

インターフェロン関連分子を中心とした
膵管癌におけるRNA発現解析

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系消化器内科学専攻

藤澤 真理子

修了年 2021年

指導教員 森山 光彦

インターフェロン関連分子を中心とした
膵管癌におけるRNA発現解析

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系消化器内科学専攻

藤澤 真理子

修了年 2021年

指導教員 森山 光彦

目次

第1章 概要	1
第2章 緒言	4
1. 膵臓癌総論	4
(1) 疫学	4
(2) 病理学的分類	4
(3) 前癌病変	5
(4) 遺伝子異常	6
2. Laser Microdissection (LMD) / RNA-Seq	7
3. 膵管癌とサイトカイン	8
(1) インターフェロン [Interferon(IFN)]	8
(2) IFNの抗がん作用	9
(3) Toll-like receptor signaling	9
4. 研究の目的	12
第3章 膵管癌でのRNA発現 (<i>in vivo</i>)	13
(1) 対象と方法	13
(2) 結果	14
第4章 膵癌細胞株 (<i>in vitro</i>) におけるIFNの作用	16

(1) 対象と方法	16
(2) 結果	18
第5章 考察	21
第6章 結論	25
謝辞	26
表 Table	27
図 Figure	32
図説 Figure Legends	40
引用文献	42
研究業績目録	54

第1章 概要

2018年の膵臓癌の新規症例数および死亡者数は、世界中でそれぞれ458,918例および432,242例と推定されており、その数は年々増加傾向にある[1]。多くの膵臓癌患者は、無症状のまま進行するため早期での発見が難しく[2]、様々な治療法が開発されているにもかかわらず、膵臓癌は依然として予後が悪く致死率は高い。現在の膵臓癌の5年生存率は10%に満たない[3]。膵臓癌の中でも、膵管癌 [Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC)] が9割を占めている[4]。これまで、喫煙、肥満、食物要因（非菜食主義）、毒素、過剰アルコール摂取と高齢化、家族歴、アフリカ系アメリカ人、慢性膵炎、糖尿病、および非O血液型などが、それぞれPDACの危険因子とされている[5]。しかしながら、早期段階でPDACを検出するための特定の診断バイオマーカーはまだ確立されていない[6]。PDACの病因と発癌メカニズムについてのさらなる検討が必要である[7]。

進行PDACの前癌病変として、膵上皮内腫瘍 [Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)]、膵管内乳頭粘液性腫瘍 [Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN)]、および粘液性嚢胞性腫瘍等がある[8]。PanINから段階的に遺伝的変異を経て浸潤性膵管癌が発生するとされているが、PanINとPDACの遺伝子発現の違いはよく知られていない。

そこで今回、PanINとPDACの遺伝子発現の差を評価するために、FFPE (Formalin-fixed paraffin-embedded) 標本からレーザーマイクロダイセクション [Laser microdissection (LMD)] 法を用いて正常膵管上皮とPanINとPDACを切り出し、トランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) を行った。RNA-Seqから得られた遺伝子をIngenuity pathways analysis (IPA) で評価したところ、PDACとPanIN (PanIN-2) のRNA発現比較により、PDACにおけるIFN伝達

経路の活性化を認めた。

免疫チェックポイント阻害薬の台頭によって、PDAC の治療としても癌免疫療法が注目されている。癌免疫療法には免疫系の刺激だけでなく、PDAC 患者の腫瘍微小環境を介した腫瘍免疫抑制効果の制御も含まれる[9]-[11]。しかしながら、PDAC においてはPD-L1 の発現が低く、かつリンパ球が少ない組織であるため免疫チェックポイント阻害薬は効きづらい腫瘍とされている[12]。そのため、単独療法ではなく、分子標的薬、化学療法、放射線療法などとの併用による複合的免疫治療の開発が期待される。I 型インターフェロン [Interferon (IFN)] である IFN α や IFN β などは、I 型 IFN 受容体を介して効果を発揮し、Janus キナーゼ Jak1 および Tyk2 の活性化、Signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1) と STAT2 のリン酸化および活性化をもたらす、最終的に IFN 刺激遺伝子 [IFN-stimulated gene (ISG)] を活性化し各種の抗腫瘍効果を呈する[13]。

今回の RNA-Seq で得られた結果も踏まえ、IFN を中心とした自然免疫応答に着目し、さらにヒト膵癌細胞株において IFN に関与する分子の RNA 発現と細胞増殖抑制作用を評価した。

まずヒト膵癌細胞株に対する IFN α の抗腫瘍効果を確認した。次に IFN α を投与した後の TLR シグナル伝達経路を PCR array を用いて調査した。そこで、IFN α がヒト PDAC 細胞株において TLR3 mRNA 発現を制御していることを見出した。さらに、IFN α と TLR3 agonist である poly(I:C) がヒト膵癌細胞株においてチロシンキナーゼ阻害剤 [Tyrosine kinase inhibitor (TKI)] によって誘発される細胞増殖抑制作用を増強することを示した。そして si-TLR3 をトランスフェクションした細胞株では IFN と TKI による細胞増殖抑制作用が減弱することを認めた。

本研究では、FFPE 検体の標的病変から抽出した RNA から RNA-Seq が可能で

あることを示した。さらに PanIN と癌部の RNA 発現において、Seq の結果から IFN シグナル伝達経路が抽出された。IFN シグナルは PDAC において治療標的として知られているが、今回の研究では PanIN から癌への進展に IFN シグナルが関与している可能性が示唆された。また、ヒト膵癌細胞株においての検討で IFN 投与によって TLR3 によるシグナル伝達経路が活性化されていることと、さらに TKI と TLR3 アゴニスト を組み合わせが PDAC の新しい治療となる可能性を示した。

第2章 緒言

1. 膵臓癌総論

(1) 疫学

膵臓癌は、世界で癌関連死亡原因の第7位であり、その割合は先進国ほど高くなる。患者は進行癌となるまで症状を示すことが少なく、2018年には432,242人の死亡数であったと推定される[1]。世界的には、2018年に458,918例の膵臓癌の新規症例が報告されており、今後も増加することが予想される[14]。膵臓癌の検出と管理の進歩にもかかわらず、5年生存率はまだ9%までしか改善していない。現在まで、膵臓癌の原因はまだ十分に解明されていないが、喫煙、糖尿病、肥満、食事、アルコール依存症、年齢、民族、家族歴、遺伝的要因、ヘリコバクターピロリ感染、非O型の血液型などの危険因子が報告されている[5]。家族歴や喫煙歴のあるグループを標的とするスクリーニングは評価されているが[15]、一般集団を対象としたグループのスクリーニングで、疾患の初期段階での検出として実用化されたものはまだない。病因をよりよく理解し、原因となる危険因子を特定するとともに、膵臓癌の発生と転帰に関する最新統計を理解し、一次予防に応用することが不可欠である。

(2) 病理学的分類

膵臓の機能は、外分泌機能と内分泌機能に分類されるが、膵臓癌の中でも膵管癌は外分泌に関わる膵管上皮細胞から発生する。膵は内分泌機能として、インスリンやグルカゴンなどを産生するが、これらを分泌する細胞から発生する癌は膵内分泌癌と呼ばれる。「膵癌取扱い規約第7版」では、浸潤性膵管癌とは、「間質浸潤を伴う癌腫で、膵管類似の腺腔形成や膵管上皮への分化がみら

れるもの」と定義され、膵臓癌の90%以上は膵管癌である[4]。膵癌細胞周囲にDesmoplasiaと呼ばれる高度な線維化を伴うことを病理組織学的特徴とする。浸潤性膵管癌は多彩な組織形態を示すが、優勢な組織像によって、1) 腺癌、2) 腺扁平上皮癌、3) 粘液癌、4) 退形成癌に分類され、腺癌を通常型膵管癌と呼ぶことが多い。腺癌は分化度により、高分化型、中分化型、低分化型に分類される。本文中で使用している膵管癌 (PDAC) はこの腺癌を表している。

(3) 前癌病変

膵管癌の前癌病変の一つとして膵上皮内腫瘍性病変 [Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)] が、知られている。顕微鏡レベルで観察される、膵管内に生じる円柱上皮性の上皮増殖病変を指す。

1976年にCubillaとFitzgeraldは、膵臓の浸潤性膵管癌に隣接する膵管内の増殖性病変に関する論文を報告した[16]。1998年にはBrat及びBrockie等が、膵臓の乳頭状異型病変が組織学的に同定された後に浸潤性膵管癌を発症した症例をそれぞれ報告した[17], [18]。浸潤性膵管癌で確認されているほとんどの遺伝子変化は、これらの乳頭状病変でも確認されており[19]、これらの遺伝子変化の頻度は、乳頭状病変の細胞学および構造的異型の程度として増加する[20]。2001年にRalph等により、この上皮増殖性病変が段階的な異型の変化を経て浸潤性膵管癌を発生する前癌病変PanINとして整理された[21]。そこでPanINはその形態により1~3の3段階にGrade分類された。PanIN-1Aはmucinous hypertrophy, non-papillary hyperplasiaなどに、PanIN-1Bはpapillary hyperplasiaなどに、PanIN-2はpapillary hyperplasia with moderate atypia, moderate dysplasiaなどに、PanIN-3はsevere

dysplasia, Carcinoma in situ に相当する。上記に正確に分類するのは困難であるため、さらに Low-grade PanIN と High-grade PanIN の 2 種類とする分類が 2015 年に報告された [8]。Low-grade PanIN は PanIN-1 と PanIN-2 の異型の比較的弱い増殖性病変に相当し、High-grade PanIN は従来の PanIN-3 に相当する異型の強い病変で Carcinoma in situ と同様とされている。

(4) 遺伝子異常

近年では浸潤性膵管癌における遺伝子異常の網羅的解析が進み、全エクソン解析、全ゲノム解析のデータが報告され、浸潤性膵管癌における遺伝子異常の全貌がほぼ明らかにされた [22]-[24]。その結果、浸潤性膵管癌において頻繁に認められる異常は、KRAS, CDKN2A, TP53, SMAD4 であることが確認された [22]-[24]。PanIN においてもこれらの異常が認められることが示されており、low-grade PanIN においては KRAS 変異, CDKN2A の異常が認められ、high-grade PanIN においては TP53, SMAD4 の異常が認められる [25]-[27]。

膵癌発生動物モデルにおいても、PanIN 類似病変の異型が強くなって浸潤癌に移行するように見えることが示されている。ハムスターに N-Nitrosobis(2-oxopropyl) amine (BOP) を投与することで、異型上皮増生から浸潤癌が発生することが示されている [28]。また、KRAS 変異を膵臓特異的に発現させる遺伝子改変マウスモデルにおいて mPanIN (mouse PanIN) から浸潤性膵管癌が発生することが観察されている [29]。今後は遺伝子異常のみならず、その発現状態を知ることによって、膵臓癌の早期発見や予後予測、治療への応用などが期待される。

発癌進展過程での mRNA/miRNA/蛋白発現を評価するには、膵組織は RNase が豊富で、癌細胞の細胞密度が低いことから [30]、膵臓癌検体の採取・保存の難しさが課題としてある。これまで膵癌の RNA-Seq を行った報告があるが [31]、

PanIN と癌部の FFPE からの RNA-Seq で比較評価を行った報告は少ない。

2. Laser Microdissection (LMD) / RNA-Seq

LMD 法は、顕微鏡にレーザー照射装置が接続された機器を使って、顕微鏡下で組織切片を観察しながら、切片上の標的とする細胞塊をレーザーによって切り出し、採取回収する方法である。1996 年に Michael R. Emmert-Buck らが、顕微鏡下で標本上の特定領域の細胞を切片の上 に置き赤外線を照射することにより film に融着し、剥がしとって回収する方法を報告している[32]。1998 年には、UV レーザーで切片を切断しレーザー光により切断後の切片を回収する方法が Schutze らによって報告された[33]。この方法によって、生体組織から標的細胞群を採取することができる為、生体内において特定の遺伝子が、標的細胞にどれだけ発現しているのかを正確に知ることができるようになった。

2005 年から、医療機器メーカーからシーケンサーの製品化が進み遺伝子解析の分野が急速に発展した。2008 年には、DNA のみならず RNA の解析も行われるようになり、哺乳細胞に対して RNA-Seq を行った報告も出てきた[33]。

これまで FFPE 検体では、蛋白と RNA 間での架橋形成により塩基にものメチル基が付加することにより RNA が共有結合的に修飾されるため RNA 抽出は困難とされていた[34]。しかし、架橋形成を解除することが可能となり FFPE から RNA 抽出ができるようになった[35]。

この FFPE から抽出した RNA を用いた RNA-Seq により、保存されていた臨床検体の腫瘍における詳細な RNA 発現が評価できるようになった[36]-[39]。

PDAC は、腫瘍細胞周囲の線維芽細胞などの間質量が多く腫瘍細胞自体の細胞密度が低いため[30]、LMD を用いた FFPE からの RNA-Seq が有用と考えた。

3. 膵管癌とサイトカイン

(1) インターフェロン [Interferon(IFN)]

小島保彦と長野泰一は種痘を不活化したワクチン（天然痘不活性ワクチン）を研究している過程で、タンパク質の上澄み液のなかに、抗ウイルス効果がありウイルス感染防御作用を持つ可溶性因子が存在することを発見した[40]。1957年には Isaacs と Lindenmann がこの因子を Interferon(IFN) と名づけた[41]。IFN はのちにタイプ I とタイプ II の 2 つの IFN に大きく分類された[42]。I 型 IFN はウイルス感染で産生され、IFN- α , β , ω , δ , κ , τ が含まれる。II 型 IFN は、IFN- γ のみで構成される。最近では、IFN- λ からなる III 型 IFN が見つかっている[43]。

IFN- α と IFN- β は、2 つのサブユニットで構成される I 型 IFN 受容体複合体 (IFNAR) の IFNAR-1 および IFNAR-2 を介して作用する。IFNAR-2 サブユニットには、共通の遺伝子から異なってスプライシングされる 3 つのアイソフォームが知られている。

