

＜研究課題＞ **膵臓がん細胞の老化誘導と老化細胞除去療法の開発**

代表研究者：東京都健康長寿医療センター研究所 研究部長 石渡俊行
共同研究者：東京都健康長寿医療センター研究所 研究員 五味不二也
東京都健康長寿医療センター研究所 研究員 佐々木紀彦

【抄録】 (386/400字)

膵臓がんは高齢者に多く発症し、5年生存率は10%程度の難治性がんである。約半数の膵臓がん症例では、がん細胞に線維芽細胞増殖因子受容体のFGFR4が発現している。FGFR4阻害剤のBLU9931を投与すると膵臓がん細胞の増殖と浸潤が抑制されるとともに、がん細胞の細胞老化がみられ、ケルセチンの投与により細胞老化に陥った膵臓がん細胞を細胞死に誘導できることを以前に報告した。本研究では、進行した肝臓がん患者に対して臨床試験が実施され有効性が報告されているFGFR4阻害剤のBLU-554 (Fisogatinib)の膵臓がん細胞への抗腫瘍効果と老化誘導について検討した。BLU-554の投与により膵臓がん細胞の増殖能と浸潤能は低下し、老化細胞の増加が認められた。今後、BLU-554が細胞増殖と浸潤の抑制および老化誘導を介した、新たな膵臓がんの治療法となる可能性が示唆された。

1. 研究の目的

膵臓がんは高齢者に多く発症し、早期診断が困難なことから、約80%の患者は手術ができない進行がんで発見される。現在、進行がんの有効な治療法はなく、膵臓がんの5年生存率は10%程度と極めて低い。膵臓がんは本邦では、がん死の第4位、米国ではがん死の第3位であるが、高齢化が進むことから今後増加すると考えられており、2030年には米国ではがん死の第2位になると予想されている。

線維芽細胞増殖因子受容体の fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4)は、線維芽細胞増殖因子の FGF-19 と特異的に結合す

る受容体である。FGFR4は乳がん、前立腺がん、肝細胞がん、卵巣がん、胃がん、大腸がんなどで過剰発現し、がんの増殖に関与していると考えられている。膵臓がんにおいてもFGFR4は約半数の症例の、がん細胞膜上に高発現しており、FGFR4の発現と腫瘍の大きさ、進行度（ステージ）が相関していることを以前に報告した。さらに、FGFR4を高発現している膵臓がん細胞株は、FGFR1-3の発現が低いことから、FGFR4を標的とした新たな膵臓がんの治療法の開発が必要である。

BLU9931はFGFR4の小分子化合物でFGFR4の阻害剤である。BLU9931はFGFR1-3には存在しない、FGFR4のATP結合ポケット内の

Cys552 と共有結合するため、FGFR4 を選択的に阻害する。BLU9931 を投与して FGFR4 のシグナル伝達系を阻害することで、膵臓がん細胞の増殖能と浸潤能の低下がみられた。さらに、BLU9931 投与により核内の DNA 傷害がおり、細胞老化が誘導されることを報告した。老化した膵臓がん細胞は SASP 因子を高発現しており、老化細胞除去剤として知られるケルセチンによって細胞死が誘導された。これらのことから、膵臓がん細胞の FGFR4 のシグナル伝達阻害による新たな老化誘導療法の可能性が明らかとなった。

BLU-554 (Fisogatinib) も BLU9931 と同様の機序で、選択的に FGFR4 のシグナル伝達を阻害する小分子化合物である。BLU-554 はすでに、進行した肝細胞がんに対する抗がん剤としてフェーズ I の臨床試験がなされ、有効性が報告されている。今回、FGFR4 阻害剤による老化誘導療法の臨床応用を考え、BLU-554 の膵臓がんに対する抗腫瘍効果と、老化誘導能について培養細胞株を用いて検討した。

2. 研究の方法・経過

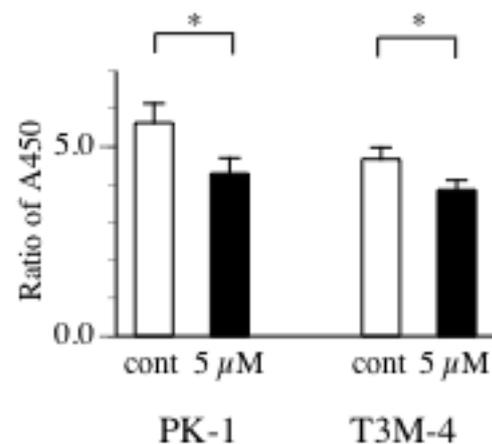
FGFR4 を高発現しているヒト膵臓がん培養細胞株の PK-1 細胞と T3M-4 細胞を用いて、BLU-554 の抗腫瘍効果と、老化誘導能を検討した。BLU-554 の細胞増殖抑制効果を検討するため、96 ウェルプレートに 2×10^4 細胞を播種し、翌日に BLU-554 を含む培地に交換、4 日後に WST-8 assay を行なった。細胞の遊走能と浸潤能への BLU-554 の抑制効果を検討するため、BLU-554 含有培地で 3 日間培養し、 1×10^5 細胞をボイデンチ

