

学位論文（博士）

Pancreatic Cancer Stem-Like Cells  
With High Calreticulin Expression  
Associated With Immune Surveillance

(カルレティキュリンを高発現した  
膵癌幹細胞様細胞は免疫逃避に関連している)

氏名 藤原 康弘

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器・腫瘍外科学講座

令和3年6月

## 目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	7
5. 考察	9
6. 謝辞	11
7. 参考文献	11
8. 図表	14

## 1. 要旨

膵癌幹様細胞 (P-CSLC) は予後不良と関連していると考えられている。以前、我々はプロテオミクス分析を用いて、食作用促進作用をもつシャペロンタンパク質であるカルレティキュリン (CALR) を同定し、P-CSLC に特異的タンパク質として報告した。本研究では、CALR の発現と P-CSLC の関連を検討した。

方法：ヒト膵癌細胞株である PANC-1 を、sphere 誘導培地を使用して培養した後に、ラミンコーティングされたティッシュ上で長期間培養し、PANC-1-Lm 細胞を得た。癌幹細胞の特性を調べるために、PANC-1-Lm を用いて免疫不全マウスへの異種移植と sphere formation assay を行った。また、フローサイトメトリーを用いて細胞表面の蛋白発現解析を行った。結果：PANC-1-Lm は、PANC-1 と比較して、細胞表面の CALR 陽性率、および Side-population 分画の割合が増加していた。また、PANC-1-Lm 細胞は、PANC-1 細胞よりも異種移植における腫瘍の増殖と sphere formation assay における sphere 形成の頻度が高かった。さらに、PANC-1-Lm から分取した CALR 高発現細胞は、PANC-1、PANC-1-Lm、CALR 低発現細胞に比べて高い sphere 形成能を示した。フローサイトメトリーでは CALR 高発現細胞では programmed death-ligand 1 (PD-L1) 陽性細胞の割合は増加したが、ヒト白血球抗原 (HLA) class1 陽性細胞の数は減少した。

結論：細胞表面での CALR 発現の上昇を示した P-CSLC は、癌幹細胞の特性に加えて、免疫逃避に関連している可能性がある。

## 2. 背景

膵癌は明確な症状がなく、早期診断が困難な癌種である。膵癌患者の多くは、転移を伴った進行癌の状態で見つかり、治癒的切除が施行できるのは 5~25%のみである。根治的切除後でも、5年生存率は 20%未満であり、生存期間の中央値は 12~20ヶ月と予後不良である(1)。その結果、膵癌患者の 5年生存率は約 9%にとどまる(2)。予後不良の原因として早期からの遠隔転移と高い薬剤耐性が考えられている。また、膵癌は癌幹細胞 (Cancer stem cell, 以下 CSC) の形成によって、転移能と抗がん剤耐性が高くなると報告されている(3, 4)。

消化器癌で形成される癌幹細胞は、自己複製、腫瘍形成の開始、治療抵抗性などの幹細胞のような特性を持っている(5)。これまでに、膵癌を含む様々な悪性腫瘍で多くの CSC が同定および精製されてきた(6)。さまざまな研究により、CSC が転移および術後再発に重要な役割を果たすことが示唆されている(7)。多くの研究により、ヒトの消化器癌における CSC マーカーが特定され、それらの役割が研究されている。これらのマーカーは正常な幹細胞でも発現している(5)。膵癌組織における CSC マーカー CD44 の発現と臨床病期、リンパ節転移、および分化度との間に有意な相関関係があることが報告されている。さらに、膵癌切除検体において CD44 の発現が高い患者は、CD44 の発現が低い患者よりも全生存期間が優位に短かった(8)。膵癌の予後を改善するには、CSC を治療目標とした新しい治療法の開発が必要である。

膵癌では、CD44、CD24、epithelial-specific antigen (ESA)などのいくつかの細胞表面マーカーが報告され、CSC の同定に使用されている(4)。自己複製と癌細胞への分化という2つの機能を持つ膵癌幹細胞が、CD44、CD24、およびESAを同時に発現する細胞群として最初に定義された(9)。さらに、CD133を発現する膵癌幹細胞は、薬剤耐性を含む、高い増殖能と腫瘍形成能を示した(3)。CD133陽性の膵癌幹細胞のうち、CD44 / CD24 / ESA陽性の細胞集団は10~40%とごく一部であった(3)。したがって、CD44、CD24、ESAなどの既知のマーカーを用いて膵癌幹細胞を同定するには限界があると考えられる(10)。

膵癌幹細胞は非常にまれな細胞集団であり、分離は困難である。CD44、CD24、およびESAの三重陽性細胞は腫瘍細胞全体の0.2~0.8%と報告されている(4)。膵癌幹細胞の特性を正確に調べるためには、大量の膵癌幹細胞が必要である。我々はこれまでに膵癌幹細胞様細胞(P-CSLC)を誘導する新しい技術を開発し、報告した。この方法により、無血清培地を用いて膵癌細胞株からCD44およびCD24を高発現した細胞集団を誘導した(11)。この誘導方法を用いて我々が確立した膵癌細胞株であるYamaguchi's Pancreatic Krebs (YPK)から、2次元電気泳動とタンデム質量分析に十分な細胞を誘導した。その結果、P-CSLCで特異的に発現するタンパク質を同定した(12)。これらのP-CSLCに特異的タンパク質の内、カルレティキュリン(CALR)は親細胞株と比較してP-CSLCの細胞表面に高発現していた。さらに、CALR高発現細胞は、ATP結合カセットトランスポーター活性と相関するSide-populationを非常に多く含み、CALRを高発現したP-CSLCが高い薬剤耐性を示すことを示唆している(12)。

カルレティキュリンは、主に小胞体内に局在する46~65 kDaのシャペロンタンパク質であり、Ca<sup>2+</sup> +ホメオスタシス、細胞接着、ヒト白血球抗原(HLA)クラスIなど、細胞代謝など、さまざまな役割を果たしている。また、細胞表面でのCALR発現が免疫反応に関連しており、アポトーシス細胞の細胞表面でのCALR発現が貪食を誘導する一方で、貪食を抑制するCD47発現も誘導することが報告されている(13)。

本研究では、市販の膵癌細胞株であるPANC-1を用いてP-CSLCの誘導を検証することを目的とした。さらに、CALRを発現するP-CSLCにおける免疫関連分子の発現を検討し、CSCと免疫逃避との関連を検討することを目的とした。