受容体複合体への IFN の結合は、受容体関連の JAK1 とチロシンキナーゼ TYK2 の活性化とリン酸化を引き起こし、それにより STAT タンパク質のリン酸化を引き起こす。リン酸化後、STAT-1 および STAT-2 は、IFN 刺激遺伝子因子-3 [Interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF3)] を DNA 結合タンパク質 p48 (IRF9) と形成する。ISGF3 複合体は核に移動し、そこで IFN 刺激応答要素 [IFN-Stimulated Response Elements (ISRE)] に結合し、ウイルス感染防御などの作用をもつ複数のタンパク質をコードする IFN 誘導遺伝子 (ISG) の転写をもたらす[13], [44], (図 1)。

(2) IFN の抗がん作用

IFN はウイルス感染防御や免疫調整作用のみならず細胞分化や抗腫瘍作用があることがわかり臨床応用されている[45]。榎垣等は、腫瘍壊死因子 (TNF) 関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) 発現強化を介して、I 型 IFN が T 細胞の細胞毒性を調整し抗腫瘍作用もたらすことを報告している[46]。

I 型 IFN α は抗腫瘍免疫賦活作用があることから、腎臓癌などの他癌腫において臨床応用されている[47]。PDAC においては、ナチュラルキラー (NK) 細胞活性および IFN 産生が低下しているという報告があり[48]、IFN による抗腫瘍免疫賦活作用を期待できる。Booy らは PDAC において 91.5% が IFN α 受容体-1 の発現を示し免疫染色で 23.4% の強陽性を示したこと、また 68.1% が IFN α 受容体-2c の発現を示し、うち 4.3% が免疫染色で強陽性であったことを示している[49]。*In vitro* では、ヒト膵癌細胞株 HuP-T3、HuP-T4、MIA-PaCa-2、および BxPC-3 細胞において IFN は成長阻害作用を示す[50]。また *in vivo* では、IFN による抗腫瘍効果が認められており、IFN α -2b とドキシソルビシンの併用や、IFN α と 5-フルオロウラシル (5-FU) の併用療法も報告されている[51]-[53]。しかしながら併用療法では有害事象も見られる[54]-[56]。5-FU との併用療法に関する臨床試験では、全生存期間の有意な改善は示されていないが、このように PDAC に対する IFN での治療に関していくつかの報告はあり[57]-[61]、PDAC においても抗腫瘍免疫賦活作用の点でさらに応用できる可能性がある。

(3) Toll-like receptor signaling

前述のように IFN に抗腫瘍作用があることは知られているが、免疫と癌との関係に関しては近年 PD-1/PD-L1 を中心とした癌免疫療法の飛躍によってさらに注目を集めている。免疫応答のなかでも自然免疫を司る Toll-like receptor

signaling は二本鎖 RNA (dsRNA) および腫瘍由来の damage-associated molecular pattern (DAMP) を認識し、細胞内シグナルの伝達を促し、IFN も産生を促す。結果、自然免疫応答と適応免疫応答を活性化することで、癌免疫の主要な役割を果たしている [62]。

なかでも TLR3, 4, 7, 8, 9 のアゴニストは癌治療として有力な候補と挙げられている [63]。T 細胞及び樹状細胞を介した細胞貪食や NK 細胞による細胞障害なども起こし、TLR3, 7, 8, 9 は I 型 IFN の産生を促し、抗腫瘍作用を呈す [64]。TLR3 はウイルスの二本鎖 RNA を認識して、前述のように IFN を産生することで抗ウイルス作用を惹起する [65]。TLR3 は、ヒト膀胱癌細胞株での発現が認められており、PDAC に関与するとされる Wnt5A と関連している [66]。この Wnt5A は PDAC の上皮間葉転換と転移を促進する [67]。

TLR シグナル阻害剤であるフェニルメチマゾール (C-10) は、*in vivo* および *in vitro* での細胞増殖および遊走の阻害とともに、Wnt5A および TLR3 レベルを低下させる可能性があることがわかっている [66]。逆に、TLR3 および TLR7 アゴニスト [poly(I:C) および imiquimod] は、ヒト $\gamma\delta$ T 細胞による PDAC 細胞溶解を促進する [68]。

マウスおよびヒトの白血病及び乳癌細胞ではアントラサイクリンによって癌細胞由来の RNA による TLR3 の活性化が促進され、その結果 I 型 IFN が分泌されることが示唆されている [69]。結果、パラクリンシグナル伝達回路によって、C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) や Myxovirus resistance protein 1

(MX1) などが発現する。実臨床においてもアントラサイクリンベースの化学療法で治療された乳癌患者の生検サンプルにおける MX1 の発現レベルの増加が、治療反応性を予測することが示唆されている [69]。

近年、poly(I:C) より副作用の少ないホスホロチオエート ODN 誘導 dsRNA (sODN-dsRNA) からなるキメラ分子などの開発も進んでいる [70]。TLR3 のみ活

性化しレチノイン酸誘導性遺伝子 I [Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)] や Interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1 / MDA5) を活性化しないため、全身性の炎症性サイトカインを誘導することなく腫瘍反応性細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導する。CTL 誘導は PD-L1 抗体の奏効に関わることが知られており、PD-1/PD-L1 療法などの癌免疫療法前に、抗原提示細胞を活性化するアジュバントとしての応用が期待されている。

4. 研究の目的

本研究では、膵臓癌の発癌に関与する遺伝子およびその関連分子を膵管癌 FFPE 検体の非癌部と PanIN、癌部の RNA-Seq を用いて網羅的に解析して、膵臓癌の発生の予知・予防の方法論を確立し、臨床に応用可能な知見を得ることを目的とする。RNA-seq を行った結果から、ヒト膵癌細胞株を用い *in vivo* でさらに RNA 発現を評価し、膵管癌の臨床に応用可能な知見を得ることを研究目的とした。

第3章 膵臓癌での RNA 発現 (*in vivo*)

(1) 対象と方法

Patients and Clinical Specimens. :

この研究は、2016年5月から2017年12月までの1年間と9か月間に当院で膵臓癌の手術を受けた5人の患者を対象とした(表1)。本研究は、日本大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究委員会(241-1)により承認された。全症例で文書同意が得られた。これらの症例の膵臓癌の手術によって得られた検体をホルマリン固定パラフィン包埋し保存された病理組織内に、膵管癌病変、膵上皮内腫瘍(PanIN)、および非癌部(膵管上皮細胞)が存在することを確認した。PanINを含む病理診断については、WHO Classification of Tumors of the Digestive System (4th Edition)に基づいて[21]、病理医(M.S.)と消化器肝臓内科医(M.F.とM.M.)で評価した。

Laser Microdissection (LMD):

FFPEサンプルを5 μm に薄切し、LMDのポリエチレンナフタレート膜(Leica, Wetzlar, Hessen, Germany)で覆われたスライドにのせた。スライド上で直接脱パラフィン処理を行った後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。LMD6000(Leica)を使用して、標的病変(膵管上皮細胞、PanINおよび膵管癌病変)をFFPEサンプルから切り出しをした。総切り出し面積は、事前に検討を行い300,000 μm^2 以上に設定した。

Extraction of RNA extraction and RNA-Seq by next generation sequencing :

FFPE検体からRNA抽出は、RNeasy FFPE kit(Qiagen, Hilden, Germany)

を使用した。RNAの定量分析は、NanoDrop ND-1000 分光光度計 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) および 2100 バイオアナライザー (Agilent, Santa Clara, CA, USA) で評価した。Illumina プラットフォームに従って、各 cDNA ライブラリを TruSeq™ RNA Exome Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) で構築した。その後、Illumina NovaSeq 試薬 kit を使用し、約 15 gigabases/検体でのペアエンドシーケンスプロトコルを、Illumina HiSeq X10 (Illumina) で実行した。

シーケンス処理から取得した Raw data を、インデックスアダプターシーケンスと低品質の読み取りのフィルタリングで処理した。

これらの RNA-Seq とデータ処理は、BGI Hongkong Tech Solution GS Lab (BGI, Hong Kong, China) に外部委託した。

Data analysis :

各遺伝子 mRNA の発現レベルを決定するために、シーケンスデータの各読み取りを CLC Genomics Workbench (Qiagen) のヒトゲノムにマッピングした。GeneSpring 14.9.1 (Agilent) で各遺伝子 mRNA の発現レベルを分析し、膵管癌細胞、PanIN、膵管上皮細胞間の RNA 発現が有意な差を示した 751 遺伝子を抽出した。これらの遺伝子 751 個について、IPA (Qiagen, Redwood City, CA, USA) を使用して Pathway 解析を行った。

(2) 結果

IPA between PanIN and PDAC from 5 clinical samples showed an importance of IFN signaling pathway :

PDAC の発生機序を研究するため、5 例の PDAC 患者で RNA-Seq を行った (表 1)。さらに非癌部・PanIN・癌部の RNA 発現を IPA 解析で行なった (図 2)。

今回、癌の発生・進展に関与する分子の検索を目的としていることから、PanIN と PDAC の RNA 発現比較の IPA 解析に着目していたが、IFN シグナル伝達経路の重要性が示された (表 2, 3)。PanIN と PDAC の間で主に動いていた Pathway 5 経路のうち 4 経路は、IFN を含む免疫シグナル伝達経路と自然免疫関連シグナル伝達経路に関連していた (表 2)。

第4章 膵癌細胞株 (*in vitro*) における IFN の作用

(1) 対象と方法

Cell lines and reagents :

ヒト膵癌細胞株 Panc-1 および SUI-2[71]を、ペニシリン 100 U/mL・ストレプトマイシン 100 μ g・10%胎児ウシ血清を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) にて、37°C, 5%CO₂ の条件下で培養した。IFN α -2a、poly(I:C)、ソラフェニブ、およびレゴラフェニブは、それぞれ Sigma-Aldrich、Imgenex (San Diego, CA, USA)、AdooQ Bioscience (Irvine, CA, USA) および Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。TLR3 に対する small interfering RNA (si-TLR3) [sc-36685] およびコントロール siRNA (si-C) [sc-37007] は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。

RNA extraction, cDNA synthesis and PCR array for TLR-associated signaling pathway-associated pathways :

ヒト膵癌細胞株 Panc-1 及び SUI-2 を、IFN α -2a 0.1 μ g/mL を加えたものと加えなかったものでそれぞれ 24 時間培養した。その後細胞から RNA を RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出し、RNA 濃度は NanoDrop (Thermo Scientific, Tokyo, Japan) で測定した[72]。RT² First Strand kit (Qiagen) と GeneAmp PCR system 5700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用いて、それぞれ RNA 1.0 μ g から cDNA を合成した[72]。TLR 関連シグナル伝達経路は、RT² profiler PCR array 及び 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて分析した。分析は Web-based で行い、Raw data

を正規化するためにフルパネルから自動選択で参照遺伝子を選択した[72]。

Cell proliferation and cytotoxic assay :

細胞増殖を評価するために、dimethylthiazol carboxymethoxyphenyl sulfophenyl tetrazolium (MTS) アッセイを、CellTiter 96 Aqueous One-Solution cell proliferation assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いて行った。各 well の 490 nm での吸光度を iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, Tokyo, Japan) で測定した[72]。

Wound-healing scratch assay :

細胞を 60 mm dish で 90% confluence になるまで培養し、p-200 ピペットチップの先端で dish 上にスクラッチを作成した[73]。前述の試薬類を加えた上でスクラッチ後と 48 時間までの時点で、細胞を顕微鏡で観察した (BIOREVIO BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan)。スクラッチ上での細胞の遊走は、コントロールでのスクラッチ幅を 1 と見なし、比率で計算した[73]。

Transfection of siRNA :

トランスフェクションの 24 時間前に、細胞を 6 well plate に 1.5×10^5 /well で播種した。Effectene transfection reagent (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、細胞に 50 nM si-TLR3 または si-C をトランスフェクションした[71]。トランスフェクションの 48 時間後、IFN α (0.05 μ g/ mL) ±レゴラフェニブ (1 μ M) を添加した。トランスフェクション 96 時間後、細胞増殖を評価するために MTS アッセイを実施した。

Statistical analysis :

データは平均±標準偏差 (SD) として示した。統計分析は、両側スチューデント t 検定またはカイ 2 乗検定を行った。 $p < 0.05$ を統計的に有意な差と見なした。統計分析は、DA Stats software version PAF01644 (NIFTY Corp., Tokyo, Japan) を使用した。

(2) 結果

IFN α inhibits cell viabilities of human pancreatic cancer cell lines :

一般に、IFN はヒト固形がんに対して抗腫瘍効果がある [57]-[61]。一方、膵管癌は、I 型 IFN 受容体を発現する [49]。そこで、ヒト膵癌細胞株の細胞増殖に対する IFN α の影響を調べた。図 3 に示すように、MTS アッセイでは、コントロールと比較し、IFN α が Panc-1 と SUI-2 の細胞増殖を抑制していた。

IFN α inhibits cell migration of human pancreatic cancer cell lines :

ヒト膵癌細胞株の細胞遊走能に対する IFN α の影響を調べるために、IFN α を加えた際のヒト膵癌細胞の Wound-healing scratch assay も行った。図 4 に示すように、Wound-healing scratch assay の結果は、IFN α 処理がコントロールと比較して、Panc-1 と SUI-2 の両方の遊走能を抑制することを示した。したがって、IFN α はヒト膵癌細胞株の細胞増殖と細胞遊走能を阻害するため、IFN シグナル伝達経路が膵癌の発癌進展に関与していると考え、さらに分子機構を調べた。

Upregulation of TLR3, CXCL10, and MYD88 in human pancreatic cancer cell lines

treated with IFN α :

