

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：15K19895
研究課題名(和文) 膵発癌過程での間質のオートファジー機能の解明と新規膵癌診断・発癌予防戦略の開発

研究課題名(英文) Elucidation of autophagy function in stromal during pancreatic carcinogenesis process and development of new pancreatic cancer diagnosis or carcinogenesis prevention strategy.

研究代表者
江口 大樹 (EGUCHI, Daiki)
九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90726390
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：予後不良な膵臓癌において、膵癌細胞の増殖にオートファジーが関与しているが、膵癌周囲の膵星細胞とオートファジーの関連の報告は本研究計画時にはなかった。そのため、膵癌間質におけるオートファジーの役割を明らかにすることを目的とした。我々はヒト膵癌切除切片の免疫染色によって、膵癌周囲の膵星細胞のオートファジーが活性化している事を示した。また膵星細胞のオートファジー抑制が膵癌細胞の浸潤能を低下させることを *in vitro*, *in vivo* で示した。さらに正常膵星細胞のオートファジーを亢進させると、膵星細胞が活性化することも示した。これらは国内外の学会、英文雑誌に報告した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is involved in the proliferation of pancreatic cancer cells in pancreatic cancer, but reports on the relation between pancreatic stellate cells surrounding pancreatic cancer and autophagy were not reported at the time of this study. Therefore, we aimed to clarify the role of autophagy in pancreatic cancer stroma. We showed that autophagy of pancreatic stellate cells surrounding pancreatic cancer is activated by immunostaining of human pancreatic cancer section. We also showed that autophagy suppression of pancreatic stellate cells reduces invasive ability of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, we showed that pancreatic stellate cells are activated by enhancing autophagy in normal pancreatic stellate cells. We reported to domestic and international academic societies and English journals.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オートファジー 癌間質 膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌を代表とする難治性固形腫瘍は、早期から浸潤、転移を生じ、発見時に既に治療切除が困難である事が多い。しかしその多くが放射線照射、化学療法抵抗性であり治療抵抗性である。特に膵癌は5年生存率はここ30年間でほとんど改善が無く、治療法の開発は社会的緊急性・重要度が高い。唯一の根治療法である外科的切除が可能な時期に、膵癌を検知して手術を行うことが、予後改善のために必要であるが、膵癌の早期発見は非常に困難であるため、外科的切除が施行できる割合は全体の15~20%に過ぎない。膵癌の早期診断のためには、膵発癌機序の解明と早期診断マーカーの探索が必要不可欠である。

オートファジーは細胞成分をリサイクルする代謝機構であり、細胞機能維持のために活発にコントロールされている。細胞が飢餓などのストレス下にあると、細胞生存のためのエネルギー再分配のためにオートファジーは亢進する。しかし生存維持への試みが失敗すると、オートファジーは細胞死を誘導する(Levine B, Cell, 2008)。オートファジーのこの双方向性の役割は、腫瘍形成の際にも当てはまり、発癌予防に働く一方で、エネルギー供給により進行癌の発育を促進する(Kimmelman AC, Genes & development, 2011)。膵癌標本におけるオートファジーの活性化は予後不良と相関すると報告され、膵癌細胞株のオートファジーは肺癌や乳癌の細胞株と比較して著明にオートファジーが活性化していた。(Fujii, Cancer science, 2008)。膵癌間質における過剰な線維化は、desmoplasia と呼称され、膵癌に顕著な病理学的特徴とされる。desmoplasia の形成主体である活性型膵星細胞は、浸潤癌の段階での癌細胞に対して、腫瘍促進的に働くだけでなく(Vonlaufen, Cancer Research, 2008)、desmoplasia を形成することによって、間質圧の上昇と血管の圧排を引き起こし、薬剤送達効率を低下させて膵癌の治療抵抗性を高めることが明らかになっている(Olive, Science, 2009)。肝星細胞のオートファジー活性化が肝線維化を促進し、オートファジー抑制剤によって肝線維化が抑制されることが報告されているが(Virginia, Gastroenterology, 2012)。膵星細胞とオートファジーの関連の報告は現時点ではない。膵癌の発癌や進展過程における周囲微小環境の重要性が明らかになるに従い、微小環境も発癌の進展に伴って段階的に進展する概念が提唱されており、それは3つの段階(construction, expansion, maturation)から成立するとされている(Barcellos-Hoff, Nature Reviews. Cancer, 2013)。臨床的にも、間質に炎症や線維化が存在する臓器で、腫瘍の発生が有意に増加することが知られている。微小環境の構成要素の中でも、炎症が膵発癌過程に寄与する分子生物学的知見の集積は進んでいるが、線維化が膵発癌過程に与