ャンバー（遊走能）とマトリゲルで覆ったボイデンチャンバー（浸潤能）に播種し、それぞれ 8 時間と 16 時間後に膜を固定、Diff-Quick staining kit で染色して膜の裏側の細胞数を測定した。BLU-554 による膵臓がん細胞の老化誘導を検討するため、PK-1 細胞は 6 ウェルプレートに 1×10^4 細胞、T3M-4 細胞は 2×10^4 細胞を播種し、BLU-554 含有培地で 7 日間培養した後、SA- β -Gal 染色を行なって顕微鏡下に老化細胞を測定した。BLU-554 の投与により、老化細胞が産生するとされる SASP 因子 (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF) と、長寿遺伝子の Sirtuin 1, Sirtuin 6 の messenger RNA の発現量の変化を qRT-PCR 法で検討した。

3. 研究の成果

3-1. 細胞増殖能

BLU-554 の 5 μ M 投与によって、PK-1 細胞と T3M-4 細胞の細胞増殖が抑制された (図 1)。



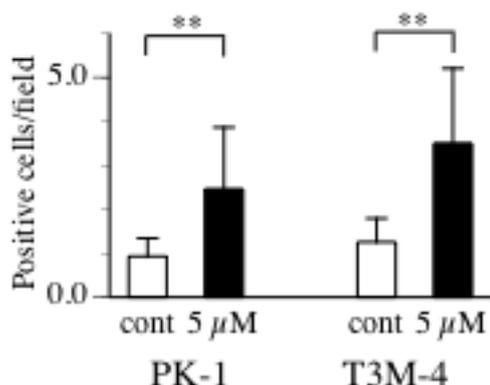
3-2. 細胞遊走能と浸潤能

PK-1 細胞は BLU-554 の投与により、細胞遊走能は低下したが、統計学的な有意差は認めなかった。T3M-4 細胞では、BLU-554

を 5 μ M 添加で細胞遊走能の低下が有意にみられた。PK-1 細胞、T3M-4 細胞ともに、BLU-554 の投与によって有意な細胞浸潤能の低下がみられた。

3-3. 老化細胞の誘導

PK-1 細胞、T3M-4 細胞ともに、5 μ M の BLU-554 により SA- β -Gal 陽性の老化細胞の増加を認めた (図 2)。



3-4. SASP 因子の発現

PK-1 細胞では BLU-554 の投与によって、IL-6 と GM-CSF の増加がみられ、T3M-4 細胞では IL-1 β の増加を認めた。

3-5. 長寿遺伝子の発現低下

PK-1 細胞では、BLU-554 の投与によって長寿遺伝子の Sirtuin 6 が有意に低下した。以上より、FGFR4 阻害剤の BLU-554 により膵臓がん細胞培養細胞の増殖と遊走、浸潤が抑制されることを明らかにした。さらに、BLU-554 が膵臓がん細胞を老化誘導することを確認した。

4. 今後の課題

今回の研究により、進行した肝細胞がんの治療薬としてフェーズ I/II の臨床試験を行っている BLU-554 に、膵臓がん培養細胞株の増殖抑制、遊走、浸潤抑制効果があるこ

とが明らかとなった。さらに、BLU9931 と同様に膵臓がん細胞そのものを老化誘導させることが示された。

今後は、より人体に類似した培養方法である 3 次元培養による BLU-554 の膵臓がん培養細胞株への抗腫瘍効果と老化誘導の検討が必要と考えている。BLU-554 が膵臓がんの治療へ適応拡大される可能性があると考えている。

5. 研究結果の公表方法

本研究結果については、今後の課題で述べたような追加解析を実施し、その結果をまとめ学会発表や医学系英文雑誌に原著論文として投稿し、公表したいと考えている。

Development of senolytic therapy for pancreatic cancer cells

Primary Researcher: Toshiyuki Ishiwata, Director, Division of Aging and Carcinogenesis, Research Team for Geriatric Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology.

Co-researchers: Fujiya Gomi, Researcher, Division of Aging and Carcinogenesis, Research Team for Geriatric Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology.

Norihiko Sasaki, Researcher, Research Team for Geriatric Medicine (Vascular Medicine), Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology.

Pancreatic cancer is usually a therapeutically refractory cancer that frequently occurs in elderly individuals and has a 5-year survival rate of approximately 10%. We previously reported that BLU9931, an FGFR4 inhibitor, suppresses growth and invasiveness and induces senescence in cancer cells. Quercetin administration induced senescent pancreatic cancer cell death. In this study, we investigated the antitumor effect of fisogatinib (BLU-554), an FGFR4 inhibitor on pancreatic cancer cells based on the effectiveness of this agent in clinical trials of patients with advanced liver cancer. BLU-554 inhibited the growth and invasiveness of pancreatic cancer cells and increased senescent pancreatic cancer cells. These results suggest that BLU-554 may inhibit cell proliferation and invasiveness and promote senescence of cancer cells and serve as a novel therapeutic option in patients with pancreatic cancer.