### 3. 方法

#### 【細胞株】

ヒト膵癌細胞株PANC-1をthe American Type Culture Collection (Rockville, Md.)から購入し、使用した。細胞は、10%熱不活化ウシ胎児血清(FBS) (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)、ペニシリン(100 U / mL)、およびストレプトマイシン(100 μg / mL)を含むDulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)を用いて37°C、5%CO<sub>2</sub>の加湿環境で培養した。

#### 【P-CSLCの誘導】



細胞を既報のように調整した神経幹細胞培地を用いて浮遊細胞として培養した(11)。sphere 誘導培地の基本組成は、10 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニウム塩、1×抗生物質-抗真菌溶液、および0.6%グルコースを添加した DMEM / F-12 (すべて Sigma-Aldrich) である。sphere 誘導培地は、上記に 2  $\mu$ g/ mL ヘパリン (Sigma-Aldrich)、10 ng / mL ヒト組換え上皮成長因子 (EGF, Sigma-Aldrich)、10 ng / mL 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF, Merck Millipore、東京、日本)、10 ng / mL leukemia inhibitory factor (LIF, Merck Millipore)、60  $\mu$ g/ mL N-アセチル-L-システイン (NAC, Sigma-Aldrich)、1×ホルモンミックス、2% neural survival factor-1 (NSF-1, Lonza, Tokyo, Japan) を添加して調整した。10 倍濃度のホルモンミックスは、1 mg / mL トランスフェリン、250  $\mu$ g/ mL インスリン、0.6 mM プトレシン、0.3  $\mu$ M 亜セレン酸ナトリウム、および0.2  $\mu$ M プログステロン (すべて Sigma-Aldrich から入手) にて調製した。

親株細胞を回収し、洗浄して血清を除去した後、sphere 誘導培地で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の加湿環境下で 1 週間培養した。得られた sphere 細胞を回収し、1%ラミニン (Sigma-Aldrich) でコーティングしたディッシュを用いた CSC 増殖培地に移した。CSC 増殖培地は、上記の sphere 誘導培地の基本組成に最終濃度がそれぞれ 20  $\mu$ L/ mL B27 サプリメント (Thermo Fisher Scientific)、2  $\mu$ g/ mL ヘパリン、10 ng / mL ヒト組換え EGF、10 ng / mL bFGF、1×ホルモンミックスとなるように添加・調製した。毎週、CSC 増殖培地の半分を交換した。4 週間後に得られた接着細胞を PANC-1-Lm とした。

#### 【フローサイトメトリー】

培養後、細胞を Accumax または Accutase (Innovative Cell Technologies、サンディエゴ、カリフォルニア州) を用いて剥離した。フローサイトメトリー分析のため、細胞に下記の蛍光標識抗体を反応させた。抗 CALR Alexa Fluor 647 (ab196159; Abcam、東京、日本)、抗 CD24 fluorescein isothiocyanate (FITC) (130-095-952; Miltenyi Biotec、東京、日本)、抗 CD44 phycoerythrin (PE) -Vio770 (130-113-336; Miltenyi Biotec)、抗 ESA Pacific Blue (324217; BioLegend、サンディエゴ、カリフォルニア州)、抗 programmed death-ligand 1 (PD-L1) PE (329706; BioLegend)、抗 HLA クラス I FITC (560965; BD、フランクリンレイクス、ニュージャージー州)、および抗 CD47 PE (556046; BD)。ウサギ IgG アイソタイプコントロール AlexaFluor 647 (ab199093; Abcam)、マウス IgG1 アイソタイプコントロール FITC (A07795; BECKMAN COULTER、東京、日本)、組換えヒト IgG1 REA コントロール (S) PE-Vio770 (130-113-440; Miltenyi Biotec)、ラット IgG2b  $\kappa$  アイソタイプコントロール抗体 Pacific Blue (400627; BioLegend)、マウス IgG2b  $\kappa$  アイソタイプコントロール PE (555743; BioLegend)、マウス IgG1  $\kappa$  アイソタイプコントロール FITC (555748、BD)、およびマウス IgG1  $\kappa$  アイソタイプコントロール PE (349043、BD) をそれぞれ抗 CALR Alexa Fluor 647、抗 CD24 FITC、抗 CD44 PE-Vio770、抗 ESA パシフィックブルー、抗 PD-L1 PE、抗 HLA クラス I FITC、抗 CD47 PE のネガティブコントロールとして用いた。フローサイトメトリー分

析は、FACSAria III (BD) または MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec) を使用した。

#### 【ウエスタンブロット分析】

細胞を、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM エチレンジアミン四酢酸、5 mM EGTA、0.2%SDS、0.5%Nonidet P-40、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、20 mM ピロリン酸ナトリウム、プロテアーゼ阻害剤 (Roche Diagnostics、東京、日本) を含む緩衝液で溶解した。次に、10 µg のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレン (Bio-Rad、カリフォルニア州) に転写した。メンブレンを 3% スキムミルクでブロックし、一次抗体で処理し、ECL Pro (PerkinElmer、ウォルサム、マサチューセッツ州) および Amersham Imager (GE Healthcare Life Sciences、東京、日本) を使用して免疫反応性バンドを可視化した。バンド密度は、ImageJ デンシトメトリー分析ソフトウェアバージョン 1.5.1 (National Institutes of Health、Bethesda、MD) を使用して定量化した。一次抗体として抗リン酸化-p44 / 42 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (extracellular signal-regulated kinase 1/2、ERK1 / 2) (#9101; Cell Signaling Technology、ダンバース、マサチューセッツ州) および抗バロシン-タンパク質 (valosin-containing protein、VCP) (GTX113030; Gene Tex、東京、日本) を使用した。VCP の発現レベルをもとに定量化した。

#### 【Side population 分析】

Side population (SP) 分析では、細胞を 1 x10<sup>6</sup> 個/ mL の濃度で 5%FBS 含有 DMEM / F12 に懸濁し、37°C で 30 分間、5 µg/ mL の Hoechst33342 (Sigma-Aldrich) と反応させた。2% FBS 含有 PBS で洗浄した後、細胞を 1 x10<sup>7</sup> 個/ mL の濃度で 2%FBS 含有 PBS に再懸濁し、BD LSRFortessa X-20 セルアナライザー (BD Biosciences、東京、日本) を使用して検討した。Hoechst33342 は 375nm のバイオレットレーザーで励起され、450/20 (Hoechst 33342-Blue) および 670 LP (Hoechst 33342-Red) の 2 つの経口波長が検出された。