井田・細沼らは、IFN α/β 受容体ノックアウトマウスと交配したポリオウイルス受容体トランスジェニックマウスを作成し、ポリオウイルス感染後3日目に膵臓でポリオウイルスが非常に高い力価を示したことを認め、膵臓におけるIFNシグナル伝達経路の重要性を示した[74]。そこで、我々はヒト膵癌細胞におけるTLRシグナル伝達経路を含む自然免疫に対するIFN α の影響を調べた。Panc-1およびSUIT-2に、IFN α を加えたものとコントロールで細胞RNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRアレイを使用して、TLRシグナル伝達経路に対するIFN α の影響を調べた(表4-7、および図5)。

Panc-1とSUIT-2それぞれでIFN α を加えたもので、90個の遺伝子のうち、11個と5個の遺伝子で有意な発現増加を認めた。TLR3、CXCL10およびMYD88のmRNAは、両方の細胞株において共通にIFN α を加えた場合に有意に発現が増加していた(表4,5)。IFN α によって発現が抑制された遺伝子に関しては、IFNA1およびRIPK2 mRNAはSUIT-2では大幅に発現が抑制されたが、Panc-1では遺伝子は発現が抑制されなかった(表6,7)。

IFN α enhances the cytotoxicity of TKIs in human pancreatic cancer cell lines :

進行性膵管癌患者に対してのTKI単独療法は臨床効果が限られていることがわかっているため[75]、IFN α 併用によりTKIの細胞増殖抑制作用が増強するかどうかを*in vitro*で調べた(図6)。Panc-1(図6A)とSUIT-2(図6B)では、TKIとIFN α の単独療法と比較して、TKIとIFN α の組み合わせが細胞増殖抑制作用を有意に増強することを確認した。

TLR3 ligand poly(I:C) enhances the cytotoxicity of TKIs in human pancreatic cancer

cell lines :

TLR3 リガンドである poly(I:C) が *in vitro* で TKI の細胞増殖抑制作用を増強するかどうかについても調べた (図 6)。TKI と poly(I:C) の組み合わせは、Panc-1 (図 6A) と SUI-2 (図 6B) での TKI または poly(I:C) 単独と比較して、細胞増殖抑制作用を有意に増強した。興味深いことに、TKIs / IFN α の組み合わせと TKIs / poly(I:C) の組み合わせとの間には差を認めなかった (図 6)。

Small interfering RNA (siRNA) for TLR3 attenuates the cytotoxicity induced by IFN α and regorafenib in human pancreatic cancer cell lines :

Panc-1 では、IFN α の細胞増殖抑制作用は、si-C (1.0 ± 0.019) と si-TLR3 (1.0 ± 0.037) をトランスフェクションした細胞間で有意差はなかった。しかし、IFN α とレゴラフェニブの細胞増殖抑制作用は、si-C (0.89 ± 0.023 , $p < 0.05$) と比較して、si-TLR3 でトランスフェクションした Panc-1 (1.0 ± 0.032) で減弱していた。

SUI-2 では、IFN α は、si-C (1.0 ± 0.060) と比較して、si-TLR3 で (1.1 ± 0.027) 有意差はなかったが、IFN α とレゴラフェニブの組み合わせでは、si-C (1.0 ± 0.024) と比較して、si-TLR3 で (1.1 ± 0.042) で減衰していた。内因性 TLR3 のノックダウンによって、IFN α の細胞増殖抑制作用は変化しなかったが、IFN α とレゴラフェニブの組み合わせによって誘発される細胞増殖抑制作用は減弱した。

第5章 考察

本研究では、FFPE 検体を用いた RNA-Seq によって IFN シグナル伝達が癌進展に関与している可能性があることと、さらにヒト膵癌細胞株での検討によって、IFN および TLR3 シグナル伝達経路がヒト PDAC の治療標的となる可能性があることを明らかにした。

PanIN は、前癌病変の 1 つとして認識されている。本研究における 5 症例の RNA-Seq による IPA 解析は、PanIN と PDAC の間で有意差を認めた IFN シグナル伝達経路が発癌に潜在的な役割を果たすことを示唆している。また Interferon alpha 2 (IFNA2)、Promyelocytic Leukemia (PML)、IFN α 、IFN Lamda 1

(IFNL1 / IL29)、および Interferon Regulatory Factor 7 (IRF7) が、5 経路の上流制御因子として抽出された (表 3)。IFN α 受容体を介したシグナル伝達の活性化は、発癌遺伝子の 1 つである Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) を誘発し、腫瘍溶解性パルボウイルス H-1 の感染に対して PDAC に耐性をもたらす [76]。Swayden は、膵癌細胞の MIAPaCa-2 において、PML タンパク質の SUMOylating の変化がゲムシタビンおよびオキサリプラチン耐性の両方に関連することを示した [77]。IFNL1 はまた、Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21) および Bcl-2-associated X protein (Bax) の発現上昇を通じて、膵癌細胞 Pan-48 に抗腫瘍効果を示す [78]。マウス PDAC モデルでは、I 型 IFN 制御因子である IRF5、IRF7、STAT1 および STAT2 のプロモーターに MYC / MIZ1 の複合体が結合することで発現を抑制し、I 型 IFN 経路が抑制されることが報告されている [79]。IFN レギュレーター抑制解除により、B 細胞およびナチュラルキラー (NK) 細胞の膵臓腫瘍への浸潤が可能になり生存率の向上も示されている [80]。これらの報告から IFN シグナル伝達の回復は、PDAC 患者の転帰改善に寄与する可能性がある。

我々の *in vitro* の検討では、IFN α がヒト膵癌細胞株の細胞増殖および細胞遊走を抑制することを観察した。PDAC に対する IFN 治療の使用については長い歴史がある。PDAC の患者では、NK 細胞活性および IFN 産生に欠陥があり、これらの欠陥が PDAC の急速な侵襲性および転移増殖に寄与していると想定されている [48]。以前の研究では、*in vivo* での IFN α -2b とドキソルビシンの組み合わせの治療に対して抗腫瘍効果が示されている [51]。また、IFN α と 5-フルオロウラシル (5-FU) の併用療法についての報告もある [52], [53]。IFN 併用療法により抗がん剤治療が無病期間を延長する可能性もあるが、これ等の併用療法には有意な毒性がある [54]-[56]。IFN α は、HuP-T3、HuP-T4、MIA-PaCa-2、および BxPC-3 を含むヒト膵癌細胞で成長阻害を示すことが観察されており [50]、我々の検討でも細胞株は違うが同様の結果を得られている (図 3)。

また、IFN α がヒト膵癌細胞の TLR シグナル伝達経路に影響を及ぼし、ヒト膵癌細胞株において TLR3 発現を増加させており、TLR3 が IFN 治療後の潜在的な遺伝子の 1 つであることも確認した。近年、腸内細菌叢が膵癌に影響しているという報告があり [81], [82]、TLR4 の関与が想定されたが、実際にヒト膵癌細胞株で活性化されていたのは TLR3 であった。IFN の影響下での結果であるため、TLR4 の活性がマスクされた可能性もあるが、TLR3 の ligand として poly(I:C) のほか、腫瘍細胞自体がネクローシスに陥った際の RNA が報告されており [65]、IFN シグナルによって死滅した細胞からの RNA によって TLR3 が誘導された可能性も否定できない。

今回、IFN と同様に、poly(I:C) がヒト膵癌細胞株の TKI による細胞増殖抑制作用を増強するという新しい発見もした。さらに、TLR3 の siRNA は、ヒト膵癌細胞で IFN α とレゴラフェニブによる細胞増殖抑制作用を減衰させることも確認した。

ヒト肝細胞では、poly(I:C) などの二本鎖 RNA によって引き起こされる宿主防御機構は、RIG-I と IFIH1 / MDA5、TLR-3 シグナル伝達経路によって構成されている[13]。RIG-I と IFIH1 は、RIG-I-like receptor (RLR) ファミリーのメンバーであり、RNA リガンドを介して活性化すると、PDAC 細胞の成長阻害またはアポトーシスを誘導する可能性がある[83]。RIG-I または IFIH1 シグナルは、PDAC に対して強力な抗腫瘍効果をもたらす可能性があるが[84]-[88]。今後これら 2 つの分子については調べる必要がある。

IFN α は、Sp1 / Sp3 による VEGF 遺伝子転写阻害から生じる抗血管新生作用を通じて、抗腫瘍効果をもたらす[89]。IFN α とゲムシタビンの組み合わせは、腫瘍関連内皮細胞にアポトーシスを誘導し、ヌードマウスに移植したヒト膵癌細胞の増殖を阻害する[90]。PDAC では、上皮成長因子受容体 [Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)] と受容体型チロシンキナーゼ [tyrosine-protein kinase Met (cMET)] が、それぞれ~60%と 27-60%のケースで過剰発現することが示されている[91]。一部の TKI は、化学療法の二次治療として使用される場合があるが、興味深いことに、IFN α と poly(I:C) は、ヒト膵癌細胞株における TKI 誘発細胞増殖抑制作用を増強する (図 6)。今回使用した TKI であるソラフェニブ・レゴラフェニブに共通した標的である増殖因子受容体 [platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)] のシグナル伝達が前述の経路に影響を及ぼしている可能性がある (図 1)。

本研究では、TLR3 シグナル伝達の増強がヒト膵癌細胞株に対して強力な細胞増殖抑制作用をもたらすことも観察した (図 6)。これは、以前の研究[68]の知見を裏付けている。一般に、IFN α は ISG を誘導するが、TLR3 をノックダウンした細胞では IFN α の細胞増殖抑制作用による影響は観察されなかった。TLR3 の転写調節は IRF1 と IRF2 に依存する[92]。これらの影響を検証するには、さらに調査が必要である。

C型肝炎ウイルス（HCV）による慢性肝疾患の患者の肝細胞癌のサーベイランスにおいて、一部の患者で比較的早期のPDACが発見診断された[93]。最近HCVの治療法として導入されたDirect Acting Antiviral（DAA）は、急速なHCVクリアランスと血清IFNレベルを含む免疫状態の変化を引き起こす可能性がある[94]。DAAの影響が、PDACの発生に関連している可能性があり、DAA治療後は膵臓にも細心の注意を払うべきである[93]。

本研究では、膵臓のFFPE検体からLMD法を用いてRNA-Seqを行うことで、長期保存されていた検体でも標的病変からRNAを抽出し発現を評価することを示した。しかしながら、検体数は限られているため有意な発現差の見られる単一遺伝子の同定まではできていない。また、IFNとTLR3シグナルが癌の進展に関与しており、治療標的となることは示せたが、細胞株で得られた結果であり、また、なぜIFNによってTLR3が誘導されたかに関しては、今回の実験のみでははっきり示せていない。RIG-IとIFIH1 / MDA5のシグナルの動きや、TKIとの併用での作用機序、2つの細胞株で結果に差異が出たことなどについての検討は行っていない。今後の検討課題である。

第6章 結論

FFPE 検体の標的病変から抽出した RNA から RNA-Seq が可能であることを示した。さらに PanIN と癌部の RNA 発現において、RNA-Seq の結果から IFN シグナル伝達経路が抽出された。PanIN から癌への進展に IFN シグナル伝達経路が関与している可能性が示唆され、IFN シグナル伝達経路は PDAC において治療標的であることを再確認した。また、ヒト膵癌細胞株においての検討で IFN 投与によって TLR3 を含む自然免疫シグナル伝達経路が活性化されていることを示した。さらに TLR3 アゴニストが TKI の作用を増強する可能性を示した。

謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導いただきました消化器内科学分野主任教授の森山光彦先生ならびに神田達郎先生には多大な助言を賜りました。厚く感謝を申し上げます。また実験・論文作成をサポートしていただきました黒田和道先生、芝田敏克先生、増崎亮太先生、佐々木玲奈先生、病理学分野名誉教授の杉谷雅彦先生にも感謝の意を評します。臨床面から研究にサポートいただきました消化器内科学分野今津博雄先生をはじめとする胆膵班の先生方、消化器外科主任教授の高山忠利先生にも厚く御礼を申し上げ、感謝の意を評します。

表 Table

表 1. *Characteristics of patients with pancreatic cancer in the present study.*

Case No.	Age (years) /gender	Site	Size of Tumor (cm)	Histological type	Pathological staging	Type of surgery
1	77/male	Head	1	Tub2	T3N0M0	Pancreaticoduodenectomy
2	72/male	Head	2	Tub2	T2N1M0	Pancreaticoduodenectomy
3	64/female	Body	1	Tub2	T1N0M0	Distal pancreatectomy
4	77/male	Body	1	Tub2	T1N0M0	Distal pancreatectomy
5	50/female	Head	3	Tub1	T3N1M0	Pancreaticoduodenectomy

Tub1: Well differentiated tubular adenocarcinoma; Tub2: moderately differentiated tubular adenocarcinoma.

表 2. *Ingenuity pathway analysis between PanIN and PDAC. Top canonical pathways.*

Pathways	<i>p</i>-Value
Interferon (IFN) signaling	<i>p</i> <00.1
Activation of IRF by cytosolic pattern recognition receptors	<i>p</i> <00.1
Oleate biosynthesis II (animals)	<i>p</i> <00.1
Antigen presentation pathway	<i>p</i> <00.1
1,25-dihydroxyvitamin D3 biosynthesis	<i>p</i> <00.1

表 3. *Ingenuity pathway analysis between PanIN and PDAC. Top upstream regulators.*

Regulators	<i>p</i>-Value	Predicted activation
IFNA2	1.33E-13	Activated
PML	4.93E-12	Activated
IFN α	8.98E-11	Activated
IFNL1	1.22E-10	Activated
IRF7	2.25E-10	Activated

IFNA2: Interferon α -2; PML: promyelocytic leukemia; IFN α : interferon α ; IFNL1: interferon lambda 1; IRF7: interferon regulatory factor 7.

