

令和元年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10572

研究課題名(和文) 肝胆膵領域癌の低酸素環境下における癌間質をターゲットとした新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of novel treatment for hepato-biliary-pancreatic cancer with target of cancer stroma

研究代表者

野田 剛広 (Noda, Takehiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50528594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌細胞株の低酸素培養においてPLOD2の発現の増加を認めた。GEM投与によりPLOD2の発現を認め、GEM耐性株ではPLOD2発現の上昇を認めた。耐性株は紡錘状変化を認め、E-cadherinの発現低下、N-cadherinの発現亢進を認めた。PLOD2の発現抑制により、化学療法耐性の改善、E-cadherinの発現の回復、N-cadherinの発現の減弱を認めた。胆道癌におけるPLOD2強陽性群は、リンパ節転移が高頻度であり進行病期の症例が多かった。PLOD2高発現群における無再発生存率は、低発現群と比較して有意に低率であった。全生存期間に関してPLOD2発現は独立予後不良因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝胆膵領域癌のうち、胆道癌はその発生頻度および悪性度から難治癌の一つであり、世界的にも研究が進んでいないのが現状である。またその生命予後は、化学療法や周術期管理法が進歩した現在においても決して満足のものではない。本研究により胆道癌における化学療法耐性機序の一端が解明され、低酸素誘導遺伝子PLOD2が新規の予後因子が同定された。さらに化学療法耐性機序として、低酸素刺激による上皮間葉移行によるメカニズムが関与していることが示された。遠隔転移を有する胆道癌において化学療法耐性が最重要課題であり、今後は上記メカニズムに対する治療法の開発が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of biliary tract cancer is unfavorable due to its chemoresistance. Hypoxia triggers epithelial-to-mesenchymal transition, which is related to drug resistance. In this study, we focused on the functional roles of procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2), a hypoxia-induced gene, and assessed the clinical significance of PLOD2. The expression of PLOD2 was induced by hypoxia in vitro and was upregulated in GEM-resistant cell lines, which had low expression of epithelial markers and high expression of mesenchymal markers. Downregulation of PLOD2 by siRNA resulted in improved chemoresistance, recovery of E-cadherin, and reduction of N-cadherin. In the resected samples, PLOD2 expression was significantly correlated with lymph node metastasis and stage. Recurrence-free survival and overall survival rates were significantly lower in patients with high expression of PLOD2. PLOD2 expression was an independent prognostic factor for overall survival.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胆道癌 上皮間葉移行 化学療法耐性 低酸素 予後因子 胆管癌

1. 研究開始当初の背景

肝胆膵領域癌には、肝癌、胆道癌、膵癌が含まれ、これらの癌種に対する主な治療法は、外科的手術あるいは抗癌剤による化学療法である。しかしながら、これらの癌種に対する治療成績は不良であり、難治癌とされている。特に膵癌においては、5年生存率は約5%とされ、極めて予後不良な疾患である。また、肝胆道癌に対する主な治療法は、外科的手術あるいは抗癌剤による化学療法であるが、いまだに治療成績は不良であり、難治癌のひとつである。その理由としては、肝胆道癌の転移浸潤機構や化学療法耐性化などの分子生物学的機構がいまだ明らかになっていないことが挙げられる。

酸素は、ヒトを含む生物の生存に欠かすことのできない分子である。がん組織は、正常組織と比較して低酸素環境とされている。低酸素ストレスによって、間質構成細胞である線維芽細胞は、様々なサイトカインや成長因子を産生し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの再構築を介して、癌細胞の上皮間葉移行(EMT; epithelial-mesenchymal transition)を促進させ、癌細胞の転移促進に密接に関与しているとされている (Gilkes DM, Nat Rev Cancer 2014)。しかしながら、癌細胞と線維芽細胞間のクロストークの仕組みは、いまだ解明されておらず、癌間質再構築メカニズムも依然として不明である。

我々は、網羅的遺伝子発現解析により、がん細胞における低酸素誘導遺伝子の解析を行い、様々な癌種の予後マーカーを同定してきた(Noda T, et al. Liver Int 2012)。その中でも procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2) は、HIF - 1シグナルの下流に位置し、肝癌における予後マーカーであることを報告してきた。PLOD2 本来の役割は、コラーゲン産生に関与しており、癌間質のリモデリングに関与しているとされている。また近年、癌の転移機構や化学療法耐性機構として、癌細胞が上皮系から間葉系に形質転換を起こす上皮間葉移行(EMT; epithelial-mesenchymal transition)が関与していることが明らかになりつつある。EMT により、癌細胞が遊走能・浸潤能を獲得することで、原発巣からの遊離、循環系への侵入、他臓器への生着が成立することが知られている。肝胆道癌における、癌細胞の転移浸潤メカニズムや化学療法耐性メカニズムとして、低酸素ストレスによる Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)/PLOD2 のシグナル経路により、EMT が誘導される可能性は高いと推測される。このような、肝胆道癌における癌の転移浸潤メカニズムや化学療法耐性の新たなシグナル伝達経路を同定・解明することにより、肝胆道癌における新規治療ターゲットの同定が可能となり、非常に有用な研究になるとと思われる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低酸素ストレス下において惹起される低酸素誘導遺伝子 PLOD2 の肝胆道癌