#### 【皮下異種移植腫瘍モデル】

NOD-Rag1<sup>nu11</sup> IL2rg<sup>nu11</sup> に二重変異を持つマウス (NRG マウス) を Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) から購入し、オートクレーブ滅菌したケージ、餌、寝具を備えた高効率に粒子をろ過した環境下で飼育した。マウス (8~12 週齢、雄) に 10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、または 10<sup>4</sup> 個の細胞を 27 ゲージ針を用いて皮下注射した。100 日後、マウスを犠牲にして、腫瘍サイズを測定した。すべての動物実験は、山口大学の施設内動物管理使用委員会に従い、米国国立衛生研究所 (メリーランド州ベセスダ) が発行した実験動物の管理および使用に関するガイドを順守して実施した。

#### 【セルソーティング】

浮遊した細胞を the rabbit Alexa Fluor 647-conjugated anti-CALR (clone EPR3924;

Abcam, Cambridge, Mass.)と4℃で30分間反応させた。CALR高発現およびCALR低発現細胞をBD FACSAria III(BD Biosciences, San Jose, Calif.)を用いて分取した。

#### 【Sphere formation assay】

96ウェル超低付着プレート(Corning, Tokyo, Japan)に細胞が1, 10, 100細胞/100 $\mu$ Lの濃度となるように調整し、sphere誘導培地で培養した。7日間の培養後、sphereが形成されたウェルを数えた。

#### 【統計分析】

各実験は少なくとも3回繰り返した。データは平均(標準偏差)として表記した。有意差は、Rバージョン3.4.0ソフトウェア(R開発コアチーム、<http://www.r-project.org/>)を使用して、Fisher'sの直接確率検定、StudentまたはWelchのt検定にて評価した。P値<0.05を統計学的に有意であると判断した。

## 4. 結果

#### 【膵癌幹細胞様細胞(P-CSLC)の誘導】

PANC-1は、DMEM / F-12で培養すると接着形態を示したが(図1A)、sphere誘導培地で培養するとsphereを形成した(図1B)。浮遊細胞として培養を始め、数日以内にsphereの形成が観察され、1週間の培養後にsphereは直径約200 $\mu$ mになった(図1B)。その時点で、sphereをラミニンでコーティングされたディッシュに移し、接着細胞としてCSC増殖培地で1ヶ月間培養した(図1C)。

#### 【P-CSLCにおける細胞表面CALR発現およびERK1 / 2リン酸化レベル】

教室にて確立したヒト膵癌細胞株(YPK-2およびYPK-5)(12)でsphere形成の過程において誘導されることが示されたCALRの細胞表面での発現は、PANC-1-Lmでも確認されたが、PANC-1では確認されなかった(図2)。ERK1 / 2のリン酸化はCALRの小胞体から細胞表面への移行に関連していることが報告されている(14)。ERK1 / 2リン酸化の発現レベルを検討したところ、PANC-1-Lm細胞ではPANC-1細胞と比較して約5倍高発現していた(図3)。

#### 【P-CSLCにおけるSide-population】

主にATP結合カセットサブファミリーGメンバー2によって行われるHoechst33342の排出能力を有する細胞は、SP分画に分類される。PANC-1におけるHoechst33342排出するSP分画の割合はわずか1.1%であったが、PANC-1-Lmでは62.3%であった(図4AおよびD)。PANC-1では、SP分画および非SP分画ともにCALRの細胞表面発現を示さなかった(図4BおよびC)。一方で、PANC-1-LmではSP分画と非SP分画ともにCALR陽性細胞を認

めた (図 4E および F)。非 SP 分画の CALR 発現は中程度の強度を示したが、SP 分画では非 SP 分画よりも高い CALR 発現を示した。

#### 【皮下異種移植腫瘍モデルによる P-CSLC の腫瘍形成能と腫瘍増殖能】

ラミニンコーティングしたディッシュで増殖させた PANC-1-Lm の腫瘍形成能を検討した (図 5)。PANC-1-Lm および PANC-1 を、NRG マウスの右脇腹および左脇腹にそれぞれ接種した。100 日後、マウスを犠牲にして、腫瘍を切除した。腫瘍形成の頻度は、PANC-1 接種群よりも PANC-1-Lm 接種群の方が高かった (表 1)。PANC-1-Lm は、 $10^2$  個の細胞接種した群で腫瘍を形成したが、PANC-1 は  $10^3$  個の細胞の接種した群でも腫瘍形成を認めなかった。 $10^4$  細胞を接種した両群のマウスでは、PANC-1-Lm 接種群の腫瘍サイズは PANC-1 接種群の腫瘍サイズよりも有意に大きかった ( $198.5 [24.7] \text{ mm}^3$  対  $4.3 [28.5] \text{ mm}^3$ ,  $P = 0.005$ )。

#### 【CALR 高発現細胞および CALR 低発現細胞の Sphere 形成能】

また、細胞の自己複製能力を評価するために、Sphere formation assay を行った。PANC-1 細胞および PANC-1-Lm 細胞に加えて、FACS ソーティングを使用して PANC-1-Lm 細胞から得られた CALR 高発現細胞および CALR 低発現細胞を検討した (表 2)。1 ウェルに 1 個の細胞ではいずれの細胞でも Sphere 形成は認めなかった。1 ウェルあたり 10 個の細胞を播種した場合、CALR 高発現細胞のみが Sphere を形成した。1 ウェルあたり 100 個の細胞を播種した場合、CALR 低発現細胞は Sphere を形成しなかったが、残りの PANC-1 細胞 (5.0%)、PANC-1-Lm 細胞 (46.2%)、および CALR 高発現細胞 (100.0%) は Sphere を形成した。

#### 【CSC マーカーの発現】

PANC-1 および PANC-1-Lm のほぼすべての細胞が CD44 陽性であった (図 6A および C)。各細胞群の CD44 陽性細胞を CD24 および ESA の発現に基づいてさらに分類した (図 6B および D)。PANC-1 および PANC-1-Lm 細胞における CD44、CD24、および ESA の三重陽性の細胞画分は、それぞれ 0.8 および 2.7% であった。CD44 陽性細胞における細胞表面 CALR 発現を、CD24 および ESA の発現に別に検討した (図 6B1-4 および 6D1-4)。CALR 陽性細胞の割合が最も高かったのは、PANC-1-Lm 細胞の三重陽性細胞であった。対照的に、PANC-1 細胞は、4 つの画分すべてで CALR 発現が陽性の細胞集団は少なかった (3.1~12.0%)。