表 4. *Upregulation of Toll-like receptor-associated genes by interferon in human Panc-1 pancreatic cell line.*

Genes	Fold regulation	<i>p</i>-Value
TLR3	23.73	0.000496
CXCL10	6.04	0.000088
MYD88	4.40	0.000091
EIF2AK2	4.39	0.000282
CSF3	3.76	0.009503
IL6	3.61	0.125579
IRF1	3.38	0.013580
IFNB1	2.91	0.176126
TLR2	2.49	0.000956
B2M	2.48	0.000117
IL12A	2.33	0.000829
IL1B	2.20	0.020446
TNF	2.15	0.001948

TLR3: Toll like receptor 3; CXCL10: C-X-C motif chemokine ligand 10; MYD88: MYD88 innate immune signal transduction adaptor; EIF2AK2: eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2; CSF3: colony stimulating factor 3; IL6: interleukin 6; IFNB1: interferon beta 1; IRF1: interferon regulatory factor 1; TLR2: toll like receptor 2; B2M: beta-2-microglobulin; IL12A: interleukin 12A; IL1B: interleukin 1 beta; TNF: tumor necrosis factor. Bold genes, threshold of fold regulation and *p*-values are 2 and 0.05, respectively.

表 5. Upregulation of Toll-like receptor-associated genes by interferon in human *SUIT-2* pancreatic cell line.

Genes	Fold regulation	<i>p</i> -Value
CXCL10	108.59	0.003353
IFNB1	4.17	0.143835
MYD88	3.32	0.002349
SIGIRR	3.09	0.008038
TLR3	2.95	0.003039
NFKB1A	2.41	0.035116
EIF2AK2	2.03	0.199155

SIGIRR: single Ig and TIR domain containing; NFKB1A: nuclear factor kappa B subunit

1. **Bold genes**, threshold of fold regulation and *p*-values are 2 and 0.05, respectively.

表 6. Downregulation of toll-like receptor-associated genes by interferon in human pancreatic *Panc-1* cell line.

Genes	Fold regulation	<i>p</i> -Value
CLEC4E	-2.06	0.385352
TLR5	-2.49	0.098818

CLEC4E: C-type lectin domain family 4 member E; TLR5: toll-like receptor 5. **Bold**

genes, threshold of fold regulation and *p*-values are 2 and 0.05, respectively.

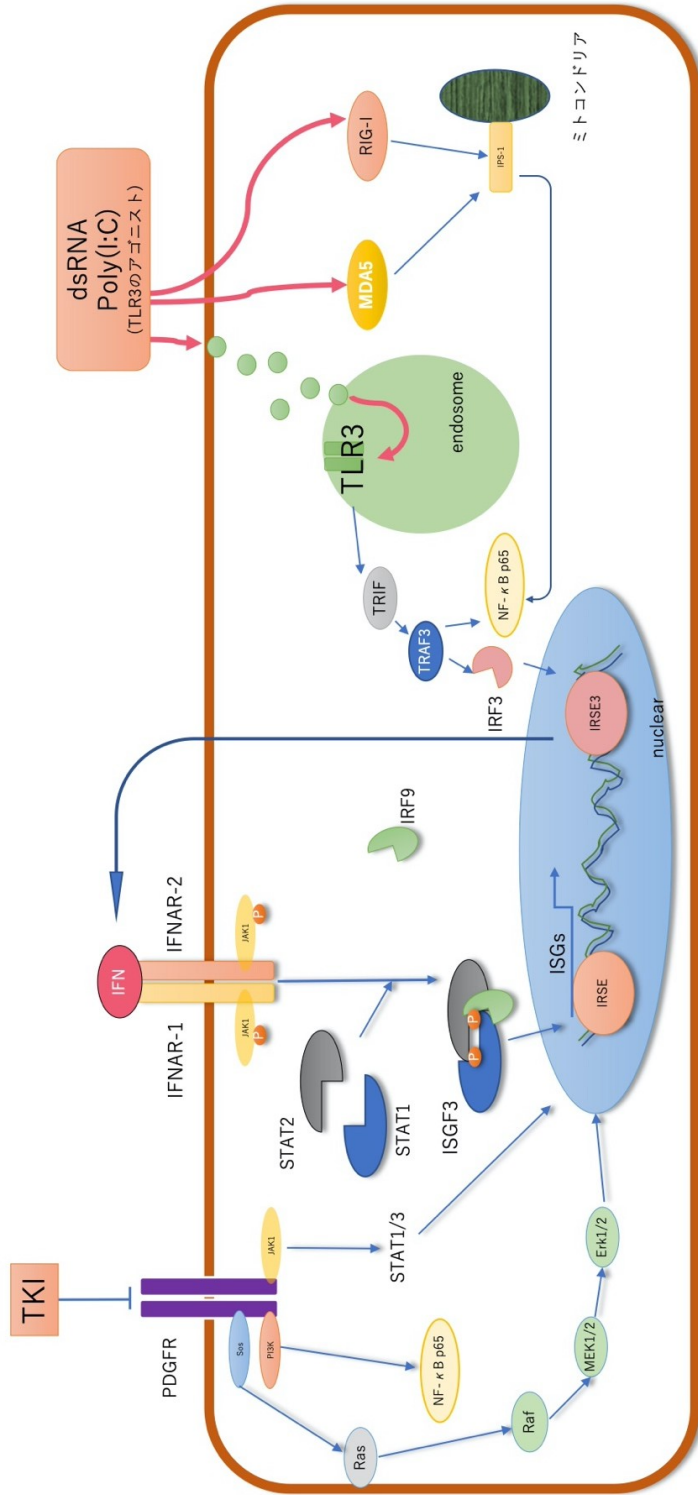
表 7. Downregulation of toll-like receptor-associated genes by interferon in human pancreatic SUIT-2 cell line.

Genes	Fold regulation	<i>p</i> -Value
SARM1	-2.09	0.214029
TICAM2	-2.10	0.064764
MAP3K7	-2.11	0.235700
MAP4K4	-2.15	0.150279
ELK1	-2.23	0.190234
IRAK1	-2.24	0.225715
HSPD1	-2.43	0.332232
RIPK2	-2.50	0.028921
IFNA1	-4.64	0.013978

SARM1: Sterile alpha and TIR motif containing 1; TICAM2: toll like receptor adaptor molecule 2; MAP3K7: mitogen-activated protein kinase 7; MAP4k4: mitogen-activated protein kinase 4; ELK1: ETS transcription factor ELK1; IRAK1: interleukin 1 receptor associated kinase 1; HSPD1: heat shock protein family D (Hsp60) member 1; RIPK2: receptor interacting serine/threonine kinase 2; IFNA1: interferon alpha 1; **Bold genes**, threshold of fold regulation and p-values are 2 and 0.05, respectively.

☒ Figure

☒ 1.



Michalska A et al. (2018) *Front. Immunol.*
Andrew G. Bowie, (2010) *Immunity*. より 改変

图 2.

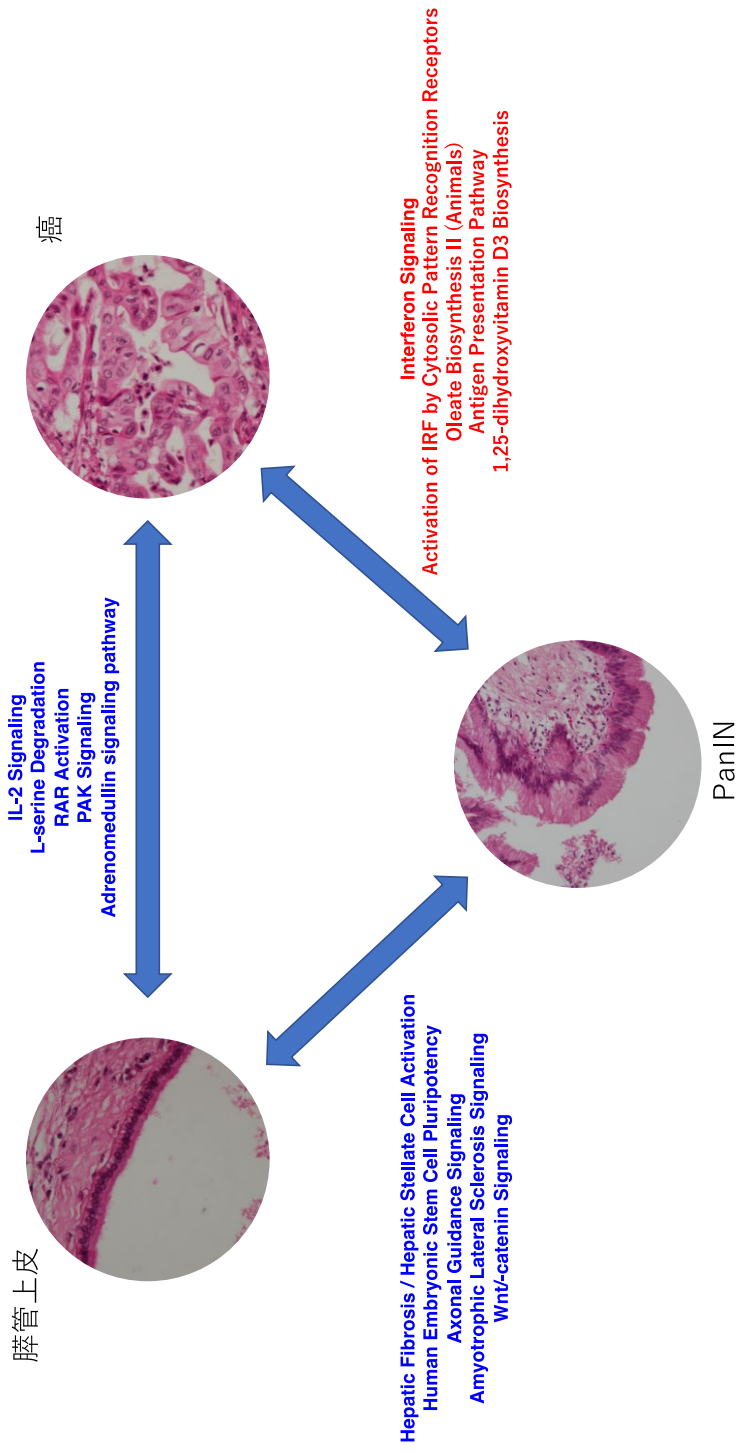


图 3(A)

Human pancreatic cancer cell lines
Panc-1 / SUI2

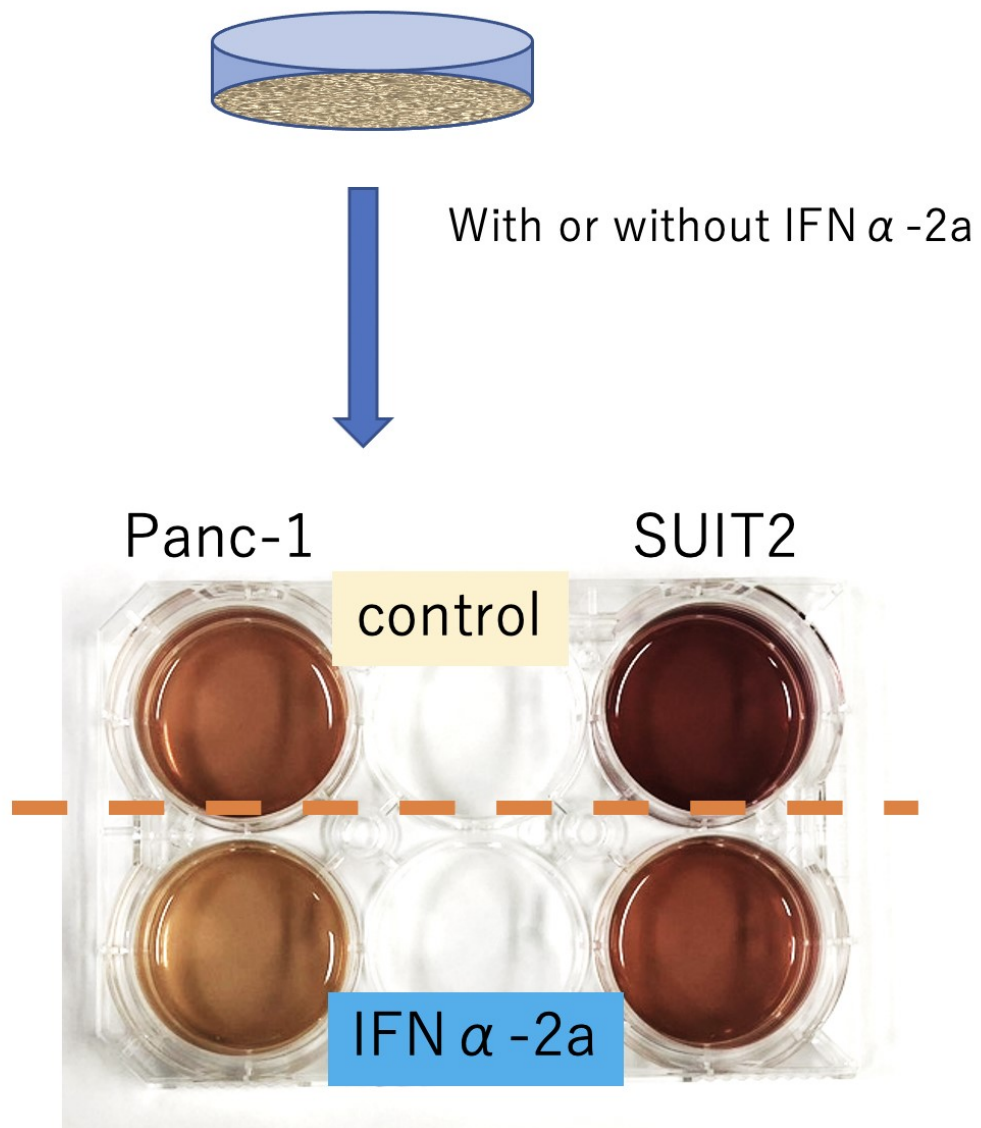


Figure 3 (B)