える詳細な機序を明らかにした報告はほとんどない。

細胞外基質の沈着は、前癌病変であるPanIN 病変周囲にも認めるが(Erkan, Nature Reviews. Gastroenterology & hepatology, 2012)、膵における癌化のプログラミングの初期段階で、局所の膵星細胞が、発癌に対して促進的に作用しているのか、それとも抑制的に作用しているのかは、未だ明らかになっていない。申請者らは、以前より癌間質研究を推進しており(Ohuchida, Cancer Research, 2004)、最近では膵癌 desmoplasia を対象とした間質標的治療の有効性も報告し、肺線維症治療薬であるPirfenidone が、膵癌間質を減少させてジェムザールの抗腫瘍効果を増強させることを明らかにした(Kozono, Cancer Research, 2013)。また、癌細胞の浸潤メカニズムにも注目し、膵癌細胞が細胞外マトリックスを分解するだけでなく、EMT によって増強されるコラーゲンの内在化(collagen internalization)によって浸潤能を増すこと(Ikenaga, PLoS one, 2012)を報告した。さらに、膵癌 desmoplasia を形成する膵星細胞に機能的な heterogeneity が存在し、癌細胞浸潤を増強する特定の subpopulation の存在も明らかにした(Ikenaga, Gastroenterology, 2010)。

2. 研究の目的

膵癌間質におけるオートファジーの役割および、膵発癌過程における間質の機能的な関与とそのメカニズムを明らかにする。この機序の解明によって、発癌の初期における間質の役割の解明、さらには、発癌高リスク間質因子の同定や、間質の発癌誘導メカニズムの制御を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵癌切除切片を用いて、蛍光免疫組織化学染色によって、膵星細胞のオートファジー活性を評価する。

(2) ヒト膵癌切除切片から樹立した膵星細胞を用いて、膵癌細胞株と共培養を行い、膵癌細胞株の浸潤能を評価する。さらに、オートファジー抑制剤や siRNA, shRNA によるオートファジー必須遺伝子の抑制を行い、膵星細胞のオートファジーを抑制した際の膵癌細胞株の浸潤能の変化を評価する。

(3) 膵星細胞のオートファジーを抑制した際の膵星細胞の変化を評価する。

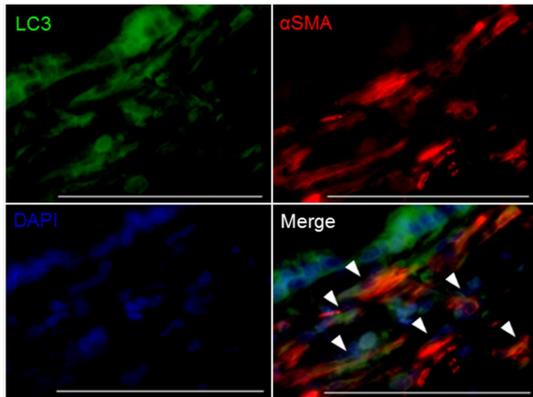
(4) 膵癌細胞株と膵星細胞をマウスの膵に共移植し、膵星細胞のオートファジーを抑制した際の変化を評価する。