#### 【P-CSLC における癌免疫関連分子の発現】

細胞表面 CALR 発現と免疫応答の関係が報告されているため、PANC-1 由来細胞における PD-L1、HLA クラス I、および CD47 の細胞表面発現を検討した (13)。PANC-1-Lm および CALR 高発現群では、PANC-1 よりも PD-L1 陽性細胞の割合が高かった (PANC-1-Lm、CALR 高発現群、および PANC-1 でそれぞれ 8.6%、30.6%、および 4.8%) (図 7A-C)。逆に、HLA

クラス I 陽性細胞の割合は、PANC-1-Lm (47.6%) および CALR 高発現群 (38.3%) で、PANC-1 (95.7%) と比較して低下した (図 7D-F)。CD47 陽性細胞の割合は PANC-1-Lm および CALR 高発現群では PANC-1 よりも低かった (PANC-1; 96.0%、PANC-1-Lm; 37.1%、CALR<sup>high</sup>; 38.9%、図 7G-I)。

## 5. 考察

本研究では、PANC-1-Lm は、市販のヒト膵癌細胞株 PANC-1 を使用して、以前に報告した CSLC 誘導/濃縮法にて P-CSLC として誘導した (図 1) (11)。得られた PANC-1-Lm は、SP 画分の増加 (図 4)、sphere 形成能 (表 2)、および腫瘍形成能 (表 1) を含む P-CSLC の特徴を有していた。SP 画分の分収は幹細胞収集の方法として知られており、消化器癌細胞の SP 画分は高い腫瘍形成能を持っていることが報告されている (15, 16)。Sphere formation assay は非接着条件下での細胞の自己複製能を示す (17)。膵癌では、Sphere 形成細胞が抗癌剤耐性、細胞増殖能、転移能、および SP 画分が豊富であることが報告されている (18-20)。免疫不全マウスを使用した腫瘍形成能の検討は CSC 特性を検討するための一般的な方法である (21)。膵癌において、膵癌幹細胞 (P-CSC) の細胞表面マーカーである CD44、CD24、および ESA 陽性の細胞は、腫瘍形成能の高い細胞集団である (4)。新しい癌細胞を生成する自己複製能と腫瘍形成能は CSC の重要な特性である (22)。したがって、PANC-1 から得られた PANC-1-Lm は他の細胞株をもちいた既報で示されたように P-CSLC の特徴を持っていると考えた (18-21)。

私たちの以前のプロテオミクス分析は、CALR の発現レベルが YPK-2 および YPK-5 よりも P-CSLC である YPK-2-Lm、および YPK-5-Lm で高かったことを示した (12)。興味深いことに、CALR 高発現は細胞表面では確認されたが、細胞質全体では認めなかった (12)。本研究では、PANC-1 細胞の細胞表面で CALR 発現はほとんど観察されなかったが、PANC-1-Lm において細胞表面で CALR の高発現を示した (図 2)。さらに、PANC-1-Lm の SP 画分で細胞表面での CALR 高発現が観察された (図 4E および F)。PANC-1-Lm 細胞の SP 画分における CALR の発現レベルは、二峰性であった。これから CALR 陽性細胞には P-CSLC だけでなく非 P-CSLC も含まれていることが示唆された。上記の CD24 / CD44 / ESA 陽性細胞に加えて、CD133 の高発現膵癌細胞は、化学療法に対する薬剤耐性、高い増殖能、および腫瘍形成能の増加を伴う P-CSC として報告されている (3)。他にもいくつかの P-CSC マーカーも報告されているが、P-CSC の不均一性により、発現パターンには部分的な重複しかない (10)。各 P-CSC マーカーによって P-CSC の一部を判別することはできるかもしれないが、P-CSC マーカーを複雑に組み合わせても、P-CSC の普遍的なマーカーを特定するのは難しいと思われる。

カルレティキュリンは、主に小胞体内に存在する 46~65kDa のシャペロンタンパク質である。カルシウムホメオスタシスや細胞接着などの細胞内代謝に関与していることが報告されている (23)。我々は既報と本研究において、P-CSLC における CALR の細胞表面局在の重要性を示している (12)。カルレティキュリンは、通常、小胞体内に存在し、ERK のリン酸化

を介して細胞表面への CALR 移行を引き起こすと報告されている (14)。PANC-1-Lm 細胞で ERK のリン酸化が観察されており、細胞表面での CALR 発現は、ERK シグナル伝達の活性化によって引き起こされた可能性がある (図 3)。さらに、CALR の発現は発癌、癌の治療抵抗性の増強、および上皮間葉転換の促進に関連していることが報告されている (24)。CALR の発現に関連するこれらの性質は、CSC の特性にも似ている。実際、PANC-1-Lm の CALR 高発現細胞群は最高の sphere 形成率を示したが、PANC-1-Lm の CALR 低発現細胞群では sphere 形成は認めなかった (表 2)。PANC-1-Lm CD44 陽性細胞のうち CD24 / ESA に基づいて分けられた集団の中で、CALR 陽性率は CD24 / CD44 / ESA 陽性細胞で最も高かった (図 6D1-4)。したがって、CALR 発現は CSC を反映している可能性がある。

CALR のもう 1 つの既知の役割は、MHC クラス I および CD47 に関連する免疫応答の調節である (13, 25)。この研究では、HLA クラス I と CD47 の両方の発現低下が P-CSLC で観察された (図 7D-I)。さらに、T 細胞の疲弊受容体のリガンドである PD-L1 (26) の発現は、CALR の発現とともに増加した (図 7A-C)。P-CSC の免疫回避は、T 細胞活性化における共刺激分子の減少と、PD-L1 を含む抑制分子の増加の両方によると報告されている (27)。細胞表面の HLA クラス I の発現低下は抗原提示の低下を引き起こし、T 細胞による免疫監視からの逃避を起こす (28)。ただし、HLA クラス I の発現が失われた細胞は、ナチュラルキラー細胞によって攻撃される可能性がある (29)。最近、膵癌の免疫回避が、MHC クラス I の発現低下に基づくオートファジーによって誘導されたことが報告されている (30)。細胞表面での CALR の発現増加が HLA クラス I 発現を減少させるメカニズムは不明である。小胞体から細胞表面への CALR の移行は、抗原/HLA 複合体形成の促進における CALR の役割を減弱させる可能性がある。CALR のアンタゴニストとして作用する CD47 の発現により、癌細胞はマクロファージによる貪食を回避することができる (13)。しかし、本研究では、免疫抑制に働く CD47 の発現は P-CSLC で減少したが、P-CSLC における PD-L1 発現増加と HLA クラス I 分子の発現低下は、T 細胞による免疫監視からの逃避を示唆する。一方で、CD47 の発現低下は、細胞の自己複製、非対称分裂、および分化能を増加させることが報告されている (31, 32)。CD47 発現低下は、P-CSLC の自己複製能を増強する可能性を示唆される。