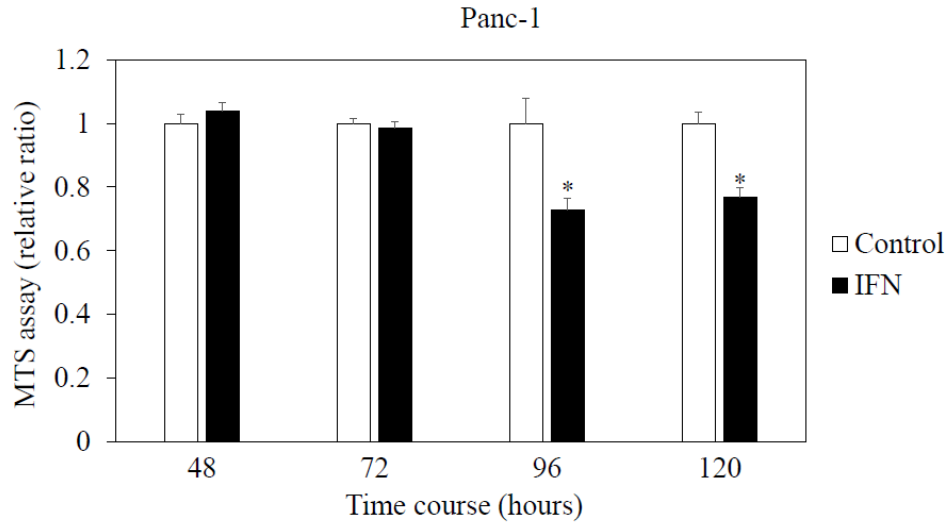


Figure 3 (C)

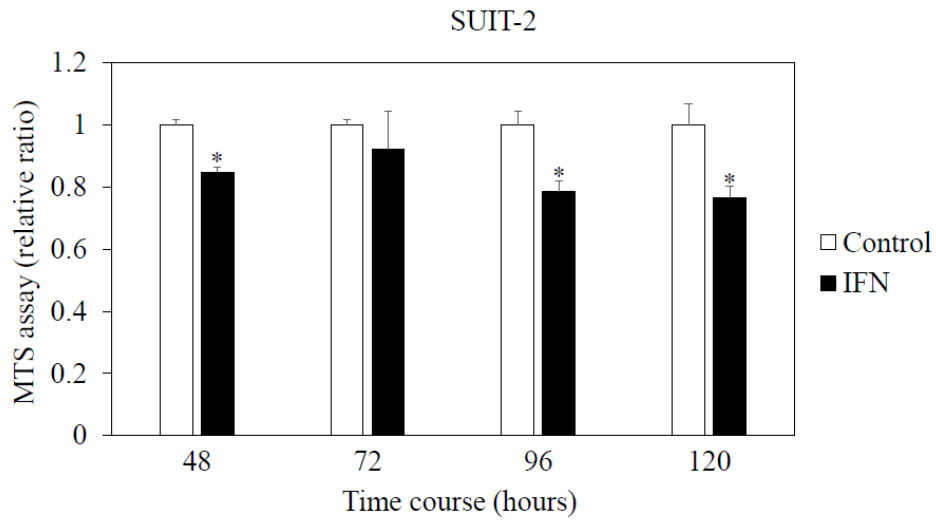


图 4 (A)

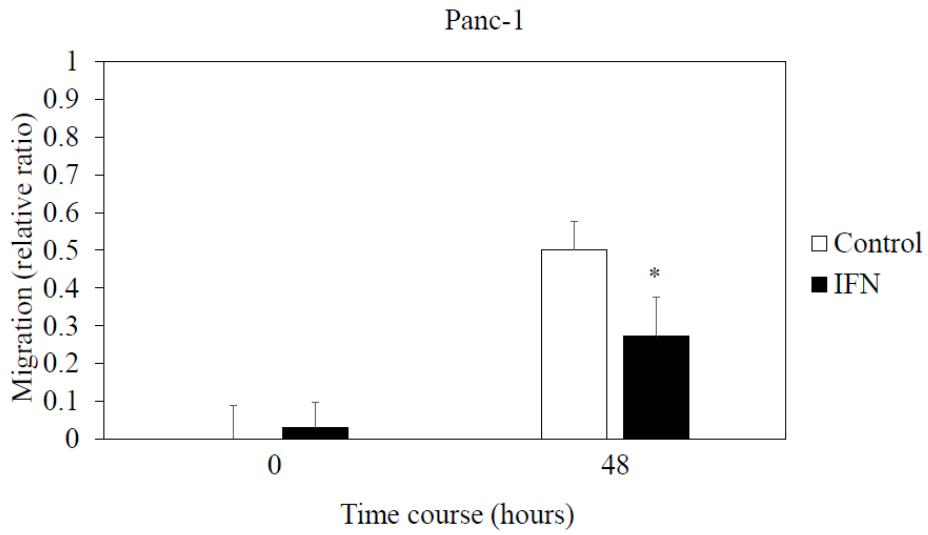


图 4 (B)

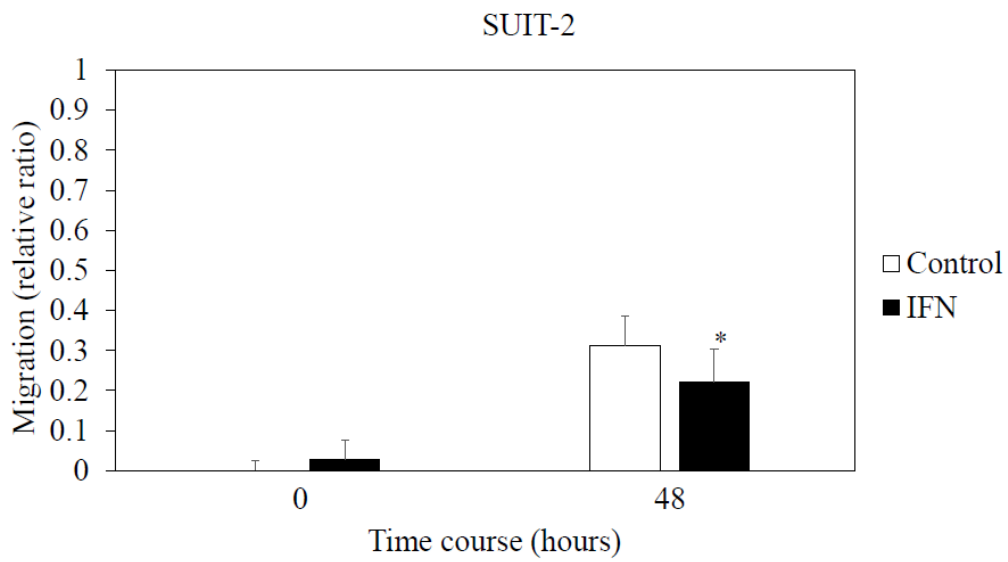


图 5 (A)

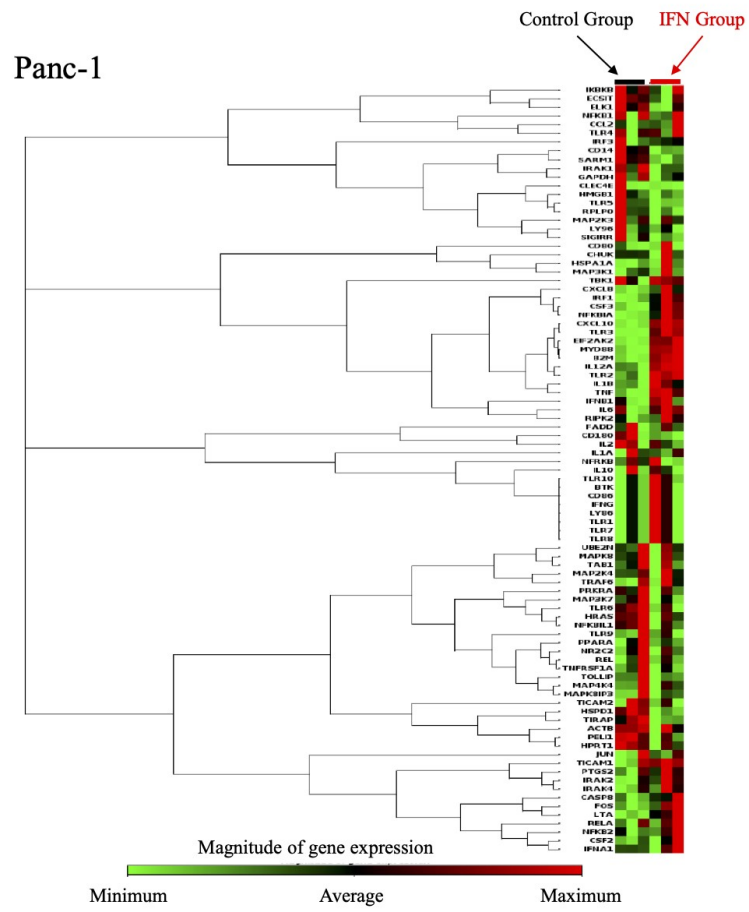


图 5 (B)

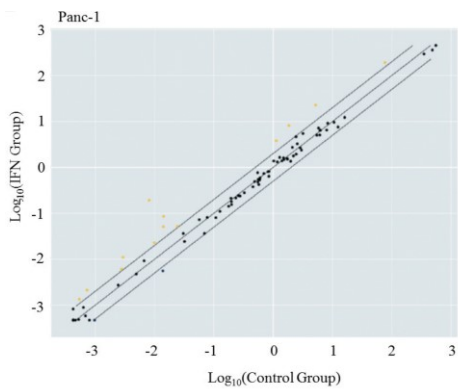


图 5 (C)

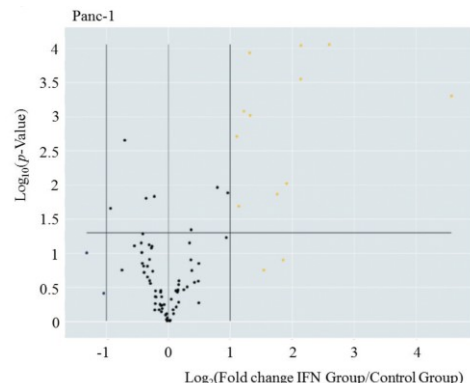


图 6 (A)

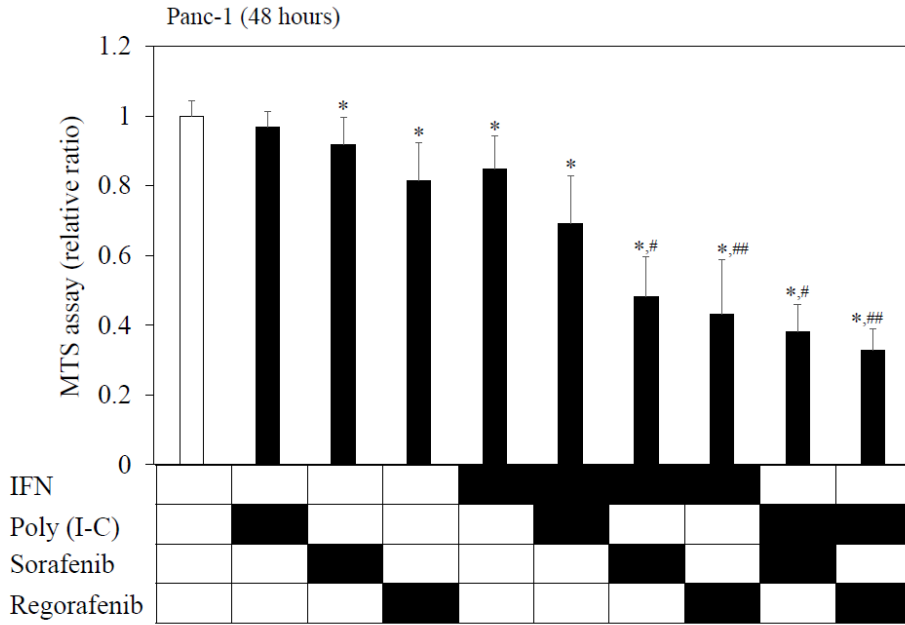
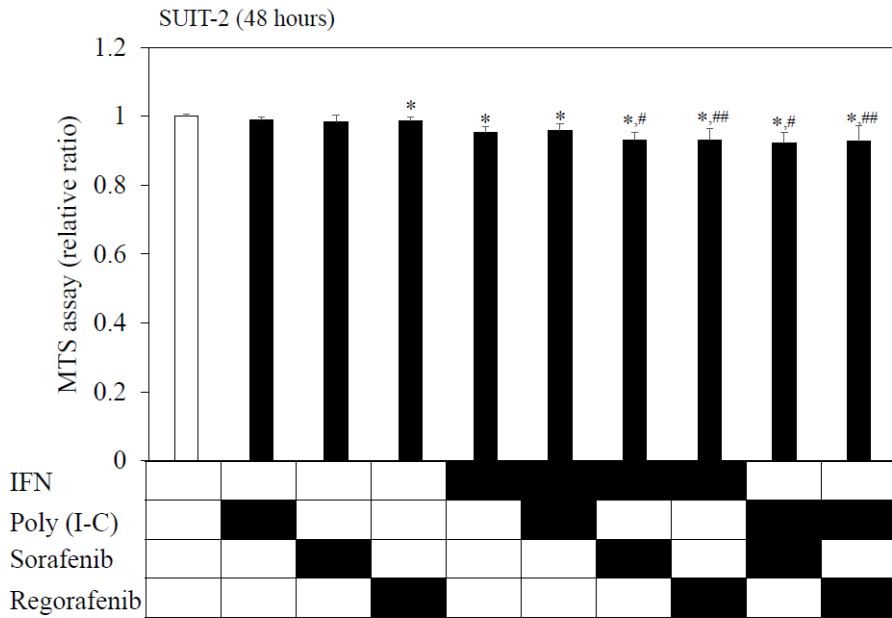


图 6 (B)



図説 Figure Legends

図 1. *IFN* および *TLR3*, *PGDFR* 伝達回路

図 2. *Ingenuity pathway analysis (IPA)* 解析によって各病変間比較から抽出された *Top canonical pathways*.