(5) 正常膵星細胞を用いて、癌上清を添加した場合やオートファジーを活性化した場合の変化を評価する。

4. 研究成果

(1) ヒト膵癌切除切片を用いた蛍光免疫組

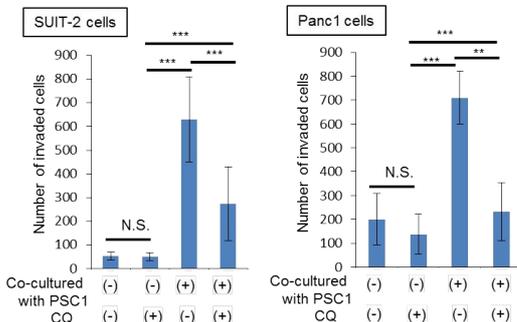
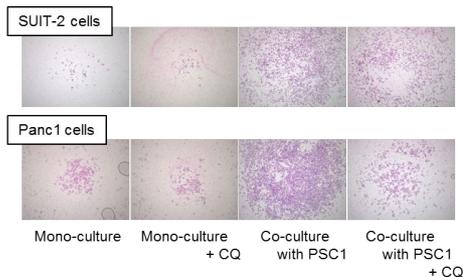
織化学染色を行った。活性化膵星細胞のマーカーとして SMA, オートファジーのマーカーとして LC3, 核染色に DAPI を用いた。SMA 陽性の活性化膵星細胞の一部が LC3 陽性であり(下図) 膵癌組織の活性化膵星細胞の中



膵癌切除切片の蛍光免疫染色。矢頭はオートファジーが亢進した膵星細胞。(Gastroenterology 2017, Endo et al.より一部改変。)

に、オートファジーが亢進した細胞が存在することが示唆され、全国学会および英文雑誌で報告した。

(2) ヒト膵癌切除切片から樹立した3種類の膵星細胞を用いて、間接共培養した膵癌細胞株(SUIT-2, Panc1, AsPC-1)の浸潤能および遊走能の変化を評価した。さらに、オートファジー抑制剤であるクロロキンをを用いて、その変化を評価した。膵星細胞との間接共培養によって、膵癌細胞株の浸潤能および遊走能は有意に亢進し、クロロキン添加によってこの亢進は有意に減弱した。膵癌細胞株単独での浸潤能・遊走能にはクロロキン添加は有意な変化を示さず、クロロキンが膵星細胞のオートファジー抑制を介して、膵癌細胞株の浸潤能・遊走能を抑制した可能性が示唆された(下図)。

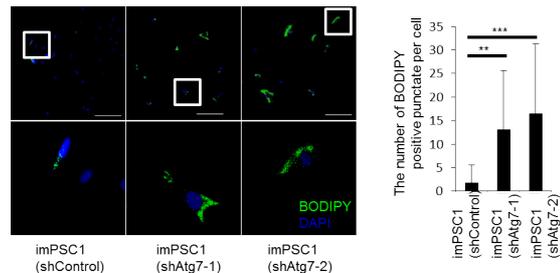


膵星細胞(PSC)との共培養で亢進した膵癌細胞(SUIT-2, Panc1)の浸潤能は、オートファジー抑制剤のクロロキン(CQ)によって減弱した。(Gastroenterology 2017, Endo et al.より一部改変。)

さらに、siRNA を用いてオートファジー必須遺伝子である Atg5 もしくは Atg7 を膵星細胞

において抑制し、膵星細胞のオートファジーを抑制した。膵星細胞におけるオートファジー抑制は、間接共培養した膵癌細胞株の浸潤能・遊走能を低下させた。また、hTERT および SV40LargeT をレンチウイルスで導入して不死化した膵星細胞に、Atg7 を標的とした shRNA を導入したところ、不死化膵星細胞のオートファジーは抑制された。このオートファジーを抑制した不死化膵星細胞と間接共培養した膵癌細胞株は、コントロールの不死化膵星細胞との間接共培養と比較して、浸潤能および遊走能が亢進していた。これらの結果から、膵星細胞のオートファジーが、癌間質相互作用を介して膵癌細胞の浸潤能・遊走能を亢進させている可能性が示唆され、全国学会および英文雑誌に報告した。