膵癌患者における PD-1 / PD-L1 を標的とした免疫療法は、多施設第 I 相試験では効果を見とめなかった (33)。しかし、PD-L1 と c-Myc の共発現を伴う膵癌は全生存期間が短かった (34)。皮下異種移植腫瘍モデルでは、c-Myc の阻害剤である JQ1 と抗 PD-L1 抗体の組み合わせが、膵管腺癌の増殖を相乗的に阻害することが報告されている (34)。MYC タンパク質は、PD-L1 だけでなく CD47 の発現に対する正の制御因子としても報告されている (35)。この研究で検討した免疫関連分子はごくわずかであり、CALR による免疫系の調整メカニズムは不明であるが、CALR レベルが上昇した P-CSLC において、免疫関連分子である PD-L1 および HLA クラス I の発現の変化が観察された。本研究は、CALR をターゲットに含む複合免疫標的療法が P-CSLC に有効である可能性を示唆している。

## 6. 謝辞

本研究にあたり、ご指導頂いた永野浩昭教授に深甚なる謝意を表します。また、直接ご指導を賜りました恒富亮一先生に心より拝謝申し上げます。また技術的支援をしていただいた佐野昭子さんに深謝いたします。

## 7. 参考文献

1. Fischer R, Breidert M, Keck T, et al. Early recurrence of pancreatic cancer after resection and during adjuvant chemotherapy. *Saudi J Gastroenterol.* 2012;18:118-121.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69:7-34.
3. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007;1:313-323.
4. Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007;67:1030-1037.
5. Tsunedomi R, Yoshimura K, Suzuki N, et al. Clinical implications of cancer stem cells in digestive cancers: acquisition of stemness and prognostic impact. *Surg Today.* 2020;50:1560-1577.
6. Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, et al. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2011;33:208-215.
7. Kucia M, Reza R, Miekus K, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells.* 2005;23:879-894.
8. Li XP, Zhang XW, Zheng LZ, et al. Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:6724-6731.
9. Bednar F, Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells and relevance to cancer treatments. *J Cell Biochem.* 2009;107:40-45.
10. Ishiwata T, Matsuda Y, Yoshimura H, et al. Pancreatic cancer stem cells: features and detection methods. *Pathol Oncol Res.* 2018;24:797-805.
11. Watanabe Y, Yoshimura K, Yoshikawa K, et al. A stem cell medium containing neural stimulating factor induces a pancreatic cancer stem-like cell-enriched population. *Int J Oncol.* 2014;45:1857-1866.
12. Matsukuma S, Yoshimura K, Ueno T, et al. Calreticulin is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells. *Cancer Sci.* 2016;107:1599-1609.

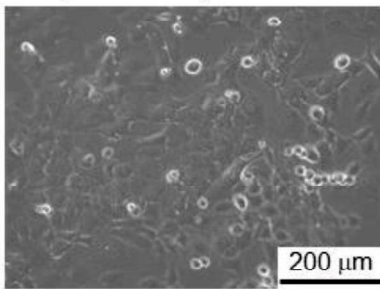
13. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med.* 2010;2:63ra94.
14. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* 2009;28:578-590.
15. Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology.* 2006;44:240-251.
16. Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells.* 2006;24:506-513.
17. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63:5821-5828.
18. Yin T, Wei H, Gou S, et al. Cancer stem-like cells enriched in Panc-1 spheres possess increased migration ability and resistance to gemcitabine. *Int J Mol Sci.* 2011;12:1595-1604.
19. Gaviraghi M, Tunici P, Valensin S, et al. Pancreatic cancer spheres are more than just aggregates of stem marker-positive cells. *Biosci Rep.* 2011;31:45-55.
20. Gou S, Liu T, Wang C, et al. Establishment of clonal colony-forming assay for propagation of pancreatic cancer cells with stem cell properties. *Pancreas.* 2007;34:429-435.
21. Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005;65:10946-10951.
22. Abbaszadegan MR, Bagheri V, Razavi MS, et al. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J Cell Physiol.* 2017;232:2008-2018.
23. Lu YC, Weng WC, Lee H. Functional roles of calreticulin in cancer biology. *Biomed Res Int.* 2015;2015:526524.
24. Wu Y, Xu X, Ma L, et al. Calreticulin regulates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transition through modulating Smad signaling and calcium signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;90:103-113.
25. Neerincx A, Hermann C, Antrobus R, et al. TAPBPR bridges UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 onto MHC class I to provide quality control in the antigen presentation pathway. *Elife.* 2017;6:e23049.
26. Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, et al. Cancer immunotherapies targeting



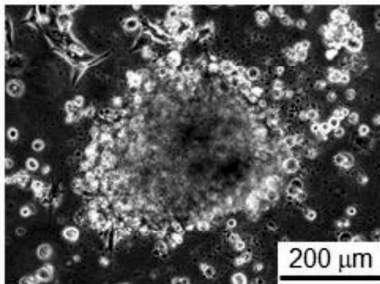
the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci.* 2017;24:26.

27. Hou YC, Chao YJ, Hsieh MH, et al. Low CD8(+) T Cell Infiltration and High PD-L1 Expression Are Associated with Level of CD44(+)/CD133(+) Cancer Stem Cells and Predict an Unfavorable Prognosis in Pancreatic Cancer. *Cancers.* 2019;11:541.
28. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer.* 2010;127:249-256.
29. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990;11:237-244.
30. Yamamoto K, Venida A, Yano J, et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature.* 2020;581:100-105.
31. Kaur S, Elkahlon AG, Singh SP, et al. A function-blocking CD47 antibody suppresses stem cell and EGF signaling in triple-negative breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7:10133-10152.
32. Kaur S, Soto-Pantoja DR, Stein EV, et al. Thrombospondin-1 signaling through CD47 inhibits self-renewal by regulating c-Myc and other stem cell transcription factors. *Sci Rep.* 2016;3:1673.
33. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012;366:2455-2465.
34. Pan Y, Fei Q, Xiong P, et al. Synergistic inhibition of pancreatic cancer with anti-PD-L1 and c-Myc inhibitor JQ1. *Oncoimmunology.* 2019;8:e1581529.
35. Casey SC, Tong L, Li Y, et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science.* 2016;352:227-231.