図 3. (A) ヒト膵癌細胞株に $0.05 \mu\text{g/mL}$ の *IFN* α を投与し *MTS assay* (*Promega, Madison, WI, USA*) で細胞増殖を評価した。下段写真は 120 時間後に撮影。(B) *Panc-1*, (C) *SUIT-2* の増殖を示した。*は、コントロールと比較し $P < 0.05$ のもので、標準偏差を誤差範囲で示した。

図 4. *Wound-healing scratching assay* を行い、*IFN* α を投与した後の遊走能を評価した。(A) *Panc-1*, (B) *SUIT-2*. スクラッチ直後のコントロールを 1 とし、遊走能を比で表している。*は、コントロールと比較し $P < 0.05$ のもので、標準偏差を誤差範囲で示した。

図 5. *IFN* α を投与した際の、ヒト膵癌細胞株においての *toll like receptor* 関連遺伝子の発現をみた。(A)-(C): *Panc-1*, (D)-(F): *SUIT-2*; (A), (D): *Clustergram*; (B),

(E):2 郡間での PCR アレイ上の遺伝子発現を比較し、それらを互いにプロットして、散布図として視覚化した。(C), (F): *Volcano Plot* で、*x* 軸は遺伝子発現の \log_2 、*y* 軸は有意差をプロットし、有意な遺伝子発現変化を特定している。黄丸; 発現亢進遺伝子、青丸 : 発現低下遺伝子; 黒丸、変化なし。

図 6. ヒト膀胱癌細胞株に $IFN\alpha$ もしくは *poly(I:C)* を TKI と併用投与した際の細胞増殖抑制作用を評価している。(A) *Panc-1*, (B) *SUIT-2* の細胞株に $IFN\alpha$ (0.05 $\mu\text{g/mL}$), *poly(I:C)* (5 $\mu\text{g/mL}$), 各 TKI [*sorafenib* (1 μM), *regorafenib* (1 μM)] を単剤もしくは併用で投与し 48 時間後に *MTS assay* で評価した。*は、コントロールと比較し $P < 0.05$ のもので、標準偏差を誤差範囲で示した。#では、*sorafenib* 単剤と比較し $P < 0.05$ だった。##では、*regorafenib* 単剤と比較して $P < 0.05$ だった。

引用文献

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram *et al.*, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [2] T. Kamisawa, L. D. Wood, T. Itoi *et al.*, “Pancreatic cancer,” *The Lancet*, vol. 388, no. 10039. Lancet Publishing Group, pp. 73–85, Jul. 02, 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)00141-0.
- [3] 新一江川, 当間宏樹, 大東弘明ら, “膵癌登録報告 2007 ダイジェスト,” 膵臓, vol. 3, no. 2, pp. 54–67, 2015.
- [4] 日本膵臓学会, “組織学的分類の年次推移”, 膵臓, vol. 22, no. 1, p. e134-e140, 2007, doi: <https://doi.org/10.2958/suizo.22.e134>.
- [5] S. Midha, S. Chawla, and P. K. Garg, “Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review,” *Cancer Lett.*, vol. 381, no. 1, pp. 269–277, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.07.022>.
- [6] G. Q. Shen, E. M. Aleassa, R. M. Walsh *et al.*, “Next-Generation Sequencing in Pancreatic Cancer,” *Pancreas*, vol. 48, no. 6. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 739–748, Jul. 01, 2019, doi: 10.1097/MPA.0000000000001324.
- [7] C. Gromisch, M. Qadan, M. Albuquerque Machado *et al.*, “Pancreatic Adenocarcinoma: Unconventional Approaches for an Unconventional Disease,” *Cancer Res.*, p. canres.2731.2019, Mar. 2020, doi: 10.1158/0008-5472.can-19-2731.
- [8] O. Basturk, S. Hong, L. Wood *et al.*, “A revised classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas,” in *American Journal of Surgical Pathology*, Dec. 2015, vol. 39, no. 12, pp. 1730–1741, doi: 10.1097/PAS.0000000000000533.

- [9] A. V. Bazhin, I. Shevchenko, V. Umansky *et al.*, “Two immune faces of pancreatic adenocarcinoma: Possible implication for immunotherapy,” *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 63, no. 1. pp. 59–65, Jan. 2014, doi: 10.1007/s00262-013-1485-8.
- [10] M. Ruscetti J. Morris, R. Mezzadra *et al.*, “Senescence-Induced Vascular Remodeling Creates Therapeutic Vulnerabilities in Pancreas Cancer,” *Cell*, vol. 181, no. 2, pp. 424-441.e21, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.008.
- [11] S. Hegde V. Krisnawan, B. Herzog *et al.*, “Dendritic Cell Paucity Leads to Dysfunctional Immune Surveillance in Pancreatic Cancer,” *Cancer Cell*, vol. 37, no. 3, pp. 289-307.e9, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.02.008>.
- [12] M. W. L. Teng, S. F. Ngiow, A. Ribas *et al.*, “Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1,” *Cancer Res.*, vol. 75, no. 11, pp. 2139–2145, 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0255.
- [13] T. Kanda, R. Steele, R. Ray *et al.*, “Hepatitis C Virus Infection Induces the Beta Interferon Signaling Pathway in Immortalized Human Hepatocytes,” *J. Virol.*, vol. 81, no. 22, pp. 12375–12381, Nov. 2007, doi: 10.1128/jvi.01695-07.
- [14] P. Rawla, T. Sunkara, and V. Gaduputi, “Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors,” *World J. Oncol.*, vol. 10, no. 1, pp. 10–27, 2019, doi: 10.14740/wjon1166.
- [15] EJ. Shin and MI. Canto, “Pancreatic Cancer Screening,” *Gastroenterol Clin North Am*, vol. 41, no. 1, pp. 143-157. doi:10.1016/j.gtc.2011.12.001.
- [16] A. L. Cubilla and P. J. Fitzgerald, “Morphological Lesions Associated with Human Primary Invasive Nonendocrine Pancreas Cancer,” *Cancer Res.*, vol. 36, no. July, pp. 2690–2698, 1976.
- [17] R. H. M. D. Brat Daniel J. M.D. Ph.D.; Lillemoe, Keith D. M.D.; Yeo, Charles J. M.D.; Warfield, Paul B. M.D.; Hruban, “Progression_of_Pancreatic_Intraductal_Neoplasias.” 1998.
- [18] E. Brockie, A. Anand, and J. Albores-Saavedra, “Progression of atypical ductal

- hyperplasia/carcinoma in situ of the pancreas to invasive adenocarcinoma,” *Ann. Diagn. Pathol.*, vol. 2, no. 5, pp. 286–292, 1998, doi: 10.1016/S1092-9134(98)80020-8.
- [19] J. DiGiuseppe, R. Hruban, G. Offerhaus *et al.*, “Detection of K-ras mutations in mucinous pancreatic duct hyperplasia from a patient with a family history of pancreatic carcinoma,” *Am. J. Pathol.*, vol. 144, no. 5, pp. 889–895, 1994.
- [20] R. H. Hruban, M. Goggins, J. Parsons *et al.*, “Progression model for pancreatic cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 8, pp. 2969–2972, 2000.
- [21] R. H. Hruban, N. Adsay, J. Albores-Saavedra *et al.*, “Pancreatic Intraepithelial Neoplasia,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 25, no. 5, pp. 579–586, 2001, doi: 10.1097/00000478-200105000-00003.
- [22] S. Jones, X. Zhang, D. Parsons *et al.*, “Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses,” *Science (80-.)*, vol. 321, no. 5897, pp. 1801–1806, 2008, doi: 10.1126/science.1164368.
- [23] A. V Biankin, N. Waddell, K. Kassahn *et al.*, “Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes,” *Nature.*, vol. 491, no. 7424, pp. 399–405, 2012, doi: 10.1038/nature11547.Pancreatic.
- [24] N. Waddell, M. Pajic, AM. Patch *et al.*, “Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer,” *Nature.*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, 2015, doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- [25] C. A. Moskaluk, R. H. Hruban, and S. E. Kern, “p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma,” *Cancer Res.*, vol. 57, no. 11, pp. 2140–2143, 1997.
- [26] R. E. Wilentz, J. Geradts, R. Maynard *et al.*, “Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: Loss of intranuclear expression,” *Cancer Res.*, vol. 58, no. 20, pp. 4740–4744, 1998.
- [27] T. Furukawa, M. Sunamura, F. Motoi *et al.*, “Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer,” *Am. J. Pathol.*, vol.

- 162, no. 6, pp. 1807–1815, 2003, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64315-5.
- [28] M. Tsutsumi and Y. Konishi, “Precancerous conditions for pancreatic cancer,” *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.*, vol. 7, no. 6, pp. 575–579, 2000, doi: 10.1007/s005340070006.
- [29] S. R. Hingorani, E. F. Petricoin III, A. Maitra *et al.*, “Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse,” *Cancer Cell*, vol. 5, no. 1, p. 103, 2004, doi: 10.1016/S1535-6108(03)00335-0.
- [30] I. Heid, K. Steiger, M. Trajkovic-Arsic *et al.*, “Co-clinical assessment of tumor cellularity in pancreatic cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 23, no. 6, pp. 1461–1470, 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2432.
- [31] M. K. Kirby, R. C. Ramaker *et al.*, “RNA sequencing of pancreatic adenocarcinoma tumors yields novel expression patterns associated with long-term survival and reveals a role for ANGPTL4,” *Mol. Oncol.*, vol. 10, no. 8, pp. 1169–1182, 2016, doi: 10.1016/j.molonc.2016.05.004.
- [32] Michael R. Emmert-Buck, Robert F. Bonner, Paul D. Smith *et al.*, “Laser capture microdissection,” *Mol. Diagnostics Clin. Lab.*, vol. 274, no. November, pp. 219–224, 2005, doi: 10.1385/1-59259-928-1:219.
- [33] K. Schütze and G. Lahr, “Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 16, no. 8, pp. 737–742, 1998, doi: 10.1038/nbt0898-737.
- [34] N. Masuda, T. Ohnishi, S. Kawamoto *et al.*, “Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 22, pp. 4436–4443, 1999, doi: 10.1093/nar/27.22.4436.
- [35] S. von Ahlfen, A. Missel, K. Bendrat *et al.*, “Determinants of RNA quality from FFPE samples,” *PLoS One*, vol. 2, no. 12, pp. 1–7, 2007, doi: 10.1371/journal.pone.0001261.
- [36] J. Hedegaard, K. Thorsen, M. Lund *et al.*, “Next-Generation Sequencing of RNA

- and DNA Isolated from Paired Fresh-Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples of Human Cancer and Normal Tissue,” *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e98187, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0098187.
- [37] W. Z. Qi Long, Jianpeng Xu, Adeboye O. Osunkoya *et al.*, “Global transcriptome analysis of formalin-fixed prostate cancer specimens identifies biomarkers of disease recurrence,” vol. 74, no. 12, pp. 3228–3237, 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2699.Global.
- [38] O. Eikrem, C. Beisland, K. Hjelle *et al.*, “Transcriptome sequencing (RNAseq) enables utilization of formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies with clear cell renal cell carcinoma for exploration of disease biology and biomarker development,” *PLoS One*, vol. 11, no. 2, pp. 1–19, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0149743.
- [39] A. S. Nikitina, E. Sharova, S. Danilenko *et al.*, “Novel RNA biomarkers of prostate cancer revealed by RNA-seq analysis of formalin-fixed samples obtained from Russian patients,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 20, pp. 32990–33001, May 2017, doi: 10.18632/oncotarget.16518.
- [40] Y. Nagano and Y. Kojima, “[Inhibition of vaccinia infection by a liquid factor in tissues infected by homologous virus].,” *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, vol. 152, no. 11, pp. 1627–1629, 1958.
- [41] A. Isaacs and J. Lindenmann, “Virus interference. I. The interferon,” *Proc. R. Soc. London. Ser. B - Biol. Sci.*, vol. 147, no. 927, pp. 258–267, 1957, doi: 10.1098/rspb.1957.0048.
- [42] A.A. Branca, C. Baglioni, “Evidence that types I and II interferons have different receptors,” *Nature*, vol. 294, no. 5843, pp. 768–770, 1981, doi: 10.1038/294768a0.
- [43] V. Espinosa, O. Dutta, C. McElrath *et al.*, “Type III interferon is a critical regulator of innate antifungal immunity,” *Sci. Immunol.*, vol. 2, no. 16, 2017, doi: 10.1126/sciimmunol.aan5357.

