

令和元年5月30日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18439

研究課題名(和文) Notch/Sox9シグナル阻害剤による膵癌の新規分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular targeted therapy for pancreatic cancer with Notch / Sox9 signal inhibitor

研究代表者

賀川 真吾 (Kagawa, Shingo)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90507302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌は極めて悪性度が高く、手術で切除できたとしても術後早期に再発患者も多い。また抗癌剤治療を行っても、やがて治療抵抗性となることも知られている。我々は膵臓の発生段階での分化を制御するとされているSox9という転写因子に注目し、Sox9の発現の強弱が膵臓癌手術後の予後と関連することを見出した。そこで、膵臓癌由来の細胞株を用いて検証したところ、Sox9の強い発現は抗癌剤に対する耐性と関連し、この抗癌剤耐性を持った細胞は、癌幹細胞の性質をもっていることを証明した。さらにマウスの皮下腫瘍モデルにおいても、Sox9は腫瘍形成能と関連しており、Sox9は膵臓癌の治療対象となり得ることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の悪性度や治療抵抗性を特徴とする癌幹細胞の概念に近年注目が集まっており、このような癌幹細胞を治療標的とすることが必要と考えられている。一方、このような癌幹細胞を生体内で特徴づけるマーカーを見出すことや、如何にこのような細胞を除去するかは、膵臓癌を克服するための重要な課題である。今回我々は、Sox9が膵臓癌幹細胞の維持に貢献しており、治療対象となり得ることを示した。未だSox9をターゲットとした治療方法の開発は研究段階であるが、難治性癌である膵臓癌治療への糸口を示すことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is aggressive disease and in many patients it recur even after curative resection. It is also known that it will become chemo-resistance after treatment. We focused on the transcription factor Sox9, which is thought to regulate differentiation at the developmental stage of the pancreas, and found that the intensity of Sox9 expression was associated with the prognosis after surgery. We analyzed the characteristics of pancreatic cancer cell line and showed the strength of Sox9 is associated with chemo resistance and such cells have cancer stem cell properties. Furthermore, in a mouse subcutaneous tumor model, Sox9 was associated with tumorigenicity, indicating that Sox9 could be a target for treatment of pancreatic cancer.

研究分野：膵臓癌

キーワード：膵臓癌 Sox9 癌幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は極めて予後不良な疾患であるが、近年 Gemcitabine をはじめ S-1、更には FOLFIRINOX レジメンや Gemcitabine + nab-Paclitaxel 療法などが登場し期待されているものの、膵臓癌を有する患者の 5 年生存率は約 7% とされており、膵臓癌克服のためには、膵臓癌の化学療法抵抗性の根底にある分子機構の解明が急務である。

1990 年代半ばに、Bonnet らが急性骨髄性白血病における癌幹細胞の存在を示して以降、癌組織において、自己複製能、多分化能を有する細胞分画、いわゆる癌幹細胞の存在が注目されている。

2. 研究の目的

膵臓癌における化学療法抵抗性に関わる因子を同定するため、膵臓の発生段階の器官形成において重要な役割を果たすとされている Sex determining region Y box9 (Sox9) に着目し、Sox9 による幹細胞性が膵臓癌における化学療法抵抗性を誘導するという仮説のもと、外科的に切除された組織および膵癌細胞株を用いて、膵臓癌での Sox9 の発現の意義およびその機能につき解析することを目的とした。

3. 研究の方法

千葉大学医学部附属病院にて切除され病理学的に浸潤性膵管癌と診断された 106 症例につき切除標本における免疫組織化学染色により Sox9 の発現を高発現群、低発現群に分類し比較。

膵癌細胞株は PANC-1, CFPAC-1, BxPC-3, AsPC-1, Capan-1, MIA PaCa-2 を使用。

抗癌剤感受性は膵癌細胞株に 5-FU および Gemcitabine 添加後、72 時間にて Cell counting kit (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) により細胞数をカウント。siRNA は Sox9 siRNA-1, -2 and Negative siRNA (QIAGEN) を使用。Flow cytometry analysis には APC-anti human CD44 (BD pharmingen), PE/Cy7-anti human CD24 (BioLegend) を用いた。shRNA は、Sox9 shRNA-1, -2, Inducible TRIPZ shRNA (GE Healthcare) を用いた。Xenograft transplantation experiments には KSN/SIc nude mice, female, 7W (Japan SLC) を用いた。