A (PANC-1)



B (PANC-1-sphere)



C (PANC-1-Lm)

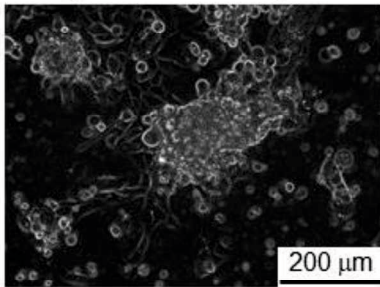


図 1. PANC-1 から誘導した細胞の形態

- A) DMEM / F-12 で培養された PANC-1 細胞は接着形態を示す。
- B) PANC-1 細胞を sphere 誘導培地に懸濁し、材料と方法に記載されているように 1 週間培養した。
- C) 得られた PANC-1 sphere をラミネンコーティングディッシュに移し、sphere 培養培地で 1 ヶ月間培養し、PANC-1-Lm を得た。

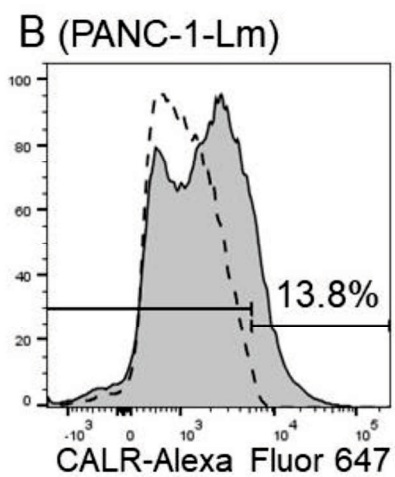
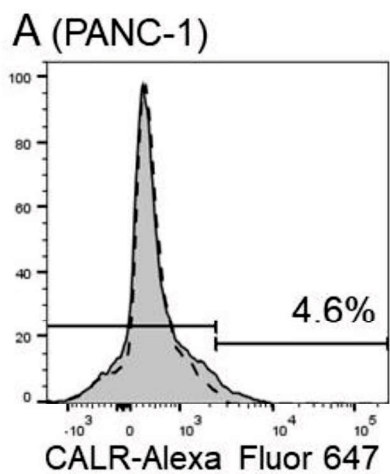


図2. CALR の細胞表面発現

細胞を AlexaFluor 647 標識抗 CALR 抗体で染色し、フローサイトメーターにて検討した。PANC-1-Lm 細胞の CALR 陽性細胞集団 (B) は、親 PANC-1 細胞の集団 (A) よりも高かった。灰色のヒストグラムと点線は、それぞれ抗 CALR 抗体とアイソタイプコントロール抗体で染色された細胞を表す。

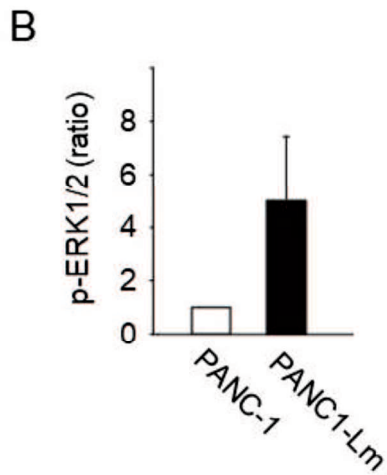
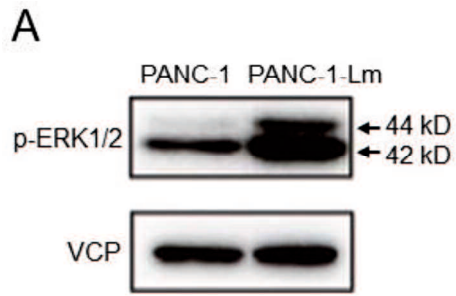


図3. P-CSLC のリン酸化 ERK1 / 2 の発現

- A) PANC-1 および PANC-1-Lm における p-ERK1 / 2 (44/42 kd) 発現を Westernblot 法にて検討。バロシン含有タンパク質 (VCP) をローディングコントロールとして使用した。
- B) バンド密度を定量化した後、VCP に正規化した。強度は、PANC-1 に対する相対値として表示した。