- [44] S. Pestka, C. D. Krause, and M. R. Walter, "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors," *Immunological Reviews*, Vol. 202, pp. 8–32, 2004.
- [45] J. Treuner, D. Niethammer, G. Dannecker *et al.*, "Successful Treatment of Nasopharyngeal Carcinoma With Interferon," *Lancet*, vol. 315, no. 8172, pp. 817–818, 1980, doi: 10.1016/S0140-6736(80)91308-2.
- [46] N. Kayagaki, N. Yamaguchi, M. Nakayama *et al.*, "Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs," *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 9, pp. 1451–1460, 1999, doi: 10.1084/jem.189.9.1451.
- [47] R. C. Flanigan *et al.*, "Nephrectomy Followed by Interferon Alfa-2b Compared with Interferon Alfa-2b Alone for Metastatic Renal-Cell Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 345, no. 23, pp. 1655–1659, Dec. 2001, doi: 10.1056/NEJMoa003013.
- [48] K. Funa, B. Nilsson, G. Jacobsson *et al.*, "Decreased natural killer cell activity and interferon production by leucocytes in patients with adenocarcinoma of the pancreas," *Br. J. Cancer*, vol. 50, pp. 231-233, 1984.
- [49] S. Booy, L. holfland, A. Waaijers *et al.*, "Type I Interferon Receptor Expression in Human Pancreatic and Periampullary Cancer Tissue," *Pancreas*, vol. 44, no.1, 99–105, 2014. Online. Available: www.pancreasjournal.com.
- [50] N. Matsubara, S. Fuchimoto, and K. Orita, "Antiproliferative effects of natural human tumor necrosis factor- α , interferon- α , and interferon- γ on human pancreatic carcinoma cell lines," *Int. J. Pancreatol.*, vol. 8, no. 3, pp. 235–243, 1991, doi: 10.1007/BF02924542.
- [51] C. E. Welander, "Overview of preclinical and clinical studies of interferon alfa-2b in combination with cytotoxic drugs," *Investigational New Drugs*, vol. 5, Suppl. 47-59, 1987.
- [52] A. Knuth, H. Bernhard, O. Klein *et al.*, "Combination fluorouracil, folinic acid,

- and interferon alfa-2a: an active regimen in advanced pancreatic carcinoma.” *Seminars in Oncology*, vol. 19, no.2, Suppl. 3, pp. 211-214, 1992.
- [53] H. Bernhard, E. Jager-Arand, G. Bernhard *et al.*, “Treatment of advanced pancreatic cancer with 5-fluorouracil, folinic acid and interferon alpha-2A: Results of a phase II trial,” *Br. J. Cancer*, vol. 71, no. 1, pp. 102–105, 1995, doi: 10.1038/bjc.1995.20.
- [54] R. Pazdur, J. A. Ajani, Y. Z. Putt *et al.*, “Phase II Evaluation of Recombinant Alpha-2a-Interferon and Continuous Infusion Fluorouracil in Previously Untreated Metastatic Colorectal Adenocarcinoma,” *Cancer*, vol. 71, no.4, pp. 1214-8, 1993, doi: 10.1002/1097-0142(19930215)71:4<1214::aid-cncr2820710407>3.0.co;2-t.
- [55] Hansen RM, Borden EC, “Current status of interferons in the treatment of cancer.” *Oncology (Williston Park)*, vol. 6, no. 11, pp. 19-29. 1992
- [56] J. William J and M.Q. Flett, “Continuous Venous Infusion 5-Fluorouracil and Interferon- α in Pancreatic Carcinoma,” *American Journal of Clinical Oncology*, vol. 21, pp. 147-150, 1998.
- [57] M. Sakon, H. Nagano, K. Dono *et al.*, “Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon- α therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches,” *Cancer*, vol. 94, no. 2, pp. 435–442, Jan. 2002, doi: 10.1002/cncr.10246.
- [58] S. Obi, H. Yoshida, R. Toune *et al.*, “Combination therapy of intraarterial 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with portal venous invasion,” *Cancer*, vol. 106, no. 9, pp. 1990–1997, May 2006, doi: 10.1002/cncr.21832.
- [59] S. Booy, C. H. J. van Eijck, F. Dogan *et al.*, “Influence of type-I Interferon receptor expression level on the response to type-I Interferons in human pancreatic cancer cells,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 18, no. 3, pp. 492–502, Mar. 2014, doi: 10.1111/jcmm.12200.

- [60] S. Booy, L. Hofland, and C. Van Eijck, "Potentials of interferon therapy in the treatment of pancreatic cancer," *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 35, no. 5, pp. 327–339, May 2015, doi: 10.1089/jir.2014.0157.
- [61] J. Schmidt, U. Abel, J. Debus *et al.*, "Open-label, multicenter, randomized phase III trial of adjuvant chemoradiation plus interferon alfa-2b versus fluorouracil and folinic acid for patients with resected pancreatic adenocarcinoma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 33, pp. 4077–4083, Nov. 2012, doi: 10.1200/JCO.2011.38.2960.
- [62] D. V Shchebliakov, D. Y. Logunov, A. I. Tukhvatulin *et al.*, "Toll-Like Receptors (TLRs): The Role in Tumor Progression," *Acta Naturae*, vol. 2, no. 3, pp. 21–29, 2010, doi: 10.32607/20758251-2010-2-3-21-29.
- [63] M. A. Mac Cheever, "Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers," *Immunol. Rev.*, vol. 222, no. 1, pp. 357–368, 2008, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00604.x.
- [64] A. Iwasaki and R. Medzhitov, "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses," *Nat. Immunol.*, vol. 5, no. 10, pp. 987–995, 2004, doi: 10.1038/ni1112.
- [65] M. Tatematsu, T. Seya, and M. Matsumoto, "Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses," *Biochem. J.*, vol. 458, no. 2, pp. 195–201, 2014, doi: 10.1042/BJ20131492.
- [66] A. L. Schwartz, R. Malgor, E. Dickerson *et al.*, "Phenylmethimazole decreases toll-like receptor 3 and noncanonical Wnt5a expression in pancreatic cancer and melanoma together with tumor cell growth and migration," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 12, pp. 4114–4122, Jun. 2009, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0005.
- [67] H. Bo, S. Zhang, L. Gao *et al.*, "Upregulation of Wnt5a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells," *BMC Cancer*, vol. 13, 2013, doi: 10.1186/1471-2407-13-496.

- [68] H. Shojaei, H. Oberg, M. Juricke *et al.*, “Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human $\gamma\delta$ T cells,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 22, pp. 8710–8717, Nov. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1602.
- [69] A. Sistigu, T. Yamazaki, E. Vacchelli *et al.*, “Cancer cell–autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy,” *Nat. Med.*, vol. 20, no. 11, pp. 1301–1309, 2014, doi: 10.1038/nm.3708.
- [70] M. Matsumoto *et al.*, “Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo,” *Nat. Commun.*, vol. 6, 2015, doi: 10.1038/ncomms7280.
- [71] X. Jiang, T. Kanda, S. Nakamoto *et al.*, “Knockdown of glucose-regulated protein 78 enhances poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in human pancreatic cancer cells exposed to endoplasmic reticulum stress,” *Oncol. Rep.*, vol. 32, no. 6, pp. 2343–2348, Dec. 2014, doi: 10.3892/or.2014.3533.
- [72] R. Sasaki, T. Kanda, M. Fujisawa *et al.*, “Different mechanisms of action of regorafenib and lenvatinib on toll-like receptor-signaling pathways in human hepatoma cell lines,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 9, May 2020, doi: 10.3390/ijms21093349.
- [73] K. Okitsu, T. Kanda, F. Imazaki *et al.*, “Involvement of interleukin-6 and androgen receptor signaling in pancreatic cancer,” *Genes and Cancer*, vol. 1, no. 8, pp. 859–867, 2010, doi: 10.1177/1947601910383417.
- [74] M. Ida-Hosonuma, T. Iwasaki, T. Yoshikawa *et al.*, “The Alpha/Beta Interferon Response Controls Tissue Tropism and Pathogenicity of Poliovirus,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 7, pp. 4460–4469, Apr. 2005, doi: 10.1128/jvi.79.7.4460-4469.2005.
- [75] M. Overman, M. Javle, R. E. Davis *et al.*, “Randomized phase II study of the Bruton tyrosine kinase inhibitor acalabrutinib, alone or with pembrolizumab in patients with advanced pancreatic cancer,” *J. Immunother. Cancer*, vol. 8, no. 1, Feb. 2020, doi: 10.1136/jitc-2020-000587.
- [76] S. Kaowinn, I. Cho, J. Moon *et al.*, “Pancreatic adenocarcinoma upregulated

- factor (PAUF) confers resistance to pancreatic cancer cells against oncolytic parvovirus H-1 infection through IFNA receptor-mediated signaling,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 459, no. 2, pp. 313–318, 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.107.
- [77] M. Swayden, G. Alzeeb, R. Masoud *et al.*, “PML hyposumoylation is responsible for the resistance of pancreatic cancer,” *FASEB J.*, vol. 33, no. 11, pp. 12447–12463, 2019, doi: 10.1096/fj.201901091R.
- [78] D. Balabanov, L. Zhao, Z. Zhu *et al.*, “IL-29 Exhibits Anti-Tumor Effect on Pan-48 Pancreatic Cancer Cells by Up-regulation of P21 and Bax,” *Anticancer Res.*, vol. 39, no. 7, pp. 3493–3498, 2019, doi: 10.21873/anticanres.13495.
- [79] N. Muthalagu, T. Monteverde, X. Raffo-Iraolagoitia *et al.*, “Repression of the Type I Interferon Pathway Underlies MYC- and KRAS-Dependent Evasion of NK and B Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma,” *Cancer Discov.*, no. june, 2020, doi: 10.1158/2159-8290.cd-19-0620.
- [80] R. L. Marquet, H. Schellekens, D. L. Westbroek *et al.*, “Effect of treatment with interferon and cyclophosphamide on the growth of a spontaneous liposarcoma in rats,” *Int. J. Cancer*, vol. 31, no. 2, pp. 223–226, 1983, doi: 10.1002/ijc.2910310215.
- [81] K. Mitsuhashi *et al.*, “Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 9, 2015, [Online]. Available: www.impactjournals.com/oncotarget.
- [82] E. Riquelme *et al.*, “Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes,” *Cell*, vol. 178, no. 4, pp. 795-806.e12, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.07.008.
- [83] Y. Wu, X. Wu, L. Wu *et al.*, “The anticancer functions of RIG-I-like receptors, RIG-I and MDA5, and their applications in cancer therapy,” *Transl. Res.*, vol. 190, pp. 51–60, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.08.004>.
- [84] P. Duewell, A. Steger, H. Lohr *et al.*, “RIG-I-like helicases induce immunogenic

- cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8(+) T cells,” *Cell Death Differ.*, vol. 21, no. 12, pp. 1825–1837, Dec. 2014, doi: 10.1038/cdd.2014.96.
- [85] J. Ellermeier, J. Wei, P. Duewell *et al.*, “Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF- β 1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer,” *Cancer Res.*, vol. 73, no. 6, pp. 1709–1720, Mar. 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3850.
- [86] G. Meng, M. Xia, C. Xu *et al.*, “Multifunctional antitumor molecule 5'-triphosphate siRNA combining glutaminase silencing and RIG-I activation,” *Int. J. Cancer*, vol. 134, no. 8, pp. 1958–1971, Apr. 2014, doi: 10.1002/ijc.28416.
- [87] P. Duewell, E. Beller, S. Kirchleitner *et al.*, “Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma,” *Oncoimmunology*, vol. 4, no. 10, Oct. 2015, doi: 10.1080/2162402X.2015.1029698.
- [88] M. Das, L. Shen, Q. Liu *et al.*, “Nanoparticle Delivery of RIG-I Agonist Enables Effective and Safe Adjuvant Therapy in Pancreatic Cancer,” *Mol. Ther.*, vol. 27, no. 3, pp. 507–517, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.11.012.
- [89] Z. Von Marschall, A. Scholz, T. Cramer *et al.*, “Effects of Interferon Alpha on Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription and Tumor Angiogenesis.” [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/95/6/437/2520654>.
- [90] C. Solorzano, R. Hwang, C. Baker *et al.*, “Administration of optimal biological dose and schedule of interferon α combined with gemcitabine induces apoptosis in tumor-associated endothelial cells and reduces growth of human pancreatic carcinoma implanted orthotopically in nude mice,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, no. 5, pp. 1858–1867, 2003.
- [91] V. S. Madamsetty, K. Pal, S. Dutta *et al.*, “Design and Evaluation of PEGylated Liposomal Formulation of a Novel Multikinase Inhibitor for Enhanced Chemosensitivity and Inhibition of Metastatic Pancreatic Ductal

- Adenocarcinoma,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 30, no. 10, pp. 2703–2713, Oct. 2019, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00632.
- [92] L. Sun, Z. Jiang, V. Acosta-Rodriguez *et al.*, “HCFC2 is needed for IRF1- and IRF2-dependent Tlr3 transcription and for survival during viral infections,” *J. Exp. Med.*, vol. 214, no. 11, pp. 3263–3277, Nov. 2017, doi: 10.1084/jem.20161630.
- [93] T. Kumagi, T. Terao, T. Yokota *et al.*, “Early Detection of Pancreatic Cancer in Patients With Chronic Liver Disease Under Hepatocellular Carcinoma Surveillance,” in *Mayo Clinic Proceedings*, Oct. 2019, vol. 94, no. 10, pp. 2004–2010, doi: 10.1016/j.mayocp.2018.12.034.
- [94] R. Sasaki, K. Meyer, M. moriyama *et al.*, “Rapid hepatitis C virus clearance by antivirals correlates with immune status of infected patients,” *J. Med. Virol.*, vol. 91, no. 3, pp. 411–418, Mar. 2019, doi: 10.1002/jmv.25310.