4. 研究成果

(1) Sox9 高発現群は膵癌の予後不良因子である。

106 症例の膵癌組織につき、免疫組織化学染色を行い、Sox9 発現に付き評価した。Sox9 高発現例と低発現例を比較したところ、各群の患者背景に差は認めなかった (表 1)。

表 1

| | Total | Sox9 high (n=52) | Sox9 low (n=54) | p-value |
|------------------------------------|----------------|------------------|-----------------|---------|
| Age, mean ± S.D. (years) | 66.2 ± 8.9 | 66.0 ± 9.4 | 66.0 ± 8.4 | 0.779 |
| Sex, male/female | 65/41 | 30/22 | 35/19 | 0.451 |
| Location, head/ body, tail | 77/29 | 37/15 | 40/14 | 0.582 |
| Preoperative CA19-9 | 906 ± 2025 | 1249 ± 2468 | 574 ± 1426 | 0.086 |
| Histology, papillary/well/mod/poor | 3/20/73/10 | 2/11/34/5 | 1/9/39/5 | 0.772 |
| pT, 1/2/3/4 | 4/3/42/57 | 1/1/21/29 | 3/2/21/28 | 0.262 |
| pN, 0/1 | 24/82 | 13/39 | 11/43 | 0.569 |
| pM, 0/1 | 93/13 | 45/7 | 48/6 | 0.712 |
| UICC stage, IA/IB/IIA/IIIB/IIIV | 2/1/18/64/8/13 | 1/1/10/29/4/7 | 1/0/8/35/4/6 | 0.408 |
| pPV, +/- | 61/45 | 21/31 | 24/30 | 0.673 |
| pA, +/- | 97/9 | 47/5 | 50/4 | 0.684 |
| pPL, +/- | 72/34 | 35/17 | 37/17 | 0.894 |
| R, 0/1/2 | 76/26/4 | 36/14/2 | 40/12/2 | 0.580 |
| Neoadjuvant chemotherapy, N/Y | 96/10 | 46/6 | 50/4 | 0.467 |
| Adjuvant chemotherapy, N/Y | 13/93 | 5/47 | 8/46 | 0.415 |

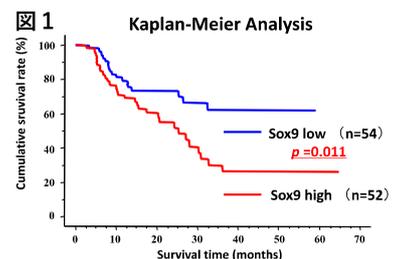
(Chi-square test)

表 2

| Variables | Overall survival | | | | | |
|---|---------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|
| | Univariate analysis | | | Multivariate analysis | | |
| | Exp | 95% confidence interval | p-value | Exp | 95% confidence interval | p-value |
| Age (<66/≥66) | 0.479 | 0.242-0.950 | 0.0350 | 0.553 | 0.295-1.038 | 0.651 |
| Sex | 1.629 | 0.794-3.344 | 0.183 | | | |
| Histological grade Poor diff. / others | 0.063 | 0.021-0.193 | <0.0001 | 0.068 | 0.027-0.172 | <0.0001 |
| Location, Head / body, tail | 0.602 | 0.242-1.496 | 0.274 | | | |
| CA19-9 (<37/≥37) | 0.627 | 0.294-1.337 | 0.228 | | | |
| Stage (IA, IB, IIA/IIIB, III, IV) | 0.467 | 0.038-5.692 | 0.551 | | | |
| T (I, II/III, IV) | 0.507 | 0.053-4.857 | 0.555 | | | |
| N (-/+) | 0.222 | 0.024-2.083 | 0.187 | | | |
| M (-/+) | 0.168 | 0.066-0.429 | 0.0002 | 0.193 | 0.085-0.439 | <0.0001 |
| pPV (+/-) | 0.662 | 0.313-1.399 | 0.280 | | | |
| pA (+/-) | 0.192 | 0.068-0.536 | 0.0016 | 0.316 | 0.126-0.796 | 0.0145 |
| pPL (+/-) | 0.765 | 0.315-1.859 | 0.554 | | | |
| R (0/1,2) | 0.350 | 0.143-1.859 | 0.0220 | 0.345 | 0.169-0.705 | 0.0035 |
| Adjuvant therapy (+/-) | 5.654 | 2.132-14.996 | 0.0005 | 3.744 | 1.629-8.603 | 0.0019 |
| Sox9 expression (low/high) | 0.357 | 0.182-0.701 | 0.0027 | 0.344 | 0.183-0.647 | 0.0009 |