(3) Atg7 を標的とした2種類の shRNA によってオートファジーを抑制した不死化した膵星細胞とコントロールの不死化膵星細胞の mRNA を比較した。不死化膵星細胞は3種類の異なる患者由来のものを用いた。オートファジー抑制によって共通の変化を示したのは、平滑筋アクチン、型コラーゲン、フィブロネクチン、インターロイキン6であった。これらのタンパクレベルでの低下を western blotting もしくは ELISA assay によって確認した。平滑筋アクチンの低下から膵星細胞の活性化低下が示唆されたため、細胞質内の脂肪滴を bodipy 染色によって評価した。オートファジー抑制によって細胞内脂肪滴数は増加し、膵星細胞の活性化低下をさらに示唆する結果であった(下図)。さらに、膵星細胞のオートファジー抑制によって低下した、間接共培養下の膵癌細胞株の浸潤能

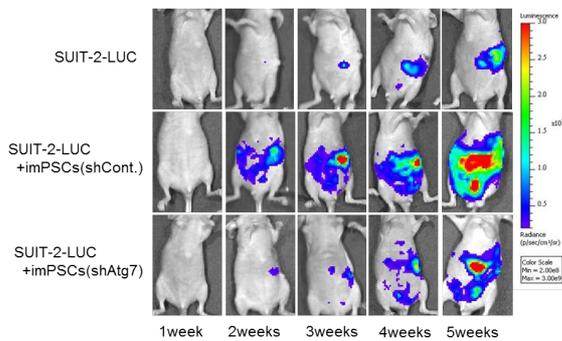


オートファジー必須遺伝子Atg7のshRNAによる抑制は、膵星細胞の細胞内脂肪滴数を増加させ、膵星細胞が活性化されたことが示唆された。(Gastroenterology 2017, Endo et al.より一部改変。)

は、インターロイキン6添加によって回復した。これは膵星細胞のオートファジーがインターロイキン6分泌を介して、膵癌細胞株の浸潤能を亢進させていることを示唆した。これらの結果は、国内外の学会、英文雑誌で報告した。

(4) ルシフェラーゼを発現した膵癌細胞株をマウス膵に移植し、IVIS imaging system を用いて、膵癌細胞の成長を継続的に評価した。膵星細胞のオートファジーが in vivo での膵癌細胞の増殖や浸潤・転移に与える影響を検討する為に、ルシフェラーゼ発現膵癌細胞株単独移植群、コントロールの不死化膵星細胞の共移植群、オートファジーを抑制した不死化膵星細胞の共移植群、の3群で

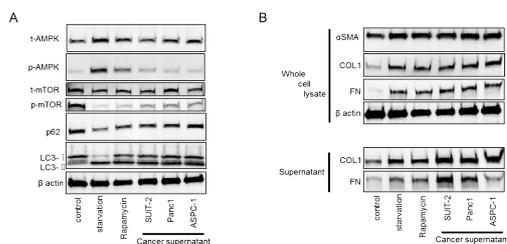
比較検討を行った。膵星細胞の共移植によって、膵癌細胞の成長や肝転移、腹膜播種は有意に亢進し、膵星細胞におけるオートファジーの抑制はこの効果を有意に減弱した(下図)。この結果は、膵星細胞のオートファジー



ルシフェラーゼ発現膵癌細胞(SUIT-2-LUC)をマウスに同所移植してIVIS imaging systemによって随時的な評価を行った。オートファジー必須遺伝子Atg7をshRNAによって抑制した膵星細胞(imPSCs(shAtg7))を共移植したマウスの腫瘍成長は、コントロールの膵星細胞(imPSCs(shCont))を共移植したマウスと比較して、有意に低下した。(Gastroenterology 2017, Endo et alより引用。)