研究業績

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科学系消化器肝臓内科学専攻

藤澤 真理子

I 発表	①一般発表	18	
	②特別発表	4	
II 論文	①原著論文	2	(共 2)
	②症例報告	5	(共 5)
	③総説	8	(共 8)
III 著書		0	

以上

I-① 一般発表

1. 荒川 典之, 山部 茜子, 入澤 篤志, 澁川 悟朗, 佐藤 愛, 藤澤 真理子, 吉田 栄継, 池田 恒彦, 阿部 洋子, 五十嵐 亮, 牧 匠, 山本 勝悟, 北條 洋 : 免疫染色が診断に有用であった腎細胞癌胃転移の 1 例, 第 93 回日本消化器内視鏡学会総会, 大阪, 2017 年 5 月
2. 藤澤 真理子, 入澤 篤志, 澁川 悟朗, 佐藤 愛, 山部 茜子, 荒川 典之, 吉田 栄継 : 当院における 80 歳以上の ESD 症例に関する検討, 第 93 回日本消化器内視鏡学会総会, 大阪, 2017 年 5 月
3. 藤澤 真理子, 入澤 篤志, 澁川 悟朗, 佐藤 愛, 山部 茜子, 荒川 典之 : 悪性胆道狭窄を伴う膵癌における早期 EUS-FNA 施行に関する検討, 第 93 回日本消化器内視鏡学会総会, 大阪, 2017 年 5 月
4. 渋川 悟朗, 入澤 篤志, 佐藤 愛, 山部 茜子, 藤澤 真理子, 五十嵐 亮, 荒川 典之, 吉田 栄継, 牧 匠, 山元 勝悟 : 十二指腸非乳頭部腫瘍に対する underwater EMR, 第 93 回日本消化器内視鏡学会総会, 大阪, 2017 年 5 月
5. 山部 茜子, 入澤 篤志, 渋川 悟朗, 佐藤 愛, 藤澤 真理子, 荒川 典之, 吉田 栄継, 阿部 洋子, 五十嵐 亮, 牧 匠, 山元 勝悟 : 小さな消化管粘膜下病変診断における、先端キャップ装着直視型コンベックス超音波内視鏡を用いた EUS-FNA の有用性, 第 93 回日本消化器内視鏡学会総会, 大阪, 2017 年 5 月
6. 佐藤 愛, 入澤 篤志, 澁川 悟朗, 山部 茜子, 藤澤 真理子, 荒川 典之, 吉田 栄継, 池田 恒彦, 阿部 洋子, 五十嵐 亮, 牧 匠, 山元 勝悟 : 超音波内視鏡による膵異常所見と膵外分泌機能との関連について, 第 48 回日本膵臓学会大会, 京都, 2017 年 7 月
7. 五十嵐 亮, 入澤 篤志, 澁川 悟朗, 佐藤 愛, 山部 茜子, 藤澤 真理子, 荒川 典之, 吉田 栄継, 阿部 洋子, 牧 匠, 山元 勝悟, 池田 恒彦, 北條 洋 : 膵腫瘤性病変に対する EUS-FNA における EUS Sonopsy CY(R) と EUS-FNB 針の診断能の比較検討 前向きクロスオーバー比較試験, 第 94 回日本消化器内視鏡学会総会, 福岡, 2017 年 10 月
8. 渋川 悟朗, 入澤 篤志, 藤澤 真理子, 佐藤 愛, 山部 茜子, 荒川 典之, 吉田 栄継, 五十嵐 亮, 牧 匠, 山元 勝悟 : 十二指腸非乳頭部腫瘍に対する underwater EMR の検討, 第 94 回日本消化器内視鏡学会総会, 福岡, 2017 年 10 月
9. 佐藤 愛, 入澤 篤志, 澁川 悟朗, 山部 茜子, 藤澤 真理子, 荒川 典之, 吉田 栄継, 池

田 恒彦, 阿部 洋子, 五十嵐 亮, 牧 匠, 山元 勝悟 : 超音波内視鏡による膵異常所見と膵外分泌機能との関連について, 第 59 回日本消化器病学会大会, 福岡, 2017 年 10 月

10. 黒澤 雄介, 藤澤 真理子, 松本 直樹, 上村 慎也, 金澤 芯依, 山名 陽一郎, 石井 大雄, 今津 博雄, 松岡 俊一, 森山 光彦 : 血小板減少症を有する食道静脈瘤に対する内視鏡治療時の出血リスクの検討, 第 42 回 日本肝臓学会西部会, 福岡, 2017 年 11 月
11. 牧 匠, 入澤 篤志, 澁川 悟朗, 佐藤 愛, 阿部 洋子, 山部 茜子, 藤澤 真理子, 荒川 典之, 吉田 栄継, 五十嵐 亮, 山元 勝悟, 池田 恒彦, 忌部 航 : 通常造影カテーテルを用いた Wire-guided cannulation におけるガイドワイヤー(ストレート型 or アングル型)の選択, 第 94 回日本消化器内視鏡学会総会, 福岡, 2017 年 10 月
12. 松本 直樹, 小川 眞広, 野村 舟三, 藤澤 真理子, 高橋 利実, 竜崎 仁美, 中河原 浩史, 今津 博雄, 森山 光彦, 片山 和弥 : 高周波プローブを用いた体外式腹部超音波での早期慢性膵炎所見の拾い上げの試み, 第 91 回日本超音波医学会, 神戸, 2018 年 5 月
13. 菊田 大一郎, 中河原 浩史, 武井 章矩, 藤澤 真理子, 岩塚 邦生, 高橋 利実, 山本 敏樹, 小川 眞広, 今津 博雄, 山雄 健次, 後藤田 卓志, 森山 光彦, 逸見 明博 : 膵管癌による髄膜癌腫症に対し GEM+nab-PTX 併用療法および全脳照射を施行した一剖検例, 第 49 回日本膵臓学会大会, 和歌山, 2018 年 6 月
14. 神田 達郎, 樋口 晃久, 中村 仁美, 松本 直樹, 高橋 央, 金子 朋弘, 藤澤 真理子, 金澤 芯依, 山名 陽一郎, 水谷 卓, 上村 慎也, 山上 裕晃, 今津 博雄, 松岡 俊一, 森山 光彦 : 非アルコール性脂肪肝炎病態進展における Arrdc3 の役割, 第 41 回栄養アセスメント研究会, 東京, 2018 年 6 月
15. 野村 舟三, 今津 博雄, 葉山 譲, 香川 敦宣, 松田 昌範, 藤澤 真理子, 森山 光彦 : 慢性膵炎診断における超音波内視鏡画像定量化解析の試み, 第 49 回日本膵臓学会大会, 和歌山, 2018 年 6 月
16. 野村 舟三, 今津 博雄, 森山 光彦, 葉山 譲, 香川 敦宣, 濱名 傑, 國吉 宜行, 藤澤 真理子 : 悪性胆道狭窄に対する細径チューブを用いた内視鏡的ドレナージ術の有用性について, 第 97 回日本消化器内視鏡学会総会, 東京, 2019 年 5 月
17. 神田 達郎, 上村 慎也, 水谷 卓, 本田 真之, 金子 朋弘, 高橋 央, 藤澤 真理子, 松本 直樹, 楡井 和重, 松岡 俊一, 小川 眞広, 森山 光彦 : 味噌、亜鉛のもつ A 型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用に関する検討, 第 42 回栄養アセスメント研究会, 大阪,

2019年6月

18. 青木 央, 國吉 宣行, 葉山 讓, 今津 博雄, 大木 庸子, 大澤 朗太, 濱名 傑, 武井 章矩, 藤澤 真理子, 神田 達郎, 松岡 俊一, 森山 光彦, 西巻 はるな, 大荷 澄江 : 超音波内視鏡及び胆道内視鏡にて術前診断し得た intracystic papillary neoplasm(ICPN)with an associated adenocarcinoma の1例, 第358回日本消化器病学会関東支部例会, 東京, 2020年2月

I-② 特別発表

1. 五十嵐 亮, 入澤 篤志, 岡崎 彰仁, 花田 敬士, 澁川 悟朗, 佐藤 愛, 山部 茜子, 藤澤 真理子, 荒川 典之, 吉田 栄継, 池田 恒彦, 阿部 洋子, 牧 匠, 山元 勝悟 : 慢性膵炎の進展予防を目的とした治療 その適応と限界 早期慢性膵炎のEUS所見を呈する患者への高力価膵酵素補充療法の意義, 第48回日本膵臓学会大会, 京都, 2017年7月
2. 藤澤 真理子, 松本 直樹, 今津 博雄, 石井 大雄, 山名 陽一郎, 金澤 芯依, 上村 慎也, 松岡 俊一, 森山 光彦 : EVL 私はこうしている 標準化を目指して 当院での食道静脈瘤に対する内視鏡治療の実際, 第24回日本門脈圧亢進症学会総会, 2017年9月
3. 野村 舟三, 今津 博雄, 香川 敦宣, 藤澤 真理子, 森山 光彦 : EUSを用いた膵胆道疾患の診断と治療 急性胆管炎に対する緊急EUS-first strategyの有用性について, 第107回日本消化器内視鏡学会関東支部例会, 2018年12月
4. 野村 舟三, 今津 博雄, 葉山 讓, 香川 敦宣, 濱名 傑, 國吉 宣行, 藤澤 真理子, 森山 光彦 : 慢性膵炎の戦略 慢性膵炎診断における超音波内視鏡画像定量化解析の試み, 第50回日本膵臓学会大会, 東京, 2019年7月

II-① 原著論文

1. Sato A, Irisawa A, Bhutani MS, Shibukawa G, Yamabe A, Fujisawa M, Igarashi R, Arakawa N, Yoshida Y, Abe Y, Maki T, Hoshi K, Ohira H : Significance of normal appearance on endoscopic ultrasonography in the diagnosis of early chronic pancreatitis, Endoscopic Ultrasound, 7(2):110-118, 2018.
2. Sasaki R, Kanda T, Fujisawa M, Matsumoto N, Masuzaki R, Ogawa M, Matsuoka S, Kuroda K, Moriyama M : Different Mechanisms of Action of Regorafenib and Lenvatinib on Toll-Like Receptor-Signaling Pathways in Human Hepatoma Cell

II-② 症例報告

1. 五十嵐 亮, 入澤 篤志, 澁川 悟朗, 佐藤 愛, 山部 茜子, 藤澤 真理子, 阿部 洋子, 牧 匠, 添田 暢俊, 齋藤 拓朗 : 胆嚢胆管瘻を伴う Mirizzi 症候群 (Corlette I 型、Csendes III 型) の 1 例, 胆道, 31(4):707-713, 2017.
2. Sato A, Irisawa A, Shibukawa G, Yamabe A, Fujisawa M, Arakawa N, Yoshida Y : Early Gastric Cancer Associated with a Gastric Lipoma, ACG Case Report Journal, 4(1):e78, 2017.
3. Yamabe A, Irisawa A, Shibukawa G, Sato A, Fujisawa M, Arakawa N, Yoshida Y, Igarashi R, Maki T, Yamamoto S, Ikeda T, Abe Y, Hoshi K : Inflammatory Bile Duct Obstruction during the Healing Stage of Severe Acute Pancreatitis. Internal Medicine, 56(9):1037-1040, 2017.
4. 高柳 大輔, 澁川 悟朗, 牧 匠, 荒川 典之, 五十嵐 亮, 山部 茜子, 藤澤 真理子, 佐藤 愛, 入澤 篤志 : 保存的治療で軽快した胃 ESD 後の胃蜂窩織炎と考えられた 1 例, Gastroenterological Endoscopy 60(10):2284-2289, 2018.
5. Igarashi R, Irisawa A, Shibukawa G, Soeta N, Sato A, Yamabe A, Fujisawa M, Arakawa N, Yoshida Y, Ikeda T, Abe Y, Maki T, Yamamoto S, Oshibe I, Saito T, Hojo H : Case Report of a Small Gastric Neuroendocrine Tumor in a Deep Layer of Submucosa With Diagnosis by Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration and Treatment With Laparoscopic and Endoscopic Cooperative Surgery, Clinical Medicine Insights: Case Rep, 11:1179547617749226, 2018.

II-③ 総説

1. 今津 博雄, 葉山 譲, 野村 舟三, 香川 敦宣, 松田 昌範, 藤澤 真理子, 高橋 利美, 中 河原 浩史, 後藤田 卓志, 川村 統男, 森山 光彦 : 【胆膵 EUS を極める-私ならこうする (There is always a better way)-】 診断 造影 EUS, 胆と膵, 38 巻臨増特大:927-935, 2017.

2. 山本 勝悟, 入澤 篤志, 渋川 悟朗, 佐藤 愛, 山部 茜子, 藤澤 真理子, 荒川 典之, 吉田 栄継, 阿部 洋子, 五十嵐 亮, 牧 匠, 池田 恒彦 : 【ERCPのエキスパートを目指して】カニューレーションの基本 通常カニューレ法、wire-guided cannulation、膵管ガイドワイヤー法, 消化器内視鏡, 29(5):824-830, 2017.
3. 牧 匠, 入澤 篤志, 渋川 悟朗, 佐藤 愛, 山部 茜子, 藤澤 真理子, 荒川 典之, 吉田 栄継, 池田 恒彦, 阿部 洋子, 五十嵐 亮, 山本 勝悟 : 【胆膵EUSの進歩】EUS-FNAによる治療 胆管ドレナージ, 臨床消化器内科, 32(8):1131-1138, 2017.
4. Yamabe A, Irisawa A, Shibukawa G, Sato A, Fujisawa M, Arakawa N, Yoshida Y, Abe Y, Igarashi R, Maki T, Yamamoto S. Early diagnosis of chronic pancreatitis: understanding the factors associated with the development of chronic pancreatitis. Fukushima Journal of Medical Science, 63(1):1-7, 2017.
5. 今津 博雄, 葉山 譲, 野村 舟三, 香川 敦宣, 濱名 傑, 藤澤 真理子, 川村 統雄, 森山 光彦: 【Biliary access大辞典】経乳頭的 biliary access カニューレーションテクニック 先端斜め型パピロトーム (Oblique-tip papillotome)によるカニューレーションテクニック, 胆と膵, 39 巻臨増特大:969-973, 2018.
6. 今津 博雄, 葉山 譲, 香川 敦宣, 野村 舟三, 濱名 傑, 國吉 宜行, 藤澤 真理子, 森山 光彦 : 【選択的胆管挿管100%をめざして-We're gonna do it!-】Long narrow distal segmentにおける胆管挿管, 胆と膵, 39(12):1361-1365, 2018.
7. Kanda T, Matsuoka S, Yamazaki M, Shibata T, Nirei K, Takahashi H, Kaneko T, Fujisawa M, Higuchi T, Nakamura H, Matsumoto N, Yamagami H, Ogawa M, Imazu H, Kuroda K, Moriyama M : Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases, World Journal of Gastroenterology, 24(25):2661-2672, 2018.
8. 神田 達郎, 樋口 晃久, 中村 仁美, 松本 直樹, 高橋 央, 金子 朋弘, 藤澤 真理子, 金澤 芯依, 本田 真之, 山名 陽一郎, 水谷 卓, 上村 慎也, 山上 裕晃, 楡井 和重, 今津 博雄, 小川 眞広, 松岡 俊一, 森山 光彦, 非アルコール性脂肪肝炎病態進展におけるARRDC3の役割, 栄養 4(1):50-51, 2019.