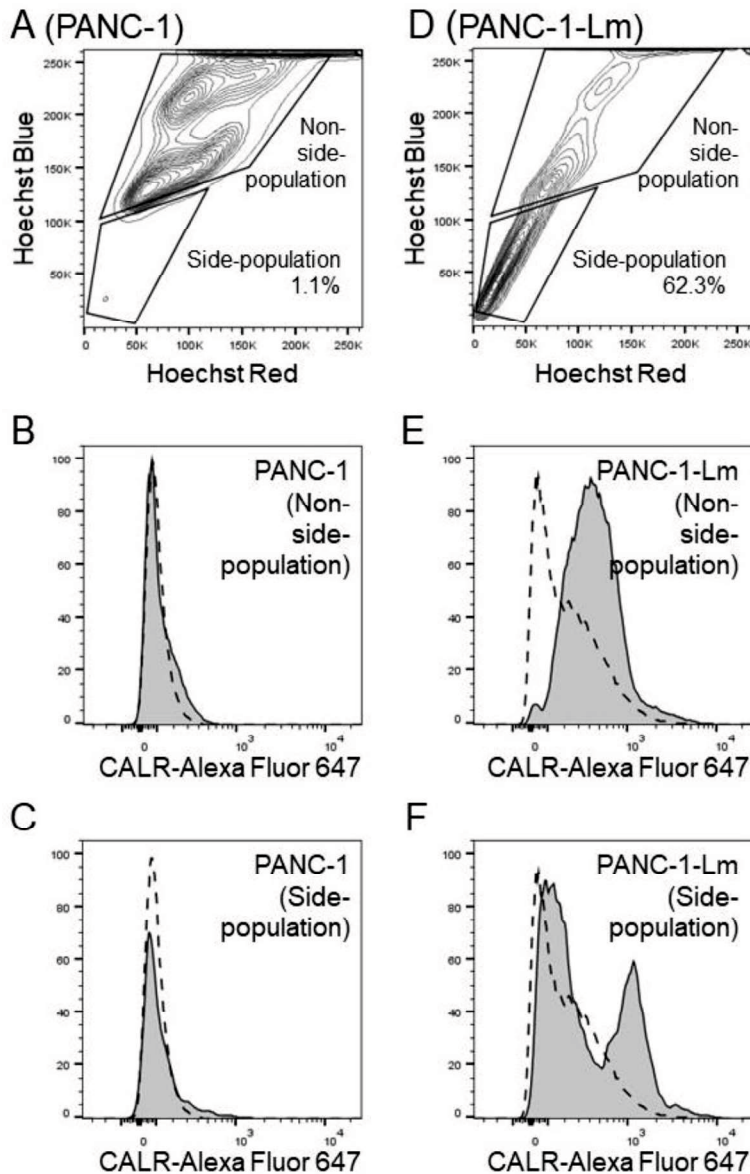


図 4. PANC-1 由来細胞における SP 細胞

細胞を AlexaFluor 647 標識抗 CALR 抗体で染色し、Hoechst33342 と反応させ、フローサイトメトリーにて検討をおこなった。PANC-1 (A) と PANC-1-Lm (D) で二重蛍光シグナルを検出しました。左のゲートは SP 細胞であり、右上側のゲートは非 SP 細胞とした。

PANC-1-Lm (E) の非 SP 画分の CALR 発現は、PANC-1 (B) の発現よりも高かった。PANC-1-Lm (F) の SP 細胞は、PANC-1 (C) の SP 細胞よりも高い CALR 発現を示した。灰色のヒストグラムと点線は、それぞれ抗 CALR 抗体とアイソタイプコントロール抗体で染色された細胞を表す。

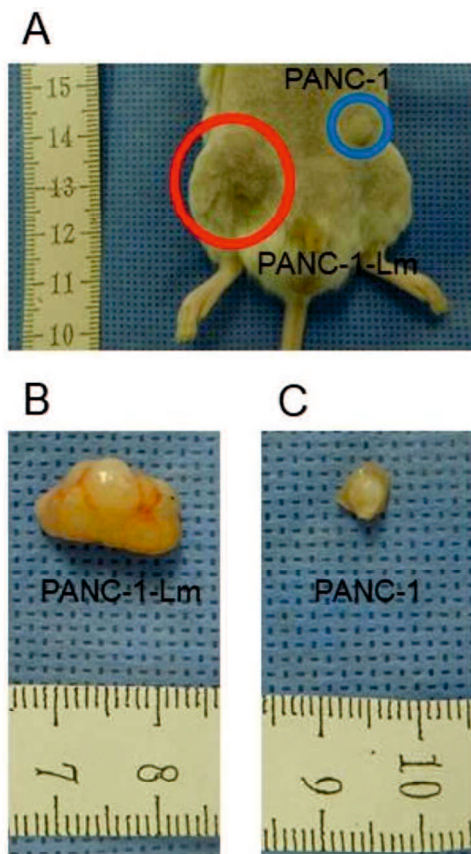


図 5. 異種移植モデルにおける P-CSPC の腫瘍形成性能  
 腫瘍形成能を NRG マウスへの皮下注射によって評価した。  
 A)  $10^4$  個の PANC-1-Lm 細胞と同数の PANC-1 細胞をそれぞれ右脇腹と左脇腹に接種した。  
 B, C) 100 日後、形成された腫瘍を切除して測定した。

Cells	Frequency (%)	
	PANC-1	PANC-1-Lm
$10^2$	0/6 (0.0)	2/6 (33.3)
$10^3$	0/7 (0.0)	3/7 (42.9)
$10^4$	3/6 (50.0)	4/6 (66.7)

表 1. 異種移植モデルにおける腫瘍形成率  
 表示された数の細胞を NRG マウスへの皮下注射し、100 日後の腫瘍形成をカウントした。

Cells	Frequency (%)			
	PANC-1	PANC-1-Lm	CALR <sup>low</sup>	CALR <sup>high</sup>
1	0/20 (0.0)	0/26 (0.0)	0/27 (0.0)	0/26 (0.0)
10	0/20 (0.0)	0/28 (0.0)	0/25 (0.0)	6/25 (24.0)
100	1/20 (5.0)	12/26 (46.2)	0/25 (0.0)	25/25 (100.0)

表 2. Sphere 形成率

96 ウェルプレートに表示された数の細胞を播種して Sphere 形成を数えた。

CALR<sup>low</sup> および CALR<sup>high</sup> 細胞は、PANC-1-Lm 細胞から Flowcytometry にてソーティングした。

