

氏名（本籍） ^{すず} 鈴 ^き 木 ^{ひで} 秀 ^{たか} 隆（茨城県）
学位の種類 博士（薬学）
学位記番号 乙第 382 号
学位授与の日付 2022 年 3 月 19 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目 膵がん悪液質に関連する因子に関する検討

論文審査委員 （主査）教授 青山 隆夫
教授 野口 耕司 准教授 高澤 涼子
准教授 吉澤 一巳 教授 秋本 和憲

論文内容の要旨

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 (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 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 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。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、腫瘍量と相関する 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

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。

論文審査の結果の要旨

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。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。

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。第2章では、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。

悪液質促進因子 growth differentiation factor 15 (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、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いるが、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。膵がん神経浸潤モデルマウス (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した。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。

以上のことから、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

本章では、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した。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を用いて解析を行った。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、CRP 高値、carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) 高値、重篤な食欲不振であり、悪液質の特徴を有していた。さらに、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、このシグナル経路が活性化していることが明らかとなった。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、CA19-9 レベルと相関する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。

本章では、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た。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、悪液質症状の一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

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。抗ヒト IL-6R 抗体である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が期待される。

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。これらは、今後の創薬開発に大きく貢献するものであり、博士（薬学）の学位論文として十分に価値あるものと認められる。