(Cox's proportional hazard model)

Sox9 の発現レベルと患者の予後との相関につき解析したところ (図 1) Sox9 高発現の患者は、低発現の患者に比べて予後不良であった。全生存期間に対する予後因子を解析したところ、組織学的グレード、遠隔転移、動脈浸潤、癌遺残度および Sox9 が独立した予後不良因子となっていた。(表 2)



(2) Sox9 の発現は、化学療法抵抗性に関連する。

膵癌細胞株 PANC-1, CFPAC-1, BxPC-3, AsPC-1, Capan-1, MIA PaCa-2) での Sox9 発現を確認し (図 2A) Sox9 低発現株として BxPC-3、高発現株として PANC-1 を用いることとし、検討を進めた。Sox9 低発現の BxPC-3 は抗癌剤 (GEM、5-FU) に感受性を有するが、Sox9 高発現の PANC-1 では抗癌剤抵抗性を示した (図 2)。さらに、このような抗癌剤抵抗性を示す PANC-1 において siRNA を用いて Sox9 の発現を抑制すると (図 3A) GEM に対する感受性が増強した (図 3B)。

図 2

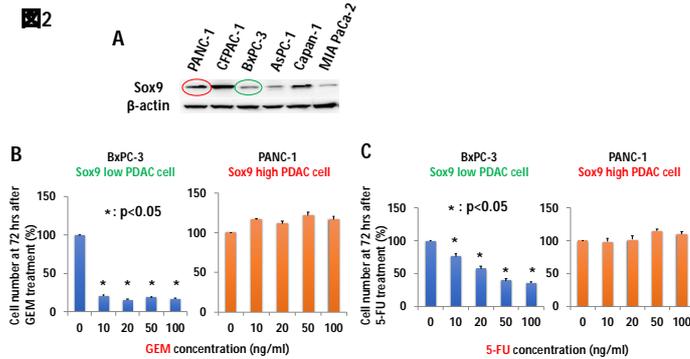
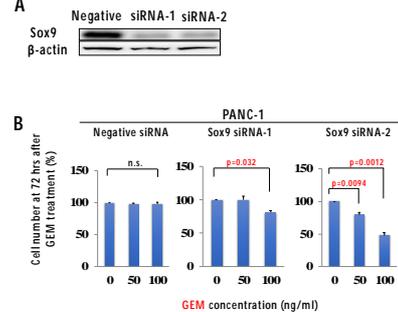


図 3



(3) Sox9 陽性細胞は、自己複製能を有する。

Sox9 高発現細胞は、Ultra Low Attachment Plate 上で無血清培地により図 4A のような Sphere を形成する。siRNA を用いて Sox9 を抑制すると、有意に sphere 形成率が低下、すなわち自己複製能が低下するという結果が得られた。

図 4

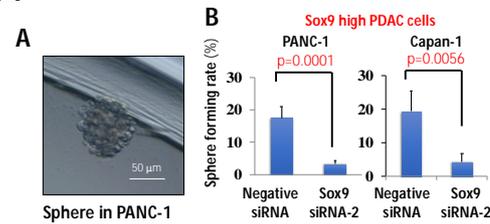
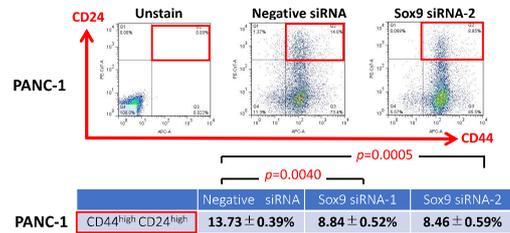


図 5



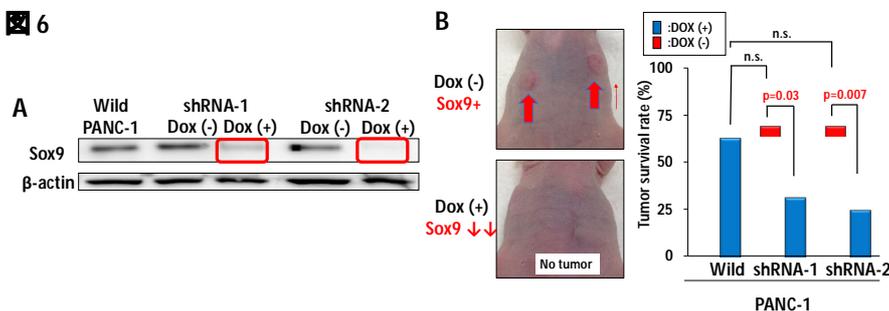
(4) Sox9 の抑制は、膵臓癌幹細胞マーカー CD44, CD24 の発現レベルを減弱させる。

Sox9 の癌幹細胞マーカーの発現との関連に付き、膵臓の幹細胞マーカーと考えられている CD24, CD44 発現レベルを flow cytometry にて評価した。Sox9 を抑制すると CD44^{high} CD24^{high} の細胞が減少した。(図 5)

(5) Sox9 のノックダウンは腫瘍形成能を減弱する。

テトラサイクリン誘導性の Sox9 shRNA を PANC-1 細胞に導入した。この細胞懸濁液をマウスに皮下注し皮下腫瘍モデルを作成し、ドキシサイクリンを投与することにより Sox9 を抑制したところ、Sox9 の低下したものでは有意に腫瘍形成率が低下した。(図 6)

図 6



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Higashihara T, Yoshitomi H, Nakata Y, Kagawa S, Takano S, Shimizu H, Kato A, Furukawa

K, Ohtsuka M, Miyazaki M. Sex Determining Region Y Box 9 Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer Cells by Induction of Putative Cancer Stem Cell Characteristics and Its High Expression Predicts Poor Prognosis. Pancreas. 2017 Nov/Dec;46(10):1296-1304. (査読あり)

賀川 真吾 膵臓癌における Sox9 シグナル制御による抗癌剤耐性機構の解明 日本膵臓病研究財団研究報告書 23 回 Page43-49(2016.12) (査読なし)

〔学会発表〕(計 4 件)

東原 琢, 吉富 秀幸, 中田 泰幸, 賀川 真吾, 高野 重紹, 清水 宏明, 大塚 将之, 加藤 厚, 古川 勝規, 宮崎 勝。膵癌における癌幹細胞マーカーSox9 の有用性、日本消化器外科学会総会 2016 年 7 月 14 日～2016 年 7 月 16 日 徳島

shingo kagawa, taku higasihara, hideyuki yoshitomi, shigetsugu takano, hiroaki shimizu, masayuki ohtsuka, atsushi kato, katsunori furukawa, masaru miyazaki. SOX9 induces chemo-resistance in pancreatic cancer cells and its high expression predicts poor prognosis.AACR Special Conference on Pancreatic Cancer(国際学会), 2016 年 05 月 12 日～ 2016 年 05 月 15 日 Orlando, Florida, USA

東原 琢, 吉富 秀幸, 賀川 真吾, 高野 重紹, 清水 宏明, 大塚 将之, 加藤 厚, 古川 勝規, 高屋敷 吏, 久保木 知, 鈴木 大亮, 酒井 望, 野島 広之, 宮崎 勝。膵癌における SOX9 による抗癌剤耐性メカニズムの解明、日本外科学会定期学術集会 2016 年 04 月 14 日～ 2016 年 04 月 16 日 大阪

東原 琢, 賀川 真吾, 吉富 秀幸, 高野 重紹, 清水 宏明, 大塚 将之, 加藤 厚, 古川 勝規, 高屋敷 吏, 久保木 知, 岡村 大樹, 鈴木 大亮, 酒井 望, 宮崎 勝。膵癌における Sox9 による抗癌剤耐性メカニズムの解明、第 46 回日本膵臓学会大会 2015 年 06 月 19 日～ 2015 年 06 月 20 日 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究分担者氏名：吉富 秀幸

ローマ字氏名：Yoshitomi Hideyuki

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60375631

(2)研究協力者

研究分担者氏名：高野 重紹

ローマ字氏名：Takano Shigetsugu

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：助教

研究者番号（8桁）：20436380

(3)研究協力者

研究協力者氏名：東原 琢

ローマ字氏名：Higashihara Taku

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。