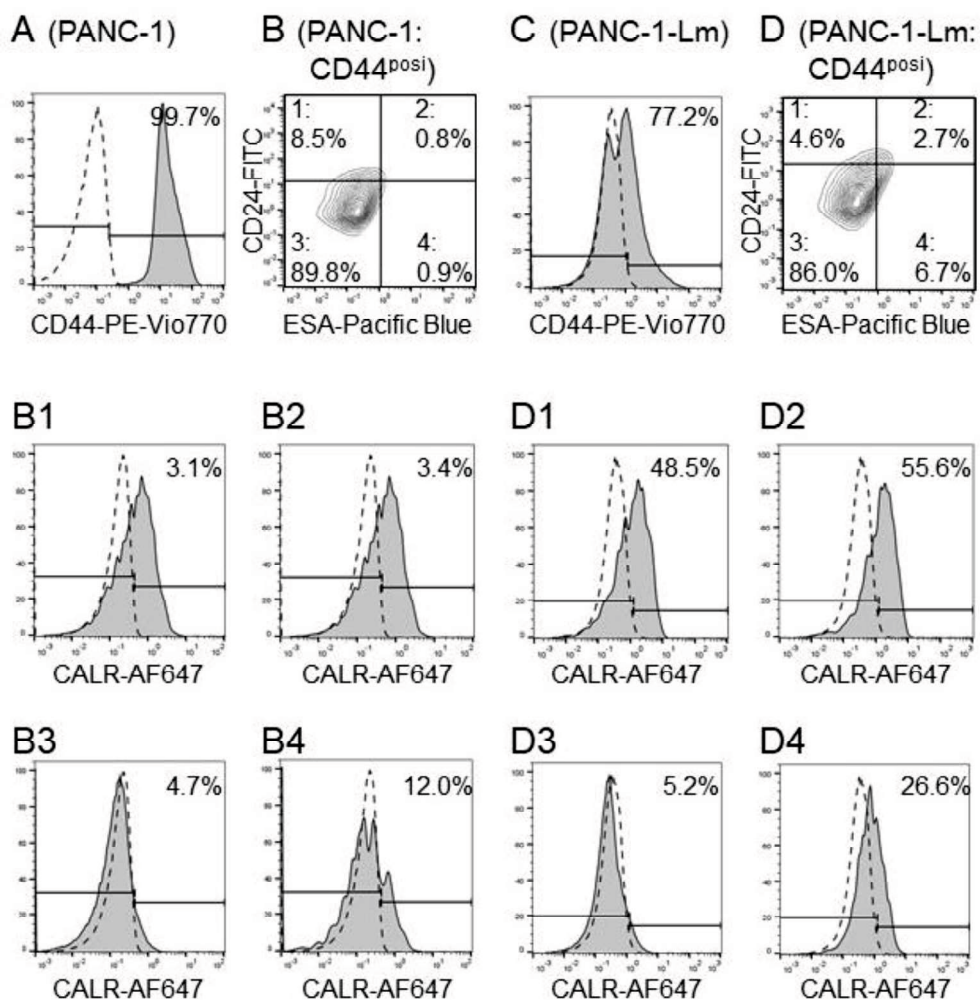


図6 CD24 + / CD44 + / ESA +細胞における CALR 発現

細胞を抗 CD44 抗体、抗 CD24 抗体、抗 ESA 抗体、抗 CALR 抗体で同時に染色し、フローサイトメーターを使用して検討した。PANC-1 細胞 (A) と PANC-1-Lm 細胞 (C) のうち、ほとんどのすべての細胞が CD44 陽性であった。PANC-1 細胞 (B)、PANC-1-Lm 細胞 (D) における CD44 の陽性細胞を、それぞれ CD24 および ESA の発現に基づいて 4 つの集団に分けた。CD44、CD24、または ESA の高発現は、各アイソタイプコントロール陽性細胞の上位 1% のカットオフラインで決定した。各グループ (B1-B4 および D1-D4) での CALR の発現を調べました。灰色のヒストグラムと点線は、それぞれ抗標的抗体とアイソタイプコントロール抗体で染色された細胞を表す。



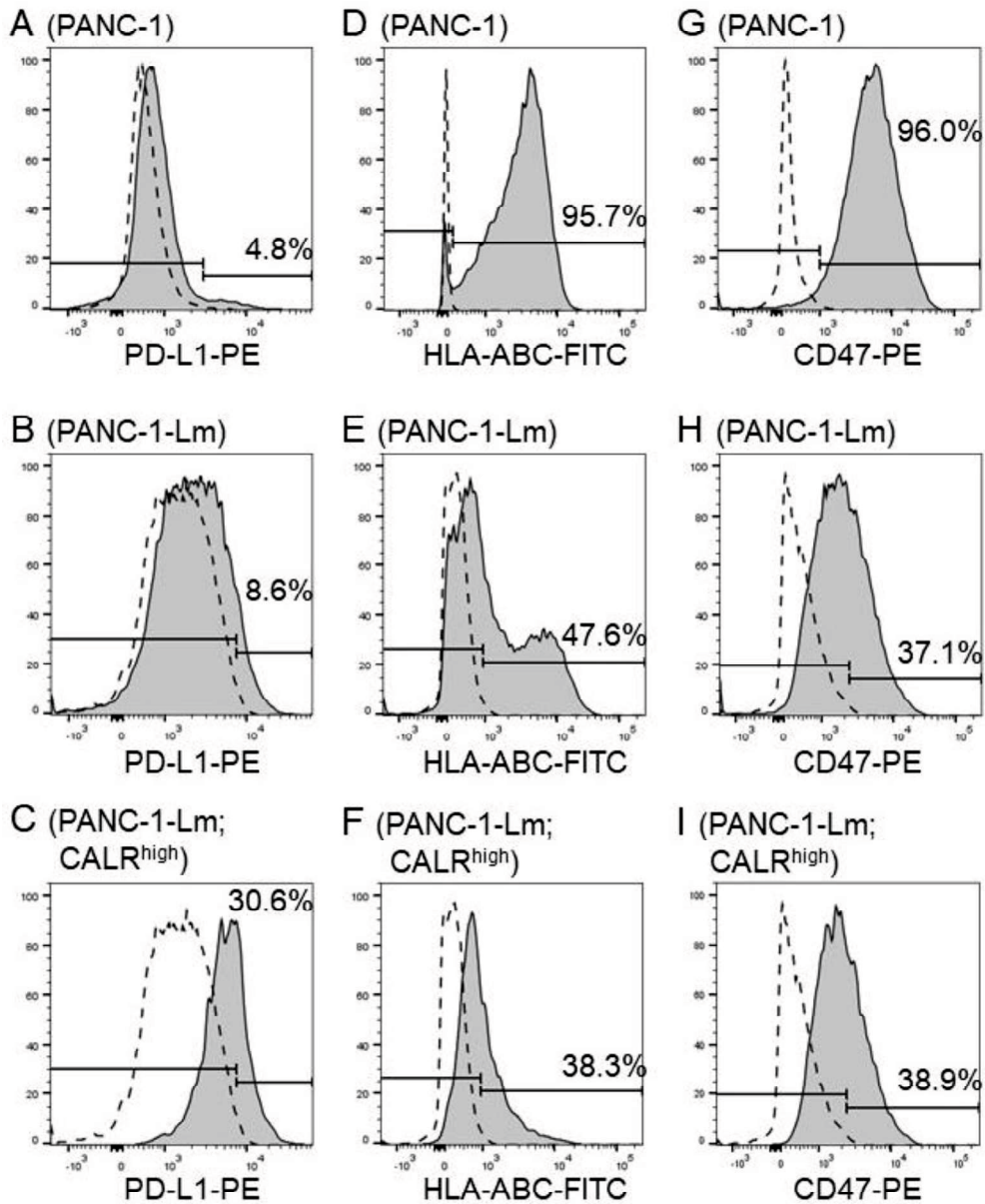


図7 P-CSLCにおけるPD-L1、HLAクラスI、およびCD47の発現  
 それぞれ細胞表面でのPD-L1 (A-C)、HLAクラスI (D-F)、CD47 (G-I)の発現を示す。  
 細胞はPANC-1 (A, D, G), PANC-1-Lm (B, E, H), PANC-1-Lm;CALR<sup>high</sup> (C, F, I)。  
 灰色のヒストグラムが、抗PD-L1、抗HLAクラスI、または抗CD47抗体で染色された細胞  
 を表し、点線はアイソタイプコントロール抗体で染色された細胞を示す。