ーが in vivo での膵癌細胞の成長、転移を促進していることを示唆しており、全国学会および英文雑誌に報告した。

(5) ヒト胎児膵由来の膵星細胞(HPaStcC細胞)を用いて、正常膵星細胞のオートファジー誘導が、膵星細胞に与える影響を検討した。一般的なオートファジー誘導である飢餓条件やラパマイシン添加だけでなく、膵癌培養上清添加によっても、正常膵星細胞のオートファジーが亢進することを、western blotによるLC3- の上昇とp62の低下から示した。さらに、このオートファジー亢進にはリン酸化 AMPK の上昇とリン酸化 mTOR の低下を伴っていることも発見し、AMPK-mTOR 経路の関与が示唆された。さらに、これらのオートファジー誘導によって、平滑筋アクチン、型コラーゲン、フィブロネクチンは上昇していた(下図)。細胞質内の脂肪滴を bodipy 染色



正常膵星細胞(HPaStcC細胞)のウェスタンブロット。飢餓条件培養やラパマイシン添加、癌上清添加によって、オートファジーが亢進した(A)。またαSMA上昇から膵星細胞の活性化が示唆され、細胞外基質(COL1, FN)の産生・分泌も亢進した(B)。(Gastroenterology 2017, Endo et alより一部改変。)

によって評価したところ、オートファジー誘導によって細胞内脂肪滴数は減少し、膵星細胞の活性化をさらに示唆する結果であった。これらの結果から、膵星細胞のオートファジーは、膵星細胞の活性化に必要であることが示唆され、国内外の学会、英文雑誌で報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Okumura T, Ohuchida K, Sada M, Abe T,

Endo S, Koikawa K, Iwamoto C, Miura D, Mizuuchi Y, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M. Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells, *Oncotarget*, 8(11)18280-18295, 2017, doi:10.18632/oncotarget.15430. 査読有

Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Mizuuchi Y, Iwamoto C, Murata M, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Autophagy is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice., *Gastroenterology*, 152(6)1492-1506, 2017, doi:10.1053/j.gastro.2017.01.010, 査読有

Abe T, Ohuchida K, Koikawa K, Endo S, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Cancer-associated peritoneal mesothelial cells lead the formation of pancreatic cancer peritoneal dissemination., *Int J Oncol*, 50(2) 457-467, 2017,

doi:10.3892/ijo.2016.3829. 査読有

Abe T, Ohuchida K, Endo S, Ookubo F, Mori Y, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Oda Y, Nakamura M, Clinical importance of intraoperative peritoneal cytology in patients with pancreatic cancer,

Surgery, 161(4)951-958, doi: 10.1016/j.surg.2016.10.035. 査読有

Ohtsuka T, Mori Y, Ishigami K, Fujimoto T, Miyasaka Y, Nakata K, Ohuchida K, Nagai E, Oda Y, Shimizu S, Nakamura M, Clinical significance of circumportal pancreas, a rare congenital anomaly, in pancreatectomy., *Am J Surg.*, S0002-9610(16)30861-3, doi: 10.1016/j.amjsurg.2016.11.018. 査読有

大内田研宙、大塚隆生、橋爪誠、中村雅史、膵癌の浸潤・転移における癌微小環境の新たな役割, *胆と膵*, 36(10), 2015, 1181-1187, 査読無

[学会発表](計13件)

Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Ando Y,

Kibe S, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Mizuuchi Y, Moriyama T, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Autophagy Drives Pancreatic Stellate Cells Activation and Promotes Pancreatic Cancer, 47th Annual Meeting of the American Pancreatic Association, 2016.10.26., Boston(America)

Abe T, Ohuchida K, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Sada M, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M, Talin1 promotes tumor invasion in pancreatic cancer, The 20th meeting of the International conference of Pancreatology, 2016.8.6., 仙台市

宮坂義浩, 大塚隆生, 森泰寿, 仲田興平, 大内田研宙, 永井英司, 中村雅史, 膵癌再発に対する外科的切除は予後を改善するか?, 第71回日本消化器外科学会総会, 2016.7.16., アステイ徳島(徳島市)

