分が gp130 発現陽性の部分を表している。スケールバーは 80  $\mu\text{m}$  を示している。

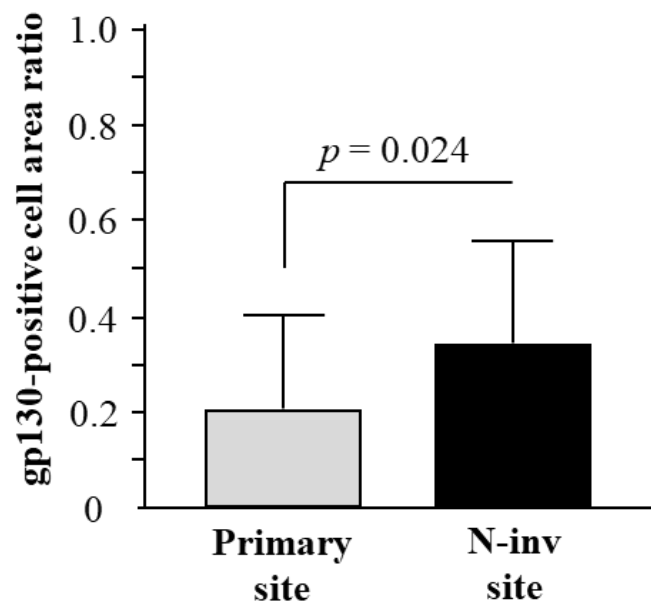


図 40. 原発巣と神経浸潤部の gp130 陽性面積割合の比較  
エラーバーは SD を示している。

## 2.4. 考察

著者は、本研究において初めて IL-6 が膵がん神経浸潤の促進因子であることを同定した。著者が用いた N-inv モデルでは、ヒト膵がん細胞株 Capan-1 由来の IL-6 の分泌が同じ細胞株を皮下移植した時と比較して増加していた。RNA 干渉を用いた膵がん細胞株におけるヒト IL-6 合成阻害やトシリズマブを用いた IL-6/gp130 経路の阻害によって、N-inv モデルの神経内腫瘍の伸展・増殖を抑制することができた。IL-6 は、免疫応答や炎症反応の調節因子として同定された様々な生理活性を有するサイトカインであり (38)、細胞増殖や生存状態の維持、膵がんを含む様々ながんの浸潤促進への関与が報告されている (43、46)。IL-6 の種の交差性として、ヒトの細胞はヒト IL-6 には応答するものの、マウス IL-6 には応答しないことが知られている (47)。これまでの研究では、様々ながん種において、腫瘍由来の IL-6 の存在が報告されている (48、49、50、51)。本研究では、腫瘍細胞由来の IL-6 が膵がん神経浸潤を促進することを示した。

著者が所属する研究グループの先行研究において、PDAC 患者において血清 IL-6 濃度高値が予後不良と血清 CRP 濃度高値に関連することを明らかにしている (44、52)。CRP は、全身性炎症反応を反映し、肝臓で合成される急性反応タンパク質であり (53)、CRP 遺伝子の転写活性は IL-6/JAK/STAT3 経路によって増強される (54、55)。よって、血清 IL-6 濃度高値は、生体内の IL-6 の生物活性が高い状態を意味すると考えられる。本研究では、血清 IL-6 濃度は SC モデルや低度神経浸潤の PDAC 患者と比較して、N-inv モデルや高度神経浸

潤の PDAC 患者において有意に高値であった。また、PDAC 患者の神経浸潤先進部における gp130 タンパク質発現は、原発巣先進部と比較して有意に高いことを明らかにした。IL-6 は JAK/STAT 経路だけでなく、extracellular regulated kinase (ERK)1 や ERK2 のリン酸化を介して mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路も活性化することが知られている (56)。

著者は、Capan-1 において IL-6 刺激によって ERK1/2 のリン酸化が起こることも確認している (図 41)。ERK2 は、*GP130* のプロモーターへ結合することで、転写調節メカニズムと相互作用を起こし、gp130 の発現を増加させることが知られており (57)、gp130 の高発現は IL-6 が利用されやすい環境であることを意味すると同時に、IL-6 シグナル活性が高い可能性が示唆される。そのため、gp130 高発現である神経浸潤先進部では、原発巣先進部と比較して、IL-6 が利用されやすく、IL-6 シグナル活性が高い可能性があると考えられる。著者が用いた N-inv モデルは、PDAC 患者の神経浸潤部における高い IL-6 シグナル活性を再現しているモデルであった。

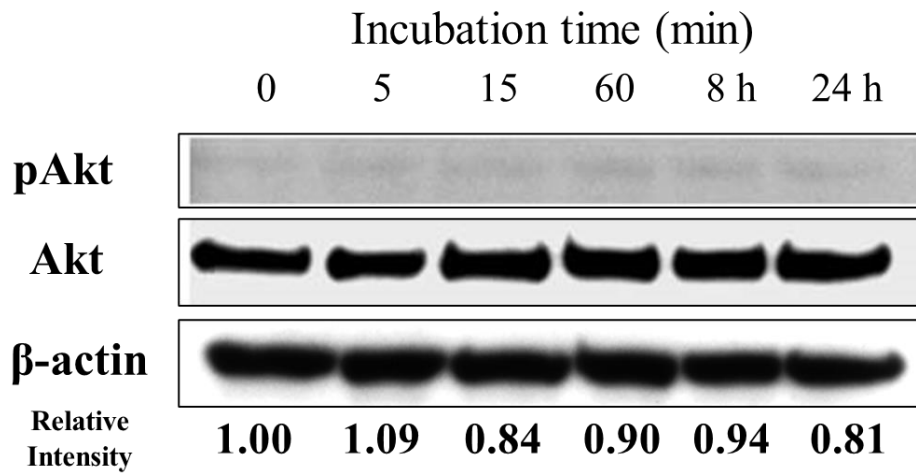
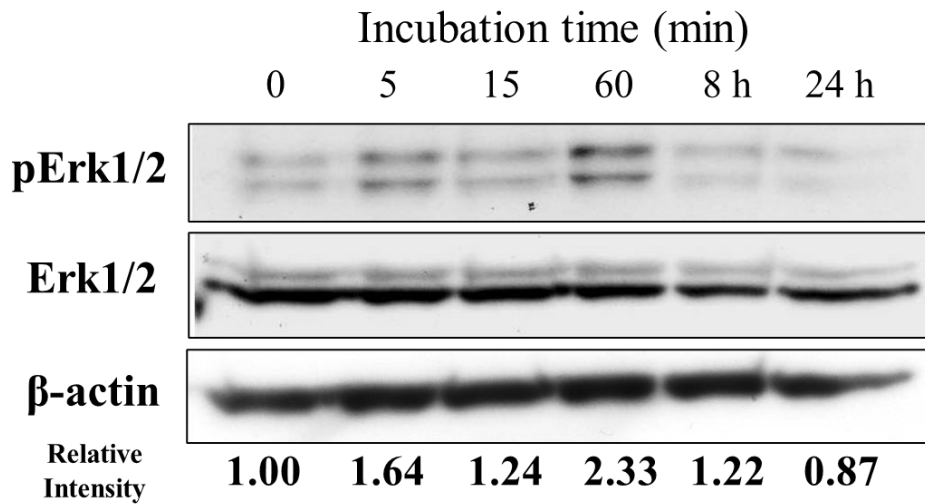


図 41. Capan-1 における IL-6 刺激による Erk1/2 と Akt のリン酸化  
 上段は Erk1/2、下段は Akt のウェスタンブロットの結果。細胞は、24 時間血清飢餓状態で培養した後、IL-6 (10 ng/mL) 刺激を加えて、図中に示した時間で細胞懸濁液を回収する。pErk1/2、p-Akt の量を Erk1/2、Akt に対して相対的に定量した結果をバンドの下部に示した。

IL-6/JAK/STAT3 経路の阻害は、N-inv モデルにおいて腫瘍増殖・浸潤を抑制したため、PDAC の治療ターゲットの候補と考えられる。IL-6/JAK/STAT3 経路の阻害薬であるルキシソリチニブとトシリズマブを含む治療法は、PDAC 患者を対象として過去に臨床試験が実施されている。ルキシソリチニブは、骨髄線維症や真性多血症の治療に用いられる JAK 阻害薬



である (58, 59)。ルキソリチニブは、ゲムシタビン不応でかつ炎症反応が認められた転移性 PDAC 患者を対象とした無作為化二重盲検プラセボ対照第 II 相試験において代謝拮抗薬であるカペシタビンとの併用療法の有効性が検討されている (60)。その結果、ルキソリチニブとカペシタビンの併用療法は、プラセボとカペシタビンの併用療法との比較で、全生存期間を有意に改善することができなかった。gp130 の二量化を阻害する作用を有するトシリズマブは、強い炎症反応が認められた PDAC 患者を対象とした多施設共同非盲検第 I / II 相試験にてゲムシタビンとの併用療法の有効性が検討された (61)。その結果、サブグループ解析にてベースラインの血清 CRP 濃度が 10.6 mg/dL 未満の患者では、過去の試験でゲムシタビン単独療法を受けた PDAC 患者と同程度の生存期間を達成した。これらの結果から、炎症反応を伴う PDAC 患者において IL-6 シグナルを効果的に阻害するには、JAK ではなく、IL-6/gp130 axis を標的にするべきであると考えられる。

膵がん細胞が浸潤する神経周囲腔は様々な神経栄養因子を含む脳脊髄液で満たされている (62, 63, 64, 65)。IL-6 を含むサイトカインは、脈絡叢において上皮細胞や間質細胞を介して、血管からくも膜下腔へ輸送される (66)。腫瘍の神経浸潤先進部では、神経内腫瘍が神経周囲腔を塞ぎ、脳脊髄液の流れを塞ぎ止めている。そのため、脳脊髄液中に含まれる IL-6 は神経浸潤先進部において豊富に存在する可能性がある。さらに、神経周囲腔の腫瘍細胞はほとんどの場合、神経周膜と神経内膜に接しており、周囲をシュワン細胞や線維芽細胞に囲まれている (67, 68)。IL-6 は、腫瘍細胞だけでなく、腫瘍関連線維芽細胞やシュワン

細胞からも分泌されることが知られている (69, 70)。著者が用いた N-inv モデルでは、神経内腫瘍の中枢側に存在するシュワン細胞において、マウス IL-6 が顕著に発現していることを確認している (図 42-44)。従って、PDAC 患者においても神経浸潤する腫瘍細胞は、腫瘍細胞自身と周囲のシュワン細胞の両方から IL-6 を供給されることによって増殖・浸潤が促進されている可能性がある。

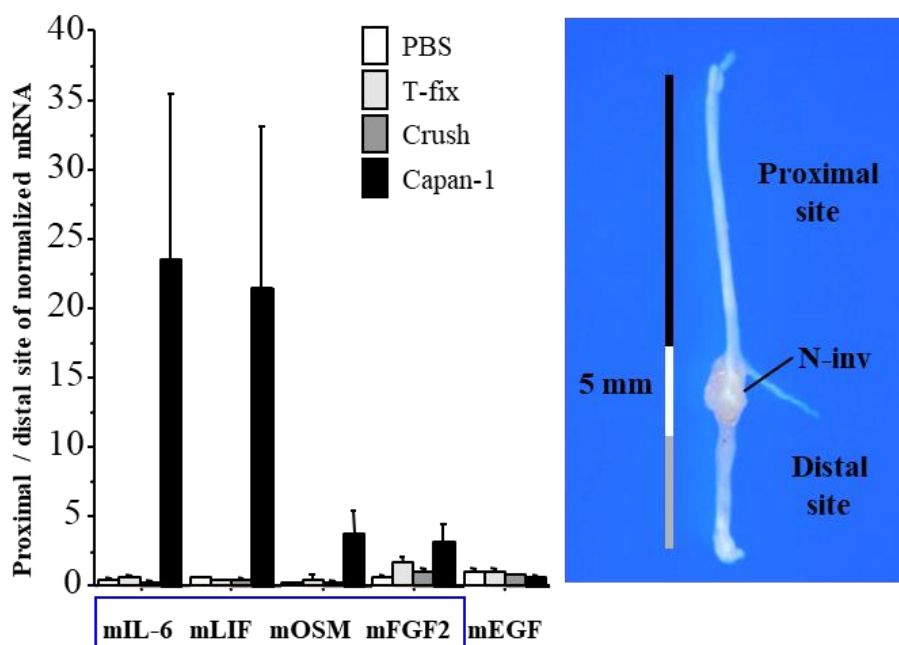


図 42. N-inv モデルの腫瘍周囲の坐骨神経におけるマウスの神経栄養因子の mRNA の近位側/遠位側の発現比

右図は、腫瘍の近位側と遠位側の様子を示している。各 mRNA 発現量は、mouse (m)GAPDH に対する相対発現量として算出した。結果は、遠位側に対する近位側の相対発現量の比で表した。T-fix：坐骨神経に対して 5-0 縫合糸を用いて縫合結紮の処置を施した群、Crush：鉗子を用いて坐骨神経を圧挫損傷した群。PBS vs. T-fix vs. Crush vs. Capan-1 N-inv (mean  $\pm$  SD); mIL-6  $0.44 \pm 0.13$  vs.  $0.66 \pm 0.15$  vs.  $0.22 \pm 0.12$  vs.  $23.65 \pm 11.83$ ; mLIF  $0.67 \pm 0.00$  vs.  $0.41 \pm 0.00$  vs.  $0.44 \pm 0.15$  vs.  $21.39 \pm 11.68$ ; mOSM  $0.20 \pm 0.00$  vs.  $0.45 \pm 0.54$  vs.  $0.29 \pm 0.14$  vs.  $3.80 \pm 1.61$ ; mFGF2  $0.67 \pm 0.14$  vs.  $1.68 \pm 0.44$  vs.  $1.10 \pm 0.14$  vs.  $3.14 \pm 1.24$ ; mEGF  $1.02 \pm 0.12$  vs.  $1.01 \pm 0.13$  vs.  $0.91 \pm 0.00$  vs.  $0.70 \pm 0.12$ .

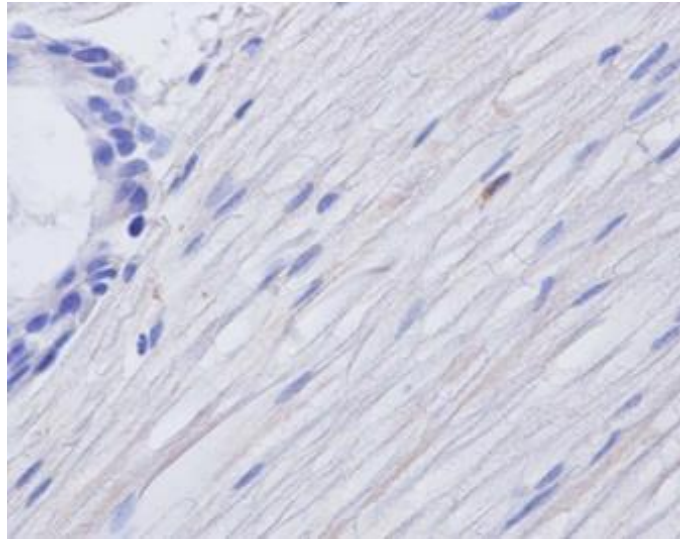


図 43. N-inv モデルの腫瘍における mIL-6 の免疫染色画像  
茶色の部分が mIL-6 発現陽性の部分を表している。対物 40 倍の顕微鏡画像である。

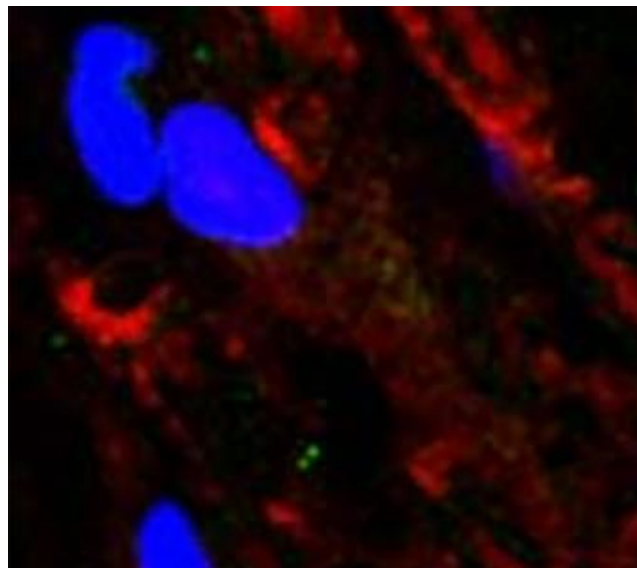


図 44. N-inv モデルの腫瘍における mIL-6 の蛍光免疫染色画像  
緑色 : goat anti-mouse IL-6 polyclonal antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology) with chicken anti-goat IgG (Alexa Fluor® 488; Thermo Fisher Scientific)、赤色 : rabbit anti-S100 antibody (1:100; Agilent, Santa Clara, CA) with donkey anti-rabbit IgG (Alexa Fluor® 555; Thermo Fisher Scientific)、青色 : nuclear DNA labeled with DRAQ5 (1:1000; Cell Signaling Technology Japan)  
対物 60 倍の顕微鏡画像である。

本研究には、深く考察する必要がある点はいくつかある。細胞質の gp130 発現と IL-6 シグナルの生物活性の関係性は、IL-6/sIL-6R 複合体を中和する可溶性 gp130 の増加に影響される可能性がある (38)。可溶性 gp130 は “ng/mL” 単位を超える量で、血中に恒常的に存在することが報告されているが (71)、がんにおいて可溶性 gp130 が評価された報告はほとんどない。IL-6/gp130 axis の活性と可溶性 gp130 の血清中濃度の関係性についてはさらなる検討が必要である。近年、IL-6 superfamily のひとつである LIF が、膵がんにおける神経のリモデリングや腫瘍増殖を促進することが報告された (72, 73)。そのため、神経浸潤の刺激因子には著者が同定した IL-6 だけではなく、LIF も該当する可能性がある。本研究では、膵がん細胞における LIF の刺激活性が LIF の量に依存的でなかったことから、LIF については着目していない。著者が用いた N-inv モデルでは、ヒト膵がん細胞として Capan-1 を用いているが、先行研究において、別のヒト膵がん細胞株である MiaPaCa-2 を用いて N-inv モデルを作製した際には、Capan-1 よりも軽度ではあるが、神経浸潤が認められた (20)。また、MiaPaCa-2 は、パラクラインによって腫瘍の微小環境において LIF を増加させることが報告されていた (72)。そのため、MiaPaCa-2 を用いた N-inv モデルで神経浸潤促進因子について検討した場合、LIF が神経浸潤促進因子となる可能性がある。IL-6 shRNA クローンを用いた神経浸潤距離の検討において、#2 のクローンでは control shRNA クローンと比較して神経浸潤は抑制されなかったが、その原因には、①IL-6 shRNA によるオフターゲット効果 (74)、②shRNA 導入に用いたレンチウイルス感染に対するインターフェロン応答 (75)

が想定される。腫瘍細胞が IL-6 産生を増加させるトリガーとなる事象として炎症反応のループ (Inflammatory loop) を想定しており、IFN が JAK/STAT 経路の活性化を介して、RNAi のターゲットである IL-6 以外の炎症関連分子の産生を促進し (76)、その産生された炎症関連分子によって腫瘍細胞の神経浸潤が促進されている可能性が考えられる。本研究では、①・②の影響について検討してはいないものの、RNAi による IL-6R の発現抑制、IL-6R やその下流の JAK2 を特異的に阻害する薬剤を用いた実験を実施しており、いずれの阻害においても神経浸潤が抑制される傾向があり、IL-6 shRNA クローンを用いた神経浸潤抑制という結果が偶然起きた事象ではないことを裏付けている。一般的に、NCCN ガイドライン (42) における切除可能性は、膵がん患者の CT 画像 における SMA と CeA 周囲の神経浸潤の程度で評価される。しかし、CT 画像における SMA や CeA の周囲の PVST が臨床的な神経浸潤を十分に反映していることから、著者は血清 IL-6 濃度や血清 CRP 濃度と NCCN ガイドラインに基づく切除可能性の関係性について評価しなかった。

## 2.5. 小括

本研究では、IL-6 ががん悪液質との関連が深い膵がんの神経浸潤の刺激因子であることを明らかにした。本研究の結果から、IL-6/gp130/JAK/STAT3 経路が PDAC の治療開発の有効なターゲットである可能性が示唆された。

## 第3章 血清 Growth differentiation factor 15 濃度高値の進行膵がん患者の臨床的特徴と腫瘍の特徴

### 3.1. 緒言

Growth differentiation factor 15 (GDF-15) は transforming growth factor- $\beta$  サブファミリーに分類され、がん (77, 78, 79, 80, 81)、冠血管疾患 (82)、ミトコンドリア病 (83)、甲状腺機能亢進症 (84)、肥満や 2 型糖尿病 (85) のような様々な疾患に関連するストレス応答サイトカインである。GDF-15 は摂食やエネルギー消費、体重の調整を担っている (26, 86)。循環血中の GDF-15 は、脳幹の glial cell-line derived neurotrophic factor family receptor  $\alpha$  like (GFRAL) /RET 受容体複合体に結合し、受容体のリン酸化や下流の細胞内シグナルのトリガーとなる (26)。GFRAL に対するアゴニスト作用とアンタゴニスト作用はそれぞれ食事量の減少と増加に関わる (26)。がん患者における血清 GDF-15 濃度高値は、進行性の骨格筋萎縮を特徴とする複合的な代謝異常と定義される悪液質 (11) の症状である化学療法抵抗性、食欲不振、嘔吐、体重減少との関連性が深い (87, 88, 89, 90)。悪液質は、全身性炎症反応や全身状態の悪化が認められる進行膵がん患者 (52, 91, 92) に良く見られる病態である (93)。これらの情報から、血清 GDF-15 濃度の上昇は、膵がん患者の骨格筋萎縮、全身性炎症反応、全身状態の悪化、食欲不振、予後不良を含む悪液質と関連している可能性がある。

GDF-15 の発現は、殆どの組織で低いレベルで維持されており (94)、炎症、酸化ストレス、低酸素、がん遺伝子の活性化のような様々な細胞ストレスによる p53 の活性化によって増

加することが知られている (95)。膵管内圧が上昇する良性膵疾患は、膵管内圧によるストレスから血清 GDF-15 濃度が増加することが予想され、実際に慢性膵炎患者の血清 GDF-15 濃度 (平均値 : 2248 pg/mL) は健常人 [平均値 : 416.8 pg/mL(31)、546 pg/mL (96)、639 pg/mL (97)] と比較して高い。進行膵がんにおける血清 GDF-15 濃度高値を定義するカットオフ値は、腫瘍以外による GDF-15 への影響をできる限り除外できるような値に設定すべきと考え、良性膵疾患患者を基準として、良性膵疾患患者の血清 GDF-15 濃度の上限値を、進行膵がんにおける血清 GDF-15 濃度のカットオフ値として設定するよう計画した。

Solid stress は、膵がん細胞において Akt 経路の活性化を介して、GDF-15 発現の転写レベルでの制御によって、GDF-15 発現を増加させることが報告されている (32)。Akt 経路が関与するストレス応答経路は、血清 GDF-15 濃度高値の膵がんの腫瘍において強く働いている可能性があり、ストレス応答経路の活性化を検討することは、膵がんにおける血清 GDF-15 濃度のカットオフ値の生物学的バリデーションとして有用である。本研究によって、血清 GDF-15 濃度高値の進行膵がん患者の臨床的特徴や腫瘍の分子生物学的特徴を把握することで、GDF-15 阻害療法の臨床試験構築の基盤情報を得ることができると考える。

本研究では、進行膵がん患者において以下のことを検討する。

- A) 血清 GDF-15 濃度のカットオフ値
- B) 血清 GDF-15 濃度と臨床データの関連性
- C) 血清 GDF-15 濃度高値と関連する腫瘍の分子生物学的特徴

## 3.2. 研究方法

### 3.2.1. 研究倫理

本研究は、国立がん研究センター東病院倫理委員会によって承認されている (2020-373: 進行膵がん患者の悪液質に關与する炎症關連分子の研究)。

### 3.2.2. 対象患者

本研究は、病理学的に診断された肝転移を有する未治療の進行膵がん患者及び良性膵疾患患者で、2011年8月5日から2015年1月7日の間に国立がんセンター東病院にて登録された患者を対象とした。良性膵疾患は、慢性膵炎、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMT)、非浸潤型膵管内乳頭粘液性がん (IPMC)、膵漿液性嚢胞腫瘍 (SCT) とした。インフォームドコンセントは、本研究登録前に対象患者全員から取得した。

### 3.2.3. がん性悪液質とサルコペニアの定義

本研究において、がん性悪液質を体重減少  $> 5\%$  もしくは Body mass index (BMI)  $< 20$  kg/m<sup>2</sup> の患者においては体重減少  $> 2\%$  と定義した (11)。ベースラインの悪液質は、化学療法開始前 6 ヶ月以内に上記の体重減少があったものと定義した。サルコペニアは、日本肝臓学会の診断基準に基づいて診断を行った。日本肝臓学会の診断基準では、サルコペニア



は、握力低下 (男性: < 26 kg、女性: < 18 kg)、筋量低下 (男性: < 42 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>、女性: < 38 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>) と定義されている (98)。筋量については、第 3 腰椎 (L3) の CT 画像における骨格筋量指数 (SMI) を用いて評価した。

#### 3.2.4. 臨床データの収集方法

対象患者の体重、Karnofsky performance status (KPS)、Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status Scale (ECOG-PS)、臨床検査値、食欲不振の重症度 (Japanese version of the MD Anderson Symptom Inventory; MDASI-J) (99)、血液サンプルを化学療法開始前に収集した。MDASI-J は 13 項目 (疼痛、倦怠感、嘔気、睡眠障害、ストレス、息切れ、もの忘れ、食欲不振、眠気、口渇、悲しい気持ち、嘔吐、しびれ) の過去 24 時間に見られた症状について、0 (症状なし) から 10 (想像できる最悪の状態) までの 11 段階の数字で評価する。重度の食欲不振については著者の先行研究に従って、MDASI-J  $\geq 2$  として定義した (100)。CRP の血清中濃度のカットオフ値は、著者の先行研究に基づき、2.0 mg/dL と設定した (52)。腫瘍マーカーのひとつである CA19-9 のカットオフ値は、本研究の対象である進行膵がん患者の血清 CA19-9 濃度の中央値である 4150 U/mL とした。重度の神経叢浸潤の有無は、CT 画像を用いて、第 2 章と同様に行った。

### 3.2.5. ELISA

血液サンプルは一晚絶食した翌朝に血清分離管内に採取し、室温で 30~60 分間放置して完全に凝血させた。凝血させたサンプルは、1500 g、25 °Cで 15 分間遠心分離した後に、血清を分取し、解析に使用するまで -80°Cで凍結保存した。血清 GDF-15 濃度は、ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて、製造会社が提供するプロトコルに従って 2 回ずつ定量的に測定した。

### 3.2.6. タンパク質発現解析

組織は、進行膵がん患者の肝転移巣から超音波内視鏡下穿刺吸引法 (FNAB) にて収集した (101)。組織サンプルは、収集後直ちに NucleoSpin TriPrep kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co.KG, Düren, Germany) の溶解液に入れて、tissue-Lyser II(QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて破碎した。破碎処理後の組織溶解液は、NucleoSpin TriPrep kit でろ過処理した。溶解液は、SDS-PAGE sample prep kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US) を用いて精製後、急速凍結し、使用するまで -80°Cで保存した。組織溶解液の RPPA を用いた解析は、MD アンダーソンがんセンター機能性タンパク質 RPPA コアファシリティで実施された。組織溶解液は、2 倍ずつ 5 段階の希釈 (希釈なし、1:2、1:4、1:8、1:16) を行い、ニトロセルロースでコーティングされたスライド上に並べる (102、103)。435 種類の 1 次抗体で免疫染色された RPPA スライドは、TissueScope scanner (HURON Digital Pathology, Ontario, Canada) にて取り

込まれ、アレイ上のそれぞれのスポットのシグナル強度を、Array-pro Analyzer 6.3 software (MediaCybernetics, Silver Spring, US) にて定量した。その後、それぞれのサンプルにおける分析対象の相対タンパク質レベルを SuperCurve 1.5.0 R package via SuperCurveGUI 2.1.1. を用いて決定した (104)。RPPA 解析の対象サンプルは、 $\beta$ -actin のウェスタンブロットにて再現性の高いバンドが得られたサンプルとした。

### 3.2.7. 統計学的解析

データは、特に明記しない限り、平均値  $\pm$  SD で表現した。連続変数データの比較には、Mann-Whitney U test を用いた。血清 GDF-15 濃度とそれぞれの名義変数の間の関連は、 $\chi^2$  検定または Fisher の正確確率検定を用いた。Fisher の正確確率検定は  $2 \times 2$  の分割表に対して、 $\chi^2$  検定はそれ以外の名義変数の分割表に対して適用した。OS) は初回化学療法もしくは best supportive care (BSC) の開始日を起算日として計算された。無増悪生存期間 (PFS) は化学療法を受けた患者のみを対象に計算し、起算日を初回化学療法の開始日とした。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて描いた。肝転移を有する進行膵がん患者の血清 GDF-15 濃度低値群と高値群の OS や PFS の比較には、log-rank 検定を用いた。 $p < 0.05$  を有意水準として設定した。OS や PFS の中央値は、95% CI と共に計算され、95% CI は Brookmeyer and Crowley 法を用いて決定された。統計解析は、JMP<sup>®</sup> version 11 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. 血清 GDF-15 濃度のカットオフ値

本研究の CONSORT ダイアグラムを図 45 に示す。本研究では、合計 120 人の患者を研究対象として解析を行い、そのうち 99 人が肝転移を有する進行膵がん患者 [男性/女性 = 61/38 人、年齢中央値 (範囲) = 66.2 (39-85) 歳] であり、残りの 21 人が良性膵疾患患者 [男性/女性 = 11/10 人、年齢中央値 (範囲) = 69.0 (51-81) 歳] である。良性膵疾患患者の内訳は、慢性膵炎 4 人 (19.1%)、IPMT 15 人 (71.4%)、SCT 2 人 (9.5%) であった。

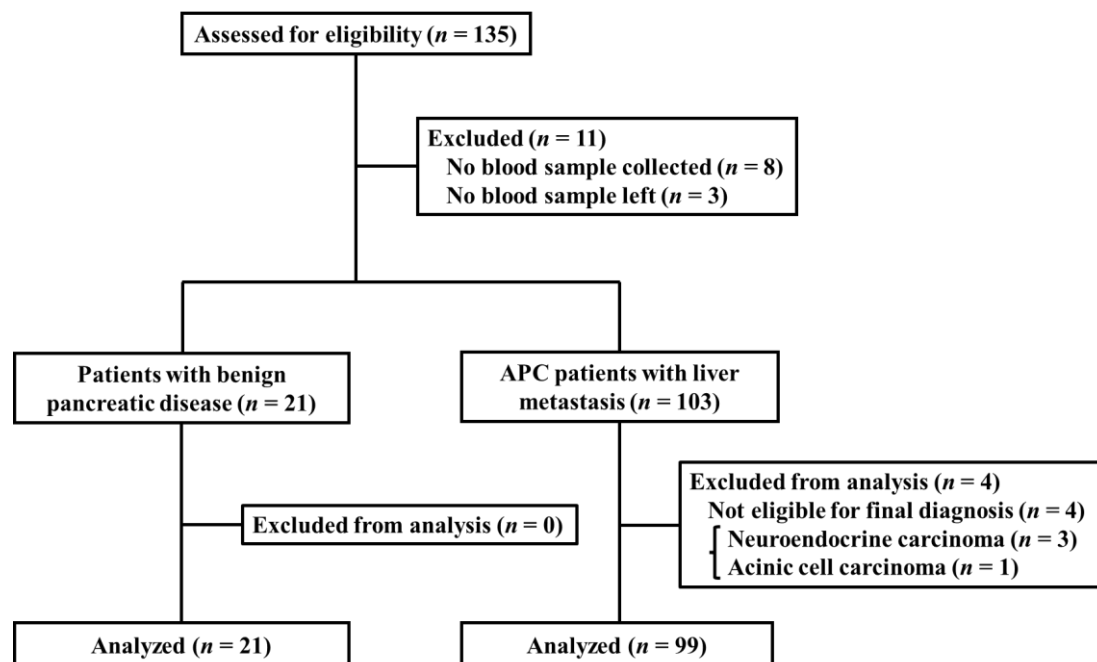


図 45. CONSORT ダイアグラム

(Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 1 を改変)

肝転移を有する進行膵がん患者の血清 GDF-15 濃度は、良性膵疾患患者より有意に高い値であった (進行膵がん患者 vs. 良性膵疾患患者 =  $2990.2 \pm 1967.0$  pg/mL vs.  $1177.0 \pm 1089.8$  pg/mL,  $p < 0.001$ )。カットオフ値は、良性膵疾患患者の血清 GDF-15 濃度の平均値に標準偏差の 2 倍を加えた  $3356.6$  pg/mL に設定した (図 46)。設定したカットオフ値によって、34 人 (34.3%) の進行膵がん患者が血清 GDF-15 濃度高値群 (High GDF-15 群) に分類された。High GDF-15 群と血清 GDF-15 濃度低値群 (Low GDF-15 群) の血清 GDF-15 濃度の代表値は、それぞれ  $5257.0 \pm 1649.9$  pg/mL と  $1804.5 \pm 602.5$  pg/mL であった。

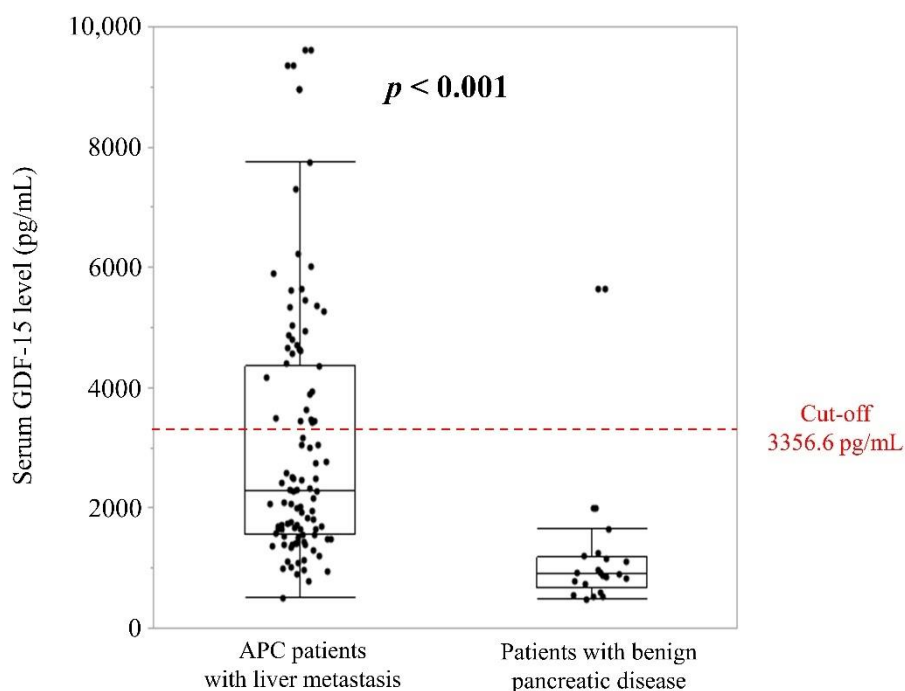


図 46. APC 患者と良性膵疾患患者の血清 GDF-15 濃度  
赤点線は設定したカットオフ値を示している。  
(Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 2 より抜粋)

### 3.3.2. 血清 GDF-15 濃度によるベースラインの臨床的特徴

99 人の APC 患者の中で、87 人 (87.9%) の患者が 1 次治療を受け、その内訳はゲムシタビン + ナブパクリタキセル併用療法 3 人 (3.0%)、FOLFIRINOX (5-FU + ロイコボリン + イリノテカン + オキサリプラチン) 療法 14 人 (14.1%)、ゲムシタビン単剤療法 26 人 (26.3%)、ゲムシタビン + エルロチニブ併用療法 32 人 (32.3%)、その他の治療法 12 人 (12.1%) であった。残りの 12 人 (12.1%) の APC 患者は BSC を受けた。Low GDF-15 群との比較で明らかとなった High GDF-15 群の臨床的特徴は、KPS 低値 ( $p = 0.037$ )、ECOG-PS 高値 ( $p = 0.049$ )、血清 CA19-9 濃度高値 ( $p = 0.019$ )、血清 CRP 濃度高値 ( $p = 0.009$ )、重度の食欲不振 ( $p = 0.011$ ) であった (表 5)。High GDF-15 群における化学療法導入割合は、Low GDF-15 群と比較して有意に低かった (High GDF-15 群 vs. Low GDF-15 群 = 76.5% vs. 93.9%,  $p = 0.020$ )。化学療法のレジメンの内訳や高度な神経叢浸潤の有無を含むその他のベースラインの臨床データについて、両群間で有意な差は認められなかった。

表 5. High GDF-15 群と Low GDF-15 群におけるベースラインの臨床データの単変量解析

Variables		Serum GDF-15 levels		<i>p</i> -value
		Low	High	
Sex	Male	42 (64.6%)	19 (55.9%)	0.514
	Female	23 (35.4%)	15 (44.1%)	
Age (years)	Median [range]	67.0 [39-85]	65.9 [50-85]	0.665
KPS	Median [range]	90 [60-100]	80 [60-100]	0.037
ECOG-PS	0	36 (56.3%)	9 (31.0%)	0.049
	1	25 (39.1%)	16 (55.2%)	
	2	3 (4.7%)	4 (13.8%)	
Chemotherapy	Yes	61 (93.9%)	26 (76.5%)	0.020
Regimen	GEM+nab-PTX	2 (3.3%)	1 (3.8%)	0.738
	Modified FOLFIRINOX	10 (16.4%)	4 (15.4%)	
	GEM monotherapy	16 (26.2%)	10 (38.5%)	
	GEM + Erlotinib	23 (37.7%)	9 (34.6%)	
	others	10 (16.4%)	2 (7.7%)	
CEA (ng/mL)	Median [range]	14.8 [0.9-363.4]	26.4 [1.3-1441.0]	0.247
CA19-9 (U/mL)	Median [range]	2995.0 [0.1-330600.0]	10771.5 [0.5-343352.0]	0.019
Severe nervous plexus invasion	Present	36 (55.4%)	12 (35.3%)	0.090
Ascites	Present	34 (52.3%)	14 (41.2%)	0.397
Peritoneal metastasis	Present	28 (43.1%)	19 (55.9%)	0.290
Biliary Drainage before starting chemotherapy	Present	8 (12.3%)	5 (14.7%)	0.760
Lung metastasis	Present	14 (21.5%)	6 (17.7%)	0.794
Distant lymph node metastasis	Present	4 (6.1%)	5 (14.7%)	0.268
Serum CRP levels (mg/dL)	Median [range]	1.20 [0.03-18.58]	3.22 [0.06-21.72]	0.009
Cachexia	Cachexia	37 (56.9%)	17 (50.0%)	0.531
	Non-cachexia	28 (43.1%)	17 (50.0%)	
Sarcopenia	Sarcopenia	19 (33.9%)	10 (52.6%)	0.179
	Non-sarcopenia	37 (66.1%)	9 (47.4%)	
SMI (kg/m <sup>2</sup> )	Median [range]	44.26 [27.40-52.10]	40.14 [28.28-52.88]	0.203
MDASI-J appetite loss	Median [range]	1 [0-10]	4 [0-10]	0.011
Body weight loss (%)	Median [range]	5.74 [-17.42-22.81]	5.03 [-1.72-30.00]	0.690

KPS, Karnofsky Performance Status; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; CEA, carcinoembryonic antigen; CA19-9, Carbohydrate antigen 19-9; CRP, C-reactive protein; SMI, Skeletal Muscle Mass Index; MDASI-J, Japanese version of the M.D.Anderson Symptom Inventory. (Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Table 1 より抜粋)

表 5 にて High GDF-15 群と Low GDF-15 群の間に有意差が認められた因子のうち、食欲不振、血清 CRP 濃度、KPS、血清 CA19-9 濃度について研究方法で述べたカットオフ値や臨床で用いられているカットオフ値を用いて 2 群化し、血清 GDF-15 濃度を比較した。その結果、重度食欲不振群 (MDASI  $\geq 2$ ,  $n = 48$ ,  $3407.1 \pm 2051.7$  pg/mL)、血清 CRP 濃度高値群 (CRP  $\geq 2.0$  mg/dL,  $n = 43$ ,  $3581.0 \pm 2172.7$  pg/mL)、KPS 低値群 (KPS  $< 90$ ,  $n = 42$ ,  $3274.3 \pm 1789.5$  pg/mL)、血清 CA19-9 濃度高値群 (CA19-9  $> 4150$  IU/mL,  $n = 49$ ,  $3348.3 \pm 1986.5$  pg/mL) はそれぞれ、非重度食欲不振群 (MDASI  $< 2$ ,  $n = 43$ ,  $2285.9 \pm 1483.5$  pg/mL,  $p = 0.0031$ , 図 47)、血清 CRP 濃度低値群 (CRP  $< 2.0$  mg/dL,  $n = 56$ ,  $2536.5 \pm 1675.2$  pg/mL,  $p = 0.013$ , 図 48)、KPS 高値群 (KPS  $\geq 90$ ,  $n = 49$ ,  $2367.3 \pm 1639.6$  pg/mL,  $p = 0.001$ , 図 49)、血清 CA19-9 濃度低値群 (CA19-9  $\leq 4150$  IU/mL,  $n = 50$ ,  $2639.2 \pm 1902.1$  pg/mL,  $p = 0.027$ , 図 50) より血清 GDF-15 濃度が有意に高かった。

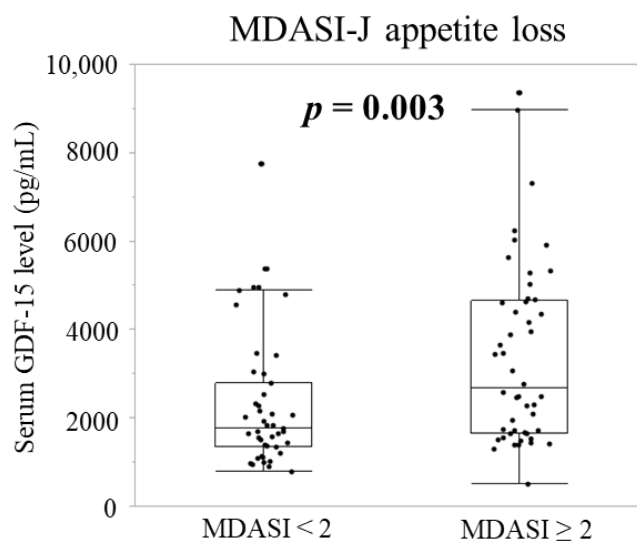


図 47. 食欲不振と血清 GDF-15 濃度の関係  
(Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 3A より抜粋)



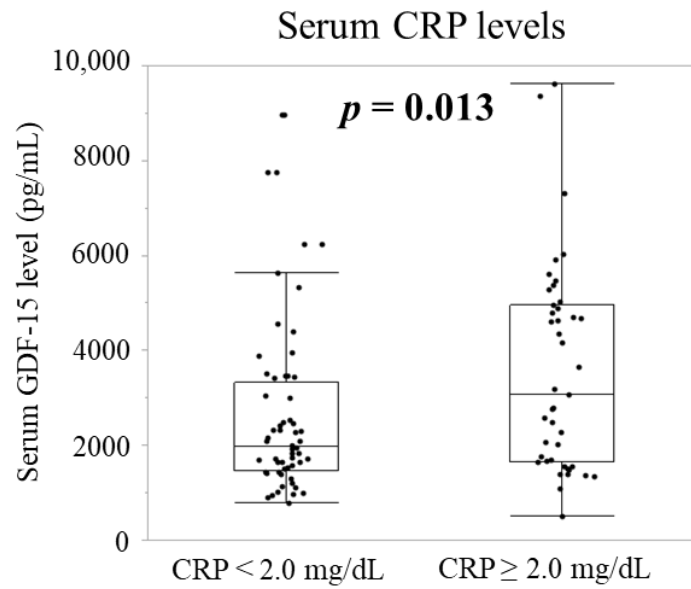


図 48. 血清 CRP 濃度と血清 GDF-15 濃度の関係  
(Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 3B より抜粋)

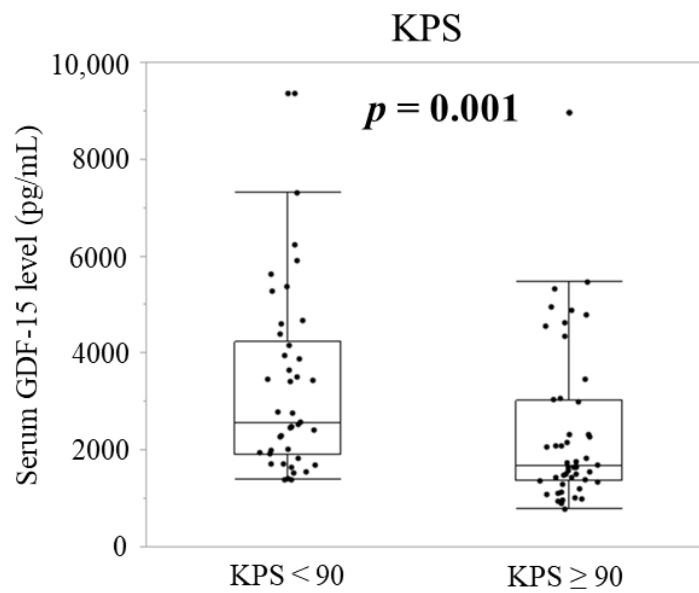


図 49. KPS と血清 GDF-15 濃度の関係  
(Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 3C より抜粋)

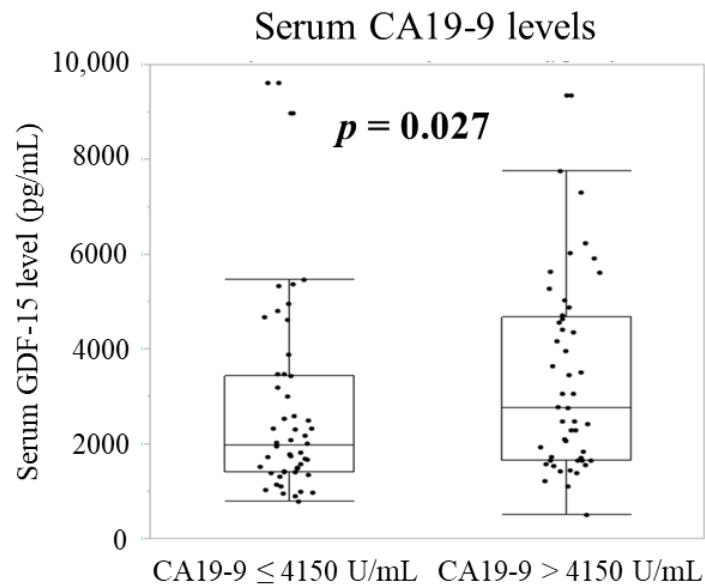


図 50. 血清 CA19-9 濃度と血清 GDF-15 濃度の関係  
(Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 3D より抜粋)

### 3.3.3. 血清 GDF-15 濃度と生存期間の関係

本研究にて対象となった進行膵がん患者 99 人全員の OS 中央値は、4.10 ヶ月 (95% CI: 3.33-5.87 ヶ月) であった。High GDF-15 群 (n = 34) と Low GDF-15 群 (n = 65) のそれぞれの OS 中央値は、2.70 ヶ月 (95% CI: 1.37-5.83 ヶ月) と 5.70 ヶ月 (95% CI: 3.63-7.60 ヶ月) であり、2 群間に有意な差は認められなかった ( $p = 0.113$ )。

化学療法を受けた進行膵がん患者 87 人の OS 中央値は、5.57 ヶ月 (95% CI: 3.63-6.53 ヶ月) であった。High GDF-15 群 (n = 26) と Low GDF-15 群 (n = 61) のそれぞれの OS 中央値は、3.33 ヶ月 (95% CI: 1.73-5.87 ヶ月) と 5.87 ヶ月 (95% CI: 3.70-7.97 ヶ月) であり、2 群間に有意な差は認められなかった ( $p = 0.254$ , 図 51)。化学療法を受けた進行膵がん患者 87 人の PFS 中央値は、2.20 ヶ月 (95% CI: 1.83-2.87 ヶ月) であった。High GDF-15 群 (n = 26) と Low

GDF-15 群 (n = 61) のそれぞれの PFS 中央値は、1.58 ヶ月 (95% CI: 0.97-2.73 ヶ月) と 2.60 ヶ月 (95% CI: 1.90-3.20 ヶ月) であり、2 群間に有意な差は認められなかった ( $p = 0.546$ , 図 52)。

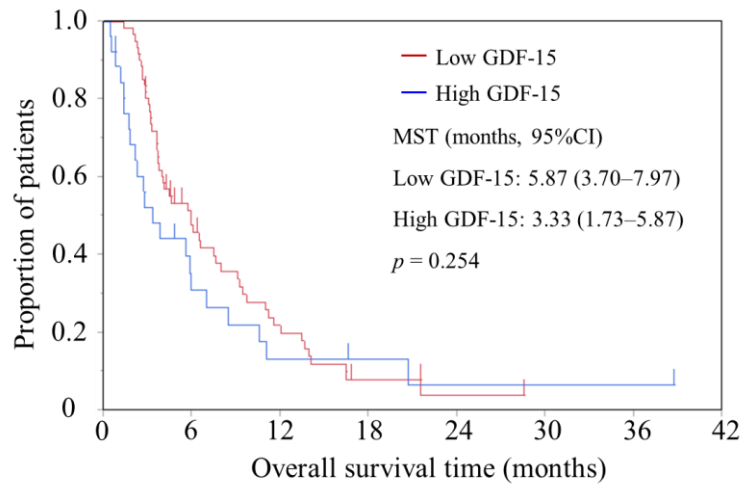


図 51. 化学療法導入患者における血清 GDF-15 濃度と OS の関係  
 CI, confidence interval; MST, median survival time  
 (Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 4A より抜粋)

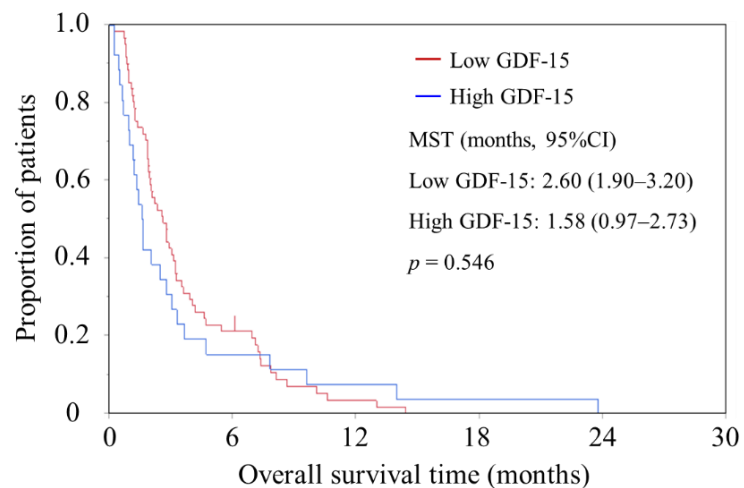


図 52. 化学療法導入患者における血清 GDF-15 濃度と PFS の関係  
 CI, confidence interval; MST, median survival time  
 (Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 4B より抜粋)

### 3.3.4. 血清 GDF-15 濃度高値患者の腫瘍の特徴

RPPA 法を用いた機能性タンパク質解析を、それぞれ High GDF-15 群の 38.2% (n = 13)、Low GDF-15 群の 41.5% (n = 27) の患者、合計 65 人分の患者の腫瘍検体に対して実施することができた。本研究では、進行膵がん患者の肝転移から採取した生検組織のライセートを用いて、435 種類のタンパク質及びリン酸化タンパク質の発現が分析された。High GDF-15 群と Low GDF-15 群の間で有意な検出量の差が認められたタンパク質は、p-JNK と p-Akt を含め 12 種類であった (High GDF-15 群 vs. Low GDF-15 群: p-JNK  $0.046 \pm 0.142$  vs.  $-0.094 \pm 0.1891$ ,  $p = 0.007$ , 図 53; p-Akt  $0.123 \pm 0.219$  vs.  $-0.020 \pm 0.170$ ,  $p = 0.040$ , 図 54)。

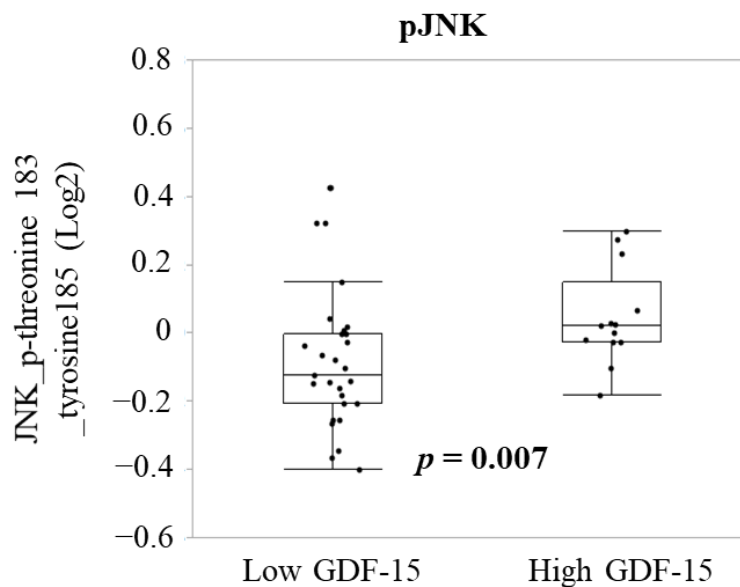


図 53. 血清 GDF-15 濃度と p-JNK の検出量の関係  
(Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 5A より抜粋)

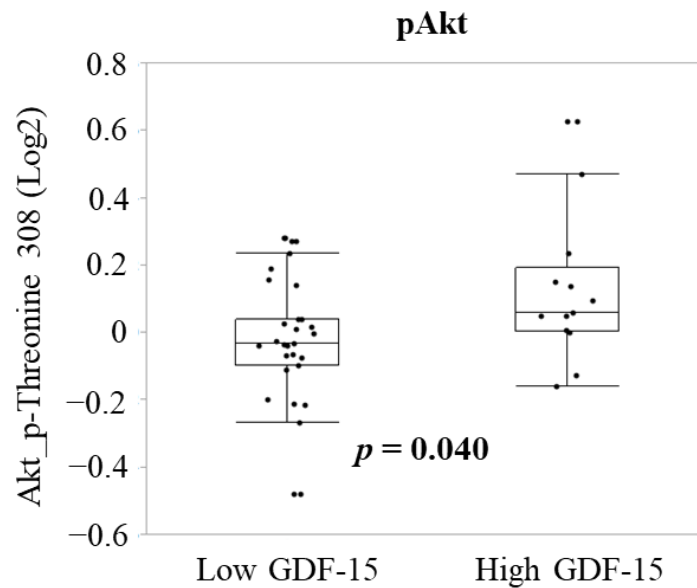


図 54. 血清 GDF-15 濃度と p-Akt の検出量の関係  
(Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 5B より抜粋)

RPPA 解析が可能であった 40 人の進行膵がん患者を p-JNK と p-Akt の検出量の中央値 [median (p-JNK) = -0.0256, median (p-Akt) = 0.0036] で 2 群に分け、血清 GDF-15 濃度を比較した。検出量が中央値より高い患者を High p-JNK 群または High p-Akt 群、低い患者を Low p-JNK 群または Low p-Akt 群とした。High p-JNK 群 (n = 19, 3522±2006.42 pg/mL)、High p-Akt 群 (n = 21, 3307.8±1758.0 pg/mL) の血清 GDF-15 濃度は、それぞれ Low p-JNK 群 (n = 21, 2040.5±1031.9 pg/mL,  $p = 0.015$ , 図 55)、Low p-Akt 群 (n = 19, 2122.0±1487.7 pg/mL,  $p = 0.020$ , 図 56) より有意に高かった。

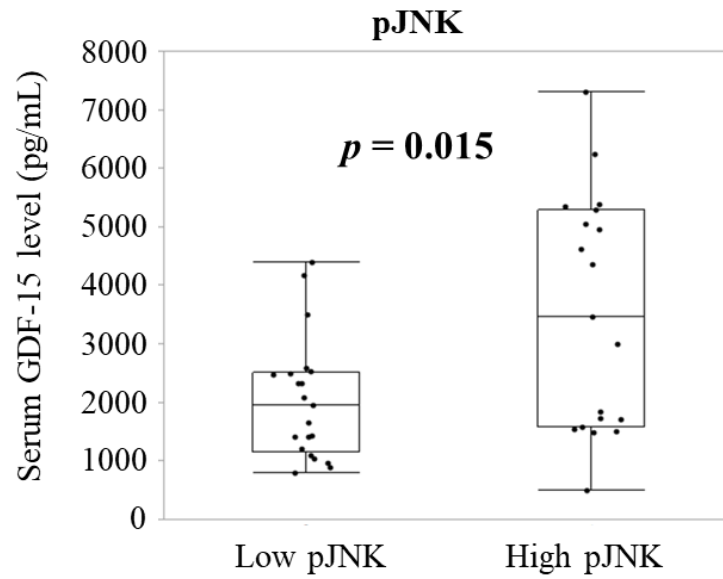


図 55. p-JNK の量と血清 GDF-15 濃度の関係  
(Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 5C より抜粋)

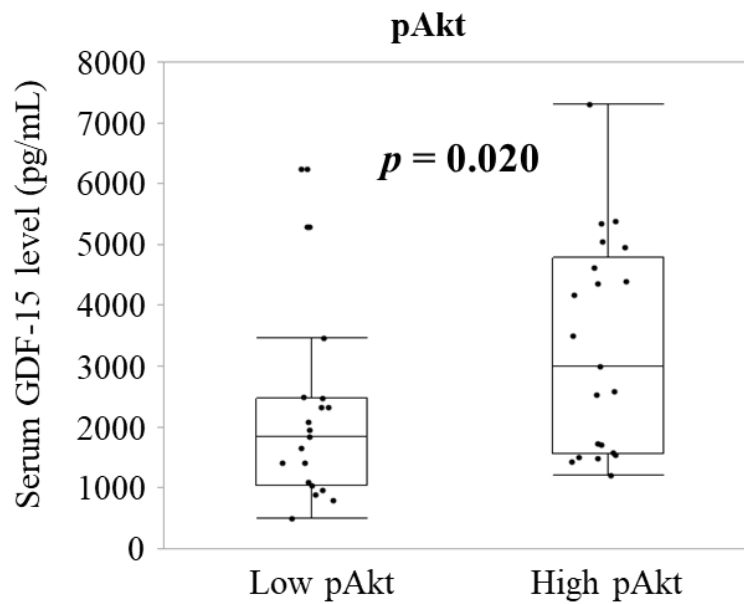


図 56. p-Akt の量と血清 GDF-15 濃度の関係  
(Suzuki H, et al. Cancers 2021;13:4842. Figure 5D より抜粋)

### 3.4. 考察

血清 GDF-15 濃度は、PDAC [平均値：1731 pg/mL (31), 2428 pg/mL (96), 7694.58 pg/mL (77), 2990.2 pg/mL(本研究)] において、大腸がん [平均値：1371.0 pg/mL (31), 2030 pg/mL (97)] や非小細胞肺癌 [平均値：1258.0 pg/mL (31)、中央値：828.8-2000 pg/mL (105, 106)]、胃がん [平均値：1154.0 pg/mL (31)] など他のがん種に比べて高くなっていた。Human transcriptome atlas において、膵がんにおける GDF-15 mRNA 発現は、前立腺がん、腎がん、悪性黒色腫、大腸がんと比べて比較的lowかった (107)。GDF-15 の腫瘍における mRNA 発現量と血清中濃度が合致しない理由として、研究対象患者における遠隔転移割合が考えられる。先行研究 (31) における大腸がん患者の多くは病期が早期である患者であるが、別の先行研究 (97) における遠隔転移を有する大腸がん患者では、血清 GDF-15 濃度の平均値はより一層高い 3531 pg/mL である。様々ながん種において血清 GDF-15 濃度を評価する際には、対象集団の遠隔転移の割合に注意すべきであることが示唆された。また、血清 GDF-15 濃度の評価には日内変動に注意する必要がある。血清 GDF-15 濃度には、概日振動があり、周期的に変動する値の算術平均を表す MESOR の  $\pm$  約 10% のリズムで変動することが知られている (108)。本研究では、対象とした進行膵がん患者のうち全員が肝転移を有しており、かつ採血のタイミングを一晩絶食後の朝に統一しているため、患者の転移割合や血清 GDF-15 濃度の日内変動による影響はほぼないと考えている。

本研究の結果から、High GDF-15 群の患者は Low GDF-15 群の患者と比較して、より重

度の食欲不振を抱えていることが分かった。血清 GDF-15 濃度は食欲不振のないがん患者 (中央値：812.4 pg/mL) と比べて、食欲不振のあるがん患者 (中央値：1224.1 pg/mL) の方が高いことが報告されている (105)。この先行研究 (105) において、食欲不振を定義するカットオフ値は、functional assessment of anorexia/cachexia therapy (FAACT) スコアの三分位値の最低値に設定され、このカットオフ値は食欲不振の定義としてコンセンサスが得られている FAACT スコア  $\leq 24$  とほぼ同等の値であった (109)。著者の研究の結果では、食欲不振について 0-10 の 11 段階で評価する MDASI-J を用いて評価したが、High GDF-15 群と Low GDF-15 群の MDASI-J のスコア中央値はそれぞれ 4 と 1 であった。NCCN の緩和ケアガイドラインでは、痛み以外の症状について、重度の症状とは 0-10 の数字による評価スケールを用いた場合、4 以上とすることが定義されている (110)。MDASI のバリデーション研究において、MDASI のスコアが重症度別に定義されており、重度が 7 以上、中等度が 5 または 6、軽度が 1 から 4 であり (99、111)、本研究における High GDF-15 群と Low GDF-15 群における食欲不振の程度は、それぞれバリデーション研究における軽度の症状スコアの上限と下限に相当するものであった。また、別の先行研究において、食欲不振に関する数値評価スケールの臨床的意義のある最小の差が 1.5 であることが報告されており (112)、著者の研究結果に当てはめると、High GDF-15 群の MDASI-J スコアは Low GDF-15 群より 3 点高いスコアであり、臨床的に意義のある差であると考えている。以上のことから、High GDF-15 群の患者は Low GDF-15 群と比べて臨床的に意味のある重症度の食欲不振を抱えて



いると考察した。

本研究における RPPA 解析の結果から、p-JNK と p-Akt の発現が Low GDF-15 群と比較して、High GDF-15 群において有意に高くなっていることが明らかとなった。Solid stress を含む様々な腫瘍関連ストレスが JNK と Akt のリン酸化を誘導することが報告されている (113、114、115)。腫瘍における growth-induced solid stress は周囲の組織を圧迫するような過剰な腫瘍量を反映している (116、117)。High GDF-15 群の進行肺癌患者は、本研究の結果から血清 CA19-9 濃度が高いことが明らかとなっており、腫瘍量が多いことが予想される (118)。Akt や JNK は、GDF-15 遺伝子の転写を活性化させ (32、119)、GDF-15 産生を増加させることが報告されている (81、120)。そのため、腫瘍量の増大に伴う solid stress の増加が、腫瘍組織において JNK と Akt を含むシグナル経路の活性化を介して、GDF-15 産生を増加させた可能性があると考えている。

Evans らによる悪液質の診断基準には、体重減少、サルコペニア、全身性炎症反応、食欲不振、倦怠感とそれに関連する全身状態の悪化が含まれている (15)。本研究において、血清 GDF-15 濃度高値の患者は、より重度の食欲不振、全身性炎症反応、全身状態悪化やそれに伴う低い化学療法導入割合といった特徴があったものの、サルコペニアや体重減少は認められなかった。これらの結果の解釈として、著者は、腫瘍量の増加が体重減少やサルコペニアが発現する前に、solid stress を介して GDF-15 による食欲不振を悪化させ、全身性炎症反応や全身状態の悪化を起こしているのではないかと考えた。近年、GDF-15 の中

和抗体である CTL-002 の first-in-human で 2 部構成のオープンラベル第 I 相試験が進行期で切除不能・再発の固形がん患者を対象に行われている (NCT04725474)。GDF-15 の生物活性阻害は、いくつかの悪液質モデルにおいて、体重減少や筋肉や脂肪の浪費を回復させることが知られているため (69)、対象患者は抗腫瘍効果や安全性だけでなく、悪液質関連のアウトカムも評価される。CTL-002 の臨床試験によって、GDF-15 と悪液質の関連性がさらに明らかとなる可能性がある。

本研究で設定した血清 GDF-15 濃度のカットオフ値は、検証コホートを用いた検討ができていない。しかし、著者が設定したカットオフ値によって、腫瘍組織における GDF-15 の産生に関わることが予想される JNK や Akt のシグナルの生物活性も分けることができた。この生物学的活性を用いて、血清 GDF-15 濃度のカットオフ値の妥当性を確認することができたと考えている。

### 3.5. 小括

本研究によって、血清 GDF-15 濃度が高い進行肺癌患者は、臨床的特徴として、全身状態の低下、食欲不振、炎症反応や腫瘍量の増大といった悪液質の特徴を有していることが明らかとなった。また、その腫瘍の特徴として、GDF-15 の産生やストレス応答に関わる JNK や Akt を含むシグナル経路が活性化していることが示唆された。本研究の結果は、進行肺癌患者において循環血中の GDF-15 が悪液質症状と関連し得ることを示している。

## 第4章 総括

多くの進行膵がん患者が抱える悪液質は多因子的な症候群であり、体重減少、骨格筋萎縮、複合的な代謝異常、重度の食欲不振、全身性炎症反応、化学療法抵抗性など様々な状態が複合的に起こる (15)。新規悪液質治療薬として、食欲に関わる内因性ホルモンであるグレリンの受容体に対する刺激作用により、食欲不振の改善や徐脂肪体重を増加させる効果が報告されたアナモレリンが世界で初めて本邦で承認され、膵がん、肺がん、胃がん、大腸がんに伴う悪液質の治療に用いられている。その一方で、アナモレリン投与による筋力増加や予後延長等を認めない (13) ため、がん悪液質の発症機序に基づいた更なる治療開発が求められている。このような背景を踏まえ、著者は、がん悪液質の発症機序のひとつである悪液質腫瘍因子を研究対象とした。

まず、悪液質腫瘍因子として腫瘍浸潤促進因子に着目した。膵がん患者のほぼ全例に起こる腫瘍の浸潤様式である神経浸潤は、体重減少や骨格筋萎縮の原因となることが明らかとなっている (21)。そのため、神経浸潤の分子機序解明によって新規治療開発につながることを考えた。膵がん神経浸潤ががん悪液質の特徴のひとつでもある全身性炎症反応を起こすことから (21)、全身性炎症反応を誘発する炎症性サイトカインであり、かつ神経に豊富に存在する神経栄養因子である IL-6 が、膵がん神経浸潤の促進分子であり、神経浸潤先進部にて高発現しているという仮説を立証する研究を行った。本研究で用いている非臨床モデルは、著者が所属する研究グループで独自に確立されたモデルであり、これまでに膵がん

の神経浸潤が原因で起こる神経炎症、痛み、悪液質などの病態について研究されてきた。

本研究では、*in vitro* の系を用いて、受容体 mRNA 発現から ligand のスクリーニングを行い、抽出されてきた分子に対して、膵がん細胞株への浸潤促進能やシグナル伝達の確認を行い、IL-6 が候補分子となることを確認した。*In vivo* の系における N-inv モデルを用いた検討では、神経浸潤先進部における IL-6 発現やシグナル伝達を確認した上で、シグナル伝達阻害実験を行い、IL-6/sIL-6R/gp130/JAK2/STAT3 経路が神経浸潤に寄与することを確認した。

最後に、進行膵がん患者の検体を用いて、神経浸潤と IL-6/gp130 経路の関係性が臨床でも成立するかの確認を行った。その結果、血清 IL-6 濃度から高度神経浸潤を有する患者では血清 IL-6 濃度が高く、腫瘍部位の gp130 発現から神経浸潤部位にて原発巣よりも IL-6 が利用されやすい環境であることが示された。以上の *in vitro*、*in vivo*、臨床における検討から、IL-6/gp130 経路が膵がん神経浸潤促進の分子機序であることを明らかにした。本研究の結果から、IL-6/gp130/JAK/STAT3 経路が膵がんの治療介入の有効なターゲットである可能性があり、IL-6 シグナル阻害薬を用いた神経浸潤の抑制が悪液質治療に有用である可能性が示唆された。進行膵がん患者に対して IL-6 シグナル経路の阻害薬を用いた臨床試験は、JAK 阻害薬であるルキシソリチニブや抗ヒト IL-6R 抗体であるトシリズマブを用いて実施されているものの、あまり良好な成績を残すことができていない (60、61)。併用レジメンがゲムシタビン単独やカペシタビン単独であり、治療強度不足が原因となっている可能性が考察されており、現在ゲムシタビン + ナブパクリタキセル併用療法にトシリズマブを上乗

せした臨床試験が実施されている。もともとのゲムシタビン + ナブパクリタキセル併用療法の抗腫瘍効果に加えて、トシリズマブによる神経浸潤抑制効果に伴う悪液質進行の抑制効果の可能性も期待される。

次に、悪液質腫瘍因子の悪液質促進因子である GDF-15 に着目した。GDF-15 は食欲やエネルギー消費との関連性が報告されており、様々なストレスに反応して増加するストレス応答性サイトカインである (26)。GDF-15 は脳幹の受容体に作用し、食欲を直接制御する分子であり、食欲不振の原因となる (26)。また、悪液質の非臨床モデルにおける GDF-15 の生物活性の阻害は悪液質を改善したとの報告があり (29)、悪液質促進因子のひとつとして、抗体製剤の臨床開発が進んでいる。そこで、著者は、進行肺癌患者を対象とした GDF-15 阻害療法の臨床試験構築を見据えて、血清 GDF-15 濃度高値の進行肺癌患者の臨床的特徴と腫瘍の分子生物学的特徴について検討を行った。血清 GDF-15 濃度高値の腫瘍の分子生物学的特徴は、Akt と JNK のリン酸化タンパク質の高発現であり、共にストレス応答で発現が増加することが知られている (113、114、115)。また、Akt と JNK は GDF-15 発現を転写レベルで制御することが報告されている (32)。血清 GDF-15 濃度高値の患者で血清 CA19-9 濃度が高値であったことから、腫瘍量の増大に伴う solid stress の増加が、腫瘍組織において JNK と Akt を含むシグナル経路の活性化を介して、GDF-15 産生量を増加させた可能性があると考えている。血清 GDF-15 濃度高値の患者の血清 CA19-9 濃度以外の臨床的特徴は、低値の患者と比較して、より重篤な食欲不振、強い全身性炎症反応、全身状態の

悪化であった。現在、固形がん患者を対象に抗 GDF-15 抗体の First-in-human の臨床試験が実施されているが、本研究の結果から、血清 GDF-15 濃度高値の進行肺癌患者群に対して抗 GDF-15 抗体を投与した場合、食欲不振を改善させる効果が期待できることが示唆された。また、本研究では、神経浸潤と血清 GDF-15 濃度の関係性は認められなかった。第 2 章で扱った N-inv モデルは、先行研究から摂食量低下を伴わずに骨格筋萎縮や体重減少を起こすことが明らかとなっている (21)。そのため、神経浸潤と食欲不振の直接的な関係は明らかとなっていないが、食欲不振と相関する血清 GDF-15 濃度と神経浸潤の有無の間には明確な関連性はないことが予想される。

本研究では、がん悪液質に関わる腫瘍因子やそれに関わる分子機序の一端を明らかにすることができた。本研究の成果によって、がん悪液質の原因となる悪液質腫瘍因子に着目したがん悪液質の新規治療開発のために必要となる悪液質腫瘍因子の候補、原因分子の阻害療法についての臨床試験構築へ向けた基盤情報を提供することができた。新規治療薬開発のための臨床試験の多くは、製薬企業が中心となって計画・実施されるが、臨床試験立案に必要な基盤となる情報の提供には、大学・医療機関を含むアカデミアが中心的役割を担っている。本研究によって、がん悪液質の新規治療開発に直結し、製薬企業による新規治療開発を後押しするような基盤情報を得ることができたと考える。

## 謝辞

本研究を学位論文としてまとめる場を与えて下さり、学位論文審査の主査の労をお執りくださいました東京理科大学薬学部 青山 隆夫 教授に深く感謝申し上げます。また、多くの貴重なご助言を賜り、学位論文審査の副査の労をお執りくださいました同大学薬学部 野口 耕司 教授、秋本 和憲 教授、高澤 涼子 准教授、吉澤 一巳 准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、御指導、御鞭撻を賜りました国立研究開発法人国立がん研究センター先端医療開発センターバイオマーカー探索 TR 分野 光永 修一 先生に心より感謝申し上げます。また、種々の御助言、御指導並びに実験にご協力いただきました国立研究開発法人国立がん研究センター先端医療開発センターバイオマーカー探索 TR 分野 落合 淳志 先生に深く感謝申し上げます。

学位取得にあたり、学部の指導教授である星薬科大学薬学部 成田 年 教授に厚く御礼申し上げます。また、東京理科大学薬学部 疾患薬理学研究室の同門の方々、主な研究の場となりました国立がん研究センター先端医療開発センターバイオマーカー探索 TR 分野の方々に深く御礼申し上げます。

最後に、いつも私を様々な面から支えてくれる妻 千愛に感謝致します。

## 参考文献

- [1] 日本膵臓学会. 膵癌取扱い規約 第7版: 金原出版; 2016.
- [2] 2019年のがん統計予測. 2019. at [https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/short\\_pred.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/short_pred.html)
- [3] SEER Cancer Stat Facts: Pancreatic Cancer. National Cancer Institute. Bethesda, MD, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>
- [4] Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* 1997;15:2403-13.
- [5] Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* 2007;25:1960-6.
- [6] Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011;364:1817-25.
- [7] Ueno H, Ioka T, Ikeda M, Ohkawa S, Yanagimoto H, Boku N, Fukutomi A, Sugimori K, Baba H, Yamao K, et al. Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study. *J Clin Oncol.* 2013;31:1640-8.
- [8] Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med.* 2013;369:1691-703.
- [9] 日本膵臓学会. 膵癌診療ガイドライン 第5版: 金原出版: 2019.
- [10] Wang-Gillam A, Li CP, Bodoky G, Dean A, Shan YS, Jameson G, Macarulla T, Lee KH, Cunningham D, Blanc JF, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2016;387:545-557.
- [11] Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* 2011, 12, 489-495.
- [12] 日本がんサポーターズケア学会. 『がん悪液質：機序と治療の進歩』: 2018.
- [13] Hamauchi S, Furuse J, Takano T, Munemoto Y, Furuya K, Baba H, Takeuchi M, Choda Y, Higashiguchi T, Naito T, et al. A multicenter, open-label, single-arm study of anamorelin (ONO-7643) in advanced gastrointestinal cancer patients with cancer cachexia. *Cancer.*



2019;125:4294-4302.

- [14] Donohoe, C.L., Ryan, A.M., and Reynolds, J.V. Cancer cachexia: mechanisms and clinical implications. *Gastroenterol Res Pract* 2011;601434.
- [15] Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* 2008;27:793-799.
- [16] 奥山亮、辻本将晴. アカデミア創薬の背景と現状-産学官各々の立場からの分析-. *産学連携学* 2017;13:127-134.
- [17] Bockman DE, Buchler M, Beger HG. Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterology* 1994;107:219-30.
- [18] Mitsunaga S, Hasebe T, Kinoshita T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N and Ochiai A. Detail histologic analysis of nerve plexus invasion in invasive ductal carcinoma of the pancreas and its prognostic impact. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1636-44.
- [19] Mitsunaga S, Kinoshita T, Hasebe T, Nakagohri T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N and Ochiai A. Low serum level of cholinesterase at recurrence of pancreatic cancer is a poor prognostic factor and relates to systemic disorder and nerve plexus invasion. *Pancreas* 2008;36:241-8.
- [20] Mitsunaga S, Fujii S, Ishii G, Kinoshita T, Hasebe T, Aoyagi K, Sasaki H and Ochiai A. Nerve invasion distance is dependent on laminin gamma2 in tumors of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2010;127:805–19.
- [21] Imoto A, Mitsunaga S, Inagaki M, Aoyagi K, Sasaki H, Ikeda M, Nakachi K, Higuchi K, Ochiai A. Neural invasion induces cachexia via astrocytic activation of neural route in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2012;131:2795-807.
- [22] Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14:7-23.
- [23] Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 2010;2:161-75.
- [24] Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Kaziro Y. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol.* 1988;8:3546-9.
- [25] Guo K, Ma Q, Li J, Wang Z, Shan T, Li W, Xu Q and Xie K. Interaction of the sympathetic nerve with pancreatic cancer cells promotes perineural invasion through the activation of STAT3 signaling. *Mol Cancer Ther.* 2013;12:264–73.
- [26] Mullican SE, Rangwala SM. Uniting GDF15 and GFRAL: Therapeutic opportunities in obesity and beyond. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29:560-570.
- [27] Patel S, Alvarez-Guaita A, Melvin A, Rimmington D, Dattilo A, Miedzybrodzka EL, Cimino I, Maurin AC, Roberts GP, Meek CL, et al. GDF15 provides an endocrine signal of nutritional

- stress in mice and humans. *Cell Metab.* 2019;29:707-718.e8.
- [28] Molino A, Amabile MI, Imbimbo G, Rizzo V, Pediconi F, Catalano C, Emiliani A, Belli R, Ramaccini C, Parisi C, et al. Association between growth differentiation factor-15 (GDF-15) serum levels, anorexia and low muscle mass among cancer patients. *Cancers (Basel)*. 2020;13:99.
- [29] Lerner L, Tao J, Liu Q, Nicoletti R, Feng B, Krieger B, Mazsa E, Siddiquee Z, Wang R, Huang L, et al. MAP3K11/GDF15 axis is a critical driver of cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016;7:467-482.
- [30] Kalli M, Stylianopoulos T. Defining the Role of Solid Stress and Matrix Stiffness in Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Front Oncol.* 2018;8:55.
- [31] Wang X, Li Y, Tian H, Qi J, Li M, Fu C, Wu F, Wang Y, Cheng D, Zhao W, et al. Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) as a novel diagnostic serum biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2014;14:578.
- [32] Kalli M, Minia A, Pliaka V, Fotis C, Alexopoulos LG, Stylianopoulos T. Solid stress-induced migration is mediated by GDF15 through Akt pathway activation in pancreatic cancer cells. *Sci Rep.* 2019;9:978.
- [33] Mitsunaga S, Hasebe T, Iwasaki M, Kinoshita T, Ochiai A, Shimizu N. Important prognostic histological parameters for patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Cancer Sci.* 2005;96:858–65.
- [34] Yoshikawa K, Mitsunaga S, Kinoshita T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Kato Y, Aizawa M and Ochiai A. Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. *Cancer Sci.*2012;103:2012–20.
- [35] Ceyhan GO, Bergmann F, Kadihasanoglu M, Altintas B, Demir IE, Hinz U, Müller MW, Giese T, Büchler MW, Giese NA, et al. Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology.* 2009;136:177–86.
- [36] Miura T, Mitsunaga S, Ikeda M, Ohno I, Takahashi H, Kuwata, T and Ochiai A. Neural invasion spreads macrophage-related allodynia via neural root in pancreatic cancer. *Anesth Analg.* 2018;126:1729–38.
- [37] Nagathihalli NS, Castellanos JA, VanSaun MN, Dai X, Ambrose M, Guo Q, Xiong Y and Merchant NB. Pancreatic stellate cell secreted IL-6 stimulates STAT3 dependent invasiveness of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer cells. *Oncotarget.*2016;7:65982–92.
- [38] Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J.* 1998;334:297–314.
- [39] Sheppard M, Laskou F, Stapleton PP, Hadavi S, Dasgupta B. Tocilizumab (Actemra). *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13:1972–88.
- [40] Huang C, Cao J, Huang KJ, Zhang F, Jiang T, Zhu L and Qiu ZJ. Inhibition of STAT3 activity

with AG490 decreases the invasion of human pancreatic cancer cells in vitro. *Cancer Sci.* 2006;97:1417–23.

- [41] Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25:402-408.
- [42] National Comprehensive Cancer Network (NCCN), corp-author Pancreatic Adenocarcinoma. NCCN, Guideline Annual Web Conference, 2020. NCCN Guidelines® Version 1.
- [43] Johnson C, Han Y, Hughart N, McCarra J, Alpini G, Meng F. Interleukin-6 and its receptor, key players in hepatobiliary inflammation and cancer. *Transl Gastrointest Cancer.* 2012;1:58–70.
- [44] Ebrahimi B, Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R. Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. *Cancer.* 2004;101:2727–36.
- [45] Fukuda T, Iwanaga S, Sakamoto I, Aso N, Nagaoki K, Hayashi K, Yamaguchi H, Okudaira S, Tomioka T and Okimoto T. CT of neural plexus invasion in common bile duct carcinoma. *J Comput Assist Tomogr.* 1998; 22:351–6.
- [46] Razidlo GL, Burton KM, McNiven MA. Interleukin-6 promotes pancreatic cancer cell migration by rapidly activating the small GTPase CDC42. *J Biol Chem.* 2018;293:11143–53.
- [47] Chiu CP, Moulds C, Coffman RL, Rennick D, Lee F. Multiple biological activities are expressed by a mouse interleukin 6 cDNA clone isolated from bone marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:7099–103.
- [48] Okamoto M, Hattori K, Oyasu R. Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer.* 1997;72:149–54.
- [49] Litzenburger UM, Opitz CA, Sahm F, Rauschenbach KJ, Trump S, Winter M, Ott M, Ochs K, Lutz C, Liu X, et al. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget.* 2014;5:1038–51.
- [50] Rodriguez-Barrueco R, Yu J, Saucedo-Cuevas LP, Oliván M, Llobet-Navas D, Putcha P, Castro V, Murga-Penas EM, Collazo-Lorduy A, Castillo-Martin M, et al. Inhibition of the autocrine IL-6-JAK2-STAT3-calprotectin axis as targeted therapy for HR-/HER2+ breast cancers. *Genes Dev.* 2015;29:1631–48.
- [51] Nishikawa Y, Kajiura Y, Lew JH, Kido JI, Nagata T, Naruishi K. Calprotectin induces IL-6 and MCP-1 production via toll-like receptor 4 signaling in human gingival fibroblasts. *J Cell Physiol.* 2017;232:1862–71.
- [52] Mitsunaga S, Ikeda M, Shimizu S, Ohno I, Takahashi H, Okuyama H, Ueno H, Morizane C, Kondo S, Sakamoto Y, et al. C-reactive protein level is an indicator of the aggressiveness of advanced pancreatic cancer. *Pancreas.* 2016;45:110-116.
- [53] Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Front Immunol.* 2018;9:754.
- [54] Morrone G, Ciliberto G, Oliviero S, Arcone R, Dente L, Content J and Cortese R. Recombinant

interleukin 6 regulates the transcriptional activation of a set of human acute phase genes. *J Biol Chem* 1988;263:12554–8.

- [55] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:798–809.
- [56] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374:1–20.
- [57] Bonito NA, Drechsler J, Stoecker S, Carmo CR, Seckl MJ, Hermanns HM and Costa-Pereira AP. Control of gp130 expression by the mitogen-activated protein kinase ERK2. *Oncogene*. 2014;33: 2255–63.
- [58] Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Sirulnik A, Stalbovskaya V, McQuitty M, Hunter DS, Levy RS, Passamonti F, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood*. 2013;122:4047–53.
- [59] Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, Harrison CN, Pane F, Zachee P, Mesa R, et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2015;372:426–35.
- [60] Hurwitz HI, Uppal N, Wagner SA, Bendell JC, Beck JT, Wade SM 3rd, Nemunaitis JJ, Stella PJ, Pipas JM, Wainberg ZA, et al. Randomized, double-blind, phase II study of ruxolitinib or placebo in combination with capecitabine in patients with metastatic pancreatic cancer for whom therapy with gemcitabine has failed. *J Clin Oncol*. 2015;33:4039–47.
- [61] Mitsunaga S, Okusaka T, Ikeda M, Ozaka M, Ohkawa S, Ioka T, Shimura T, Sato K, Terao K, Ochiai A, et al. Multicenter, open-label, phase I/II study of tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, combined with gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Med Diagn Meth*. 2017;6:234.
- [62] Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS*. 2014;11:10.
- [63] Vanhala R, Korhonen L, Mikelsaar M, Lindholm D, Riikonen R. Neurotrophic factors in cerebrospinal fluid and serum of patients with Rett syndrome. *J Child Neurol*. 1998;13:429–33.
- [64] Lu P, Zheng DC, Fang C, Huang JM, Ke WJ, Wang LY, Zeng WY, Zheng HP and Yang B. Cytokines in cerebrospinal fluid of neurosyphilis patients: identification of urokinase plasminogen activator using antibody microarrays. *J Neuroimmunol*. 2016;293:39–44.
- [65] Lehtimäki KA, Peltola J, Koskikallio E, Keränen T, Honkaniemi J. Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;110:253–60.
- [66] Hasegawa-Ishii S, Inaba M, Umegaki H, Unno K, Wakabayashi K, Shimada A. Endotoxemia-induced cytokine-mediated responses of hippocampal astrocytes transmitted by cells of the

- brain-immune interface. *Sci Rep.* 2016;6:25457.
- [67] Bockman DE, Büchler M, Beger HG. Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterology.* 1994;107:219–30.
- [68] Ishii G, Sangai T, Ito T, Hasebe T, Endoh Y, Sasaki H, Harigaya K and Ochiai A. In vivo and in vitro characterization of human fibroblasts recruited selectively into human cancer stroma. *Int J Cancer.* 2005;17:212–20.
- [69] Karakasheva TA, Lin EW, Tang Q, Qiao E, Waldron TJ, Soni M, Klein-Szanto AJ, Sahu V, Basu D, Ohashi S, et al. IL-6 mediates cross-talk between tumor cells and activated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2018;78:4957–70.
- [70] Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery.* 1998;18:397–405.
- [71] Gaillard J, Pugnière M, Tresca J, Mani J, Klein B, Brochier J. Interleukin-6 receptor signaling. II. Bio-availability of interleukin-6 in serum. *Eur Cytokine Netw.* 1999;10:337–44.
- [72] Bressy C, Lac S, Nigri J, Leca J, Roques J, Lavaut MN, Secq V, Guillaumond F, Bui TT, Pietrasz D, et al. LIF drives neural remodeling in pancreatic cancer and offers a new candidate biomarker. *Cancer Res.* 2018;78:909–21.
- [73] Shi Y, Gao W, Lytle NK, Huang P, Yuan X, Dann AM, Ridinger-Saison M, DelGiorno KE, Antal CE, Liang G, et al. Targeting LIF-mediated paracrine interaction for pancreatic cancer therapy and monitoring. *Nature.* 2019;569:131–5.
- [74] Tsherniak A, Vazquez F, Montgomery PG, Weir BA, Kryukov G, Cowley GS, Gill S, Harrington WF, Pantel S, Krill-Burger JM, et al. Defining a Cancer Dependency Map. *Cell.* 2017;170:564-576.e16.
- [75] Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:307-36.
- [76] Nan Y, Wu C, Zhang YJ. Interferon Independent Non-Canonical STAT Activation and Virus Induced Inflammation. *Viruses.* 2018;10:196.
- [77] Hogendorf P, Durczyński A, Skulimowski A, Kumor A, Poznańska G, Strzelczyk J. Growth differentiation factor (GDF-15) concentration combined with Ca125 levels in serum is superior to commonly used cancer biomarkers in differentiation of pancreatic mass. *Cancer Biomark.* 2018;21:505-511.
- [78] Traeger L, Ellermann I, Wiethoff H, Ihbe J, Gallitz I, Eveslage M, Moritz R, Herrmann E, Schrader AJ, Steinbicker AU. Serum hepcidin and GDF-15 levels as prognostic markers in urothelial carcinoma of the upper urinary tract and renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2019;19:74.
- [79] Vocka M, Langer D, Fryba V, Petrtyl J, Hanus T, Kalousova M, Zima T, Petruzelka L. Growth/differentiation factor 15 (GDF-15) as new potential serum marker in patients with

- metastatic colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2018;21:869-874.
- [80] Li J, Veltri RW, Yuan Z, Christudass CS, Mandecki W. Macrophage inhibitory cytokine 1 biomarker serum immunoassay in combination with PSA is a more specific diagnostic tool for detection of prostate cancer. *PLoS One*. 2015;10:e0122249.
- [81] Roth P, Junker M, Tritschler I, Mittelbronn M, Dombrowski Y, Breit SN, Tabatabai G, Wick W, Weller M, Wischhusen J. GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Clinical Cancer Research*. 2010;16:3851–3859.
- [82] Wollert KC, Kempf T, Wallentin L. Growth differentiation factor 15 as a biomarker in cardiovascular disease. *Clin Chem*. 2017;63:140-151.
- [83] Yatsuga S, Fujita Y, Ishii A, Fukumoto Y, Arahata H, Kakuma T, Kojima T, Ito M, Tanaka M, Saiki R, et al. Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann Neurol*. 2015;78:814-823.
- [84] Zhao J, Li M, Chen Y, Zhang S, Ying H, Song Z, Lu Y, Li X, Xiong X, Jiang J. Elevated serum growth differentiation factor 15 levels in hyperthyroid patients. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;9:793.
- [85] Vila G, Riedl M, Anderwald C, Resl M, Handisurya A, Clodi M, Prager G, Ludvik B, Krebs M, Luger A. The relationship between insulin resistance and the cardiovascular biomarker growth differentiation factor-15 in obese patients. *Clin Chem*. 2011;57:309-316.
- [86] Patel S, Alvarez-Guaita A, Melvin A, Rimmington D, Dattilo A, Miedzybrodzka EL, Cimino I, Maurin AC, Roberts GP, Meek CL, et al. GDF15 provides an endocrine signal of nutritional stress in mice and humans. *Cell Metab*. 2019;29:707-718.e8.
- [87] Ji H, Lu HW, Li YM, Lu L, Wang JL, Zhang YF, Shang H. Twist promotes invasion and cisplatin resistance in pancreatic cancer cells through growth differentiation factor 15. *Mol Med Rep*. 2015;12:3841-3848..
- [88] Johnen H, Lin S, Kuffner T, Brown DA, Tsai VW, Bauskin AR, Wu L, Pankhurst G, Jiang L, Junankar S, et al. Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1. *Nat Med*. 2007;13:1333-1340.
- [89] Breen DM, Kim H, Bennett D, Calle RA, Collins S, Esquejo RM, He T, Joaquim S, Joyce A, Lambert M, et al. GDF-15 neutralization alleviates platinum-based chemotherapy-induced emesis, anorexia, and weight loss in mice and nonhuman primates. *Cell Metab*. 2020;32:938-950.e6.
- [90] Hendifar AE, Chang JI, Huang BZ, Tuli R, Wu BU. Cachexia, and not obesity, prior to pancreatic cancer diagnosis worsens survival and is negated by chemotherapy. *J Gastrointest Oncol*. 2018;9:17-23.
- [91] Barber MD, Ross JA, Fearon KC. Changes in nutritional, functional, and inflammatory markers in advanced pancreatic cancer. *Nutr Cancer*. 1999;35:106-110.

- [92] Gianotti L, Braga M, Radaelli G, Mariani L, Vignali A, Di Carlo V.. Lack of improvement of prognostic performance of weight loss when combined with other parameters. *Nutrition*. 1995;11:12-16.
- [93] Mitsunaga S, Kasamatsu E, Machii K. Incidence and frequency of cancer cachexia during chemotherapy for advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Support Care Cancer*. 2020;28:5271-5279.
- [94] Hromas R, Hufford M, Sutton J, Xu D, Li Y, Lu L. PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1354:40-44.
- [95] Yang H, Filipovic Z, Brown D, Breit SN, Vassilev LT. Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol Cancer Ther*. 2003;2:1023-1029.
- [96] Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA, Zahurak ML, Sato N, Fukushima N, Sokoll LJ, Chan DW, Yeo CJ, Hruban RH, et al. Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2386-2392.
- [97] Xue H, Lü B, Zhang J, Wu M, Huang Q, Wu Q, Sheng H, Wu D, Hu J, Lai M. Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. *J Proteome Res*. 2010;9:545-555.
- [98] Nishikawa H, Shiraki M, Hiramatsu A, Moriya K, Hino K, Nishiguchi S. Japan Society of Hepatology guidelines for sarcopenia in liver disease (1 st edition): Recommendation from the working group for creation of sarcopenia assessment criteria. *Hepatol Res*. 2016;46:951-963.
- [99] Okuyama T, Wang XS, Akechi T, Mendoza TR, Hosaka T, Cleeland CS, Uchitomi Y. Japanese version of the MD Anderson Symptom Inventory: a validation study. *J Pain Symptom Manage*. 2003;26:1093-1104.
- [100] Miura T, Mitsunaga S, Ikeda M, Ohno I, Takahashi H, Suzuki H, Irisawa A, Kuwata T, Ochiai A. Characterization of low active ghrelin ratio in patients with advanced pancreatic cancer. *Support Care Cancer*. 2018;26:3811-3817.
- [101] Watanabe K, Mitsunaga S, Kojima M, Suzuki H, Irisawa A, Takahashi H, Sasaki M, Hashimoto Y, Imaoka H, Ohno I, et al. The "histological replacement growth pattern" represents aggressive invasive behavior in liver metastasis from pancreatic cancer. *Cancer Med*. 2020;9:3130-3141.
- [102] Hennessy BT, Lu Y, Gonzalez-Angulo AM, Carey MS, Myhre S, Ju Z, Davies MA, Liu W, Coombes K, Meric-Bernstam F, et al. A technical assessment of the utility of reverse phase protein arrays for the study of the functional proteome in non-microdissected human breast cancers. *Clin Proteomics*. 2010;6:129-151.
- [103] Mertins P, Yang F, Liu T, Mani DR, Petyuk VA, Gillette MA, Clauser KR, Qiao JW, Gritsenko MA, Moore RJ, et al. Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13:1690-1704.

- [104] Hu J, He X, Baggerly KA, Coombes KR, Hennessy BT, Mills GB. Non-parametric quantification of protein lysate arrays. *Bioinformatics*. 2007;23:1986-1994.
- [105] Molfino A, Amabile MI, Imbimbo G, Rizzo V, Pediconi F, Catalano C, Emiliani A, Belli R, Ramaccini C, Parisi C, et al. Association between growth differentiation factor-15 (GDF-15) serum levels, anorexia and low muscle mass among cancer patients. *Cancers (Basel)*. 2020;13:99.
- [106] Lerner L, Gyuris J, Nicoletti R, Gifford J, Krieger B, Jatoi A. Growth differentiating factor-15 (GDF-15): A potential biomarker and therapeutic target for cancer-associated weight loss. *Oncol Lett*. 2016;12:4219-4223.
- [107] Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhorji G, Benfeitas R, Arif M, Liu Z, Edfors F, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017;357:eaan2507.
- [108] Tsai VW, Macia L, Feinle-Bisset C, Manandhar R, Astrup A, Raben A, Lorenzen JK, Schmidt PT, Wiklund F, Pedersen NL, et al. Serum levels of human MIC-1/GDF15 vary in a diurnal pattern, do not display a profile suggestive of a satiety factor and are related to BMI. *PLoS One*. 2015;10:e0133362.
- [109] Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, Boirie Y, Bosaeus I, Cederholm T, Costelli P, et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". *Clin Nutr*. 2010;29:154-159.
- [110] National Comprehensive Cancer Network. Palliative Care (version 2.2021). [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/palliative.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/palliative.pdf). Accessed February 12, 2021.
- [111] Jones D, Vichaya EG, Wang XS, Williams LA, Shah ND, Thomas SK, Johnson VE, Champlin RE, Cleeland CS, Mendoza TR. Validation of the M. D. Anderson Symptom Inventory multiple myeloma module. *J Hematol Oncol*. 2013;6:13.
- [112] Bedard G, Zeng L, Zhang L, Lauzon N, Holden L, Tsao M, Danjoux C, Barnes E, Sahgal A, Poon M, et al. Minimal clinically important differences in the Edmonton symptom assessment system in patients with advanced cancer. *J Pain Symptom Manage*. 2013;46:192-200.
- [113] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410:37-40.
- [114] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140:900-917.
- [115] Ye L, Zhao D, Xu Y, Lin J, Xu J, Wang K, Ye Z, Luo Y, Liu S, Yang H. LncRNA-Gm9795 promotes inflammation in non-alcoholic steatohepatitis via NF- $\kappa$ B/JNK pathway by endoplasmic reticulum stress. *J Transl Med*. 2021;19:101.
- [116] Kalli M, Stylianopoulos T. Defining the role of solid stress and matrix stiffness in cancer cell



proliferation and metastasis. *Front Oncol.* 2018;8:55.

- [117] Nia HT, Liu H, Seano G, Datta M, Jones D, Rahbari N, Incio J, Chauhan VP, Jung K, Martin JD, et al. Solid stress and elastic energy as measures of tumour mechanopathology. *Nat Biomed Eng.* 2016;1:0004.
- [118] Marchegiani G, Andrianello S, Malleo G, De Gregorio L, Scarpa A, Mino-Kenudson M, Maggino L, Ferrone CR, Lillemoe KD, Bassi C, et al. Does size matter in pancreatic cancer?: Reappraisal of tumour dimension as a predictor of outcome beyond the TNM. *Ann Surg.* 2017;266:142-148.
- [119] Appierto V, Tiberio P, Villani MG, Cavadini E, Formelli F. PLAB induction in fenretinide-induced apoptosis of ovarian cancer cells occurs via a ROS-dependent mechanism involving ER stress and JNK activation. *Carcinogenesis.* 2009;30:824-831.
- [120] Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, Brown DA, Liu T, Bauskin AR, Ward RL, Hawkins NJ, Quinn DI, Russell PJ, et al. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:3410-3415.

## 論文目録

### 主論文を構成する論文

#### 1. Interleukin 6/gp130 axis promotes neural invasion in pancreatic cancer.

(インターロイキン 6/gp130 経路による膵がん神経浸潤の促進)

Hidetaka Suzuki, Shuichi Mitsunaga, Masafumi Ikeda, Takao Aoyama, Kazumi Yoshizawa, Masayuki Yamaguchi, Masami Suzuki, Minoru Narita, Toshikatsu Kawasaki, Atsushi Ochiai.

Cancer Medicine 掲載予定

#### 2. Clinical and tumor characteristics of patients with high serum levels of growth differentiation factor 15 in advanced pancreatic cancer.

(血清 Growth differentiation factor 15 濃度高値の進行膵がん患者の臨床的特徴と腫瘍の特徴)

Hidetaka Suzuki, Shuichi Mitsunaga, Masafumi Ikeda, Takao Aoyama, Kazumi Yoshizawa, Hiroki Yoshimatsu, Norisuke Kawai, Mari Masuda, Tomofumi Miura,

Atsushi Ochiai.

Cancers, Vol.13, No.19, 4842. (2021 年 9 月)

DOI: 10.3390/cancers13194842

#### 参考論文

1. Characterization of low active ghrelin ratio in patients with advanced pancreatic cancer.  
Tomofumi Miura, Shuichi Mitsunaga, Masafumi Ikeda, Izumi Ohno, Hideaki Takahashi, Hidetaka Suzuki, Ai Irisawa, Takeshi Kuwata, Atsushi Ochiai.

Supportive Care in Cancer, Vol.26, No.11, pp.3811-3817 (2018 年 5 月)

DOI: 10.1007/s00520-018-4248-4.

2. Glucose prevents cisplatin-induced fatigue-like behavior in mice.  
Kazumi Yoshizawa, Aoi Yamane, Haruka Nasu, Hidetaka Suzuki.

PharmaNutrition, Vol.6, No.3, pp.107-112 (2018 年 9 月)

DOI: 10.1016/j.phanu.2018.06.001

3. The "histological replacement growth pattern" represents aggressive invasive behavior in liver metastasis from pancreatic cancer.  
Kazuo Watanabe, Shuichi Mitsunaga, Motohiro Kojima, Hidetaka Suzuki, Ai Irisawa, Hideaki Takahashi, Mitsuhito Sasaki, Yusuke Hashimoto, Hiroshi Imaoka, Izumi Ohno, Masafumi Ikeda, Tetsuo Akimoto, Atsushi Ochiai.

Cancer Medicine, Vol.9, No.9, pp.3130-3141 (2020 年 3 月)

DOI: 10.1002/cam4.2954.

4. The putative glyoxalase 1 inhibitor piceatannol exhibits both anxiolytic-like and antitumor effects in mice.  
Kazumi Yoshizawa, Mizuho Tabuchi, Saki Ukai, Hidetaka Suzuki, Yohei Kawano, Ryoko Takasawa.

Anticancer Research, Vol.40, No.6, pp.3271-3276 (2020 年 6 月)

DOI: 10.21873/anticancerres.14309.