遠藤翔, 他, 膵星細胞におけるオートファジーは, 膵癌の成長と転移を促進する, 第71回日本消化器外科学会総会, 2016.7.15., アステイ徳島(徳島市)

阿部俊也, 大内田研宙, 森泰寿, 仲田興平, 宮坂義浩, 大塚隆生, 植木隆, 永井英司, 小田義直, 中村雅史, 膵癌切除症例における術中腹腔洗浄細胞診の意義, 第71回日本消化器外科学会総会, 2016.7.14., アステイ徳島(徳島市)

遠藤翔, 他, サリノマイシンは膵癌細胞のオートファジーを亢進させ, 癌細胞増殖を抑制する, 第107回日本消化器病学会九州支部例会, 2016.6.24 ホテルグランデはがくれ(佐賀市)

中山宏道, 大内田研宙, 遠藤翔, 武居晋, 阿部俊也, 肥川和寛, 巖子龍, 奥村隆志, 森山大樹, 仲田興平, 宮坂義浩, 真鍋達也, 大塚隆生, 永井英司, 水元一博, 中村雅史, 膵癌自然発生マウスモデル KPCL の検討, 第107回日本消化器病学会九州支部例会, 2016.6.24, ホテルグランデはがくれ(佐賀市)

佐田政史, 大内田研宙, 阿部俊也, 遠藤翔, 肥川和寛, 奥村隆志, 千々岩芳朗, 吉田真樹, 堀岡宏平, 宮坂義浩, 大塚隆生, 植木隆, 永井英司, 水元一博, 小田義直, 中村雅史, 低酸素下膵星細胞による癌間質マトリックス・リモデリングは膵癌浸潤能を増強する, 第116回日本外科学会定期学術集会, 2016.4.16, 大阪国際会議場(大阪市)

堀岡宏平, 大内田研宙, 佐田政史, 鄭彪, 千々岩芳朗, 吉田真樹, 奥村隆志, 遠藤翔, 阿部俊也, 肥川和寛, 大塚隆生, 植木隆, 永井英司, 水元一博, 小田義直,

中村雅史, 膵癌における CD51 発現は予後と相関する, 第116回日本外科学会定期学術集会, 2016.4.16, 大阪国際会議場(大阪市)

遠藤翔, 仲田興平, 佐田政史, 大内田研宙, 阿部俊也, 肥川和寛, 奥村隆志, 佐田政史, 堀岡宏平, 水内祐介, 大塚隆生, 植木隆, 永井英司, 水元一博, 小田義直, 中村雅史, 膵癌の癌関連線維芽細胞におけるオートファジーの役割, 第116回日本外科学会定期学術集会, 2016.4.16, 大阪国際会議場(大阪市)

Abe T, Ohuchida K, Nakamura M, Comparison of surgical outcome of Radical antegrade modular pancreatectomy with standard retrograde pancreatectomy and evaluation of the prognostic factors in left side pancreatic cancer, American Pancreatic Association 46th Annual Meeting, 2015.11.5, San Diego(America)

Koikawa K, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Horioka K, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Ohuchida R, Ueki T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M, Pancreatic Stellate Cells Lead and Promote the Local Invasion of Cancer Cells, by Physically Remodeling the Extracellular Matrix with Collagen Fiber Alignment in Pancreatic Cancer, American Pancreatic Association 46th Annual Meeting, 2015.11.5, San Diego(America)

遠藤翔, 仲田興平, 大内田研宙, 阿部俊也, 肥川和寛, 堀岡宏平, 水内祐介, 小田義直, 水元一博, 田中雅夫, オートファジーが膵癌の癌間質相互作用に与える影響の検討, 第46回日本膵臓学会大会, 2015.6.20, 名古屋国際会議場(名古屋市)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 大樹 (EGUCHI Daiki)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号: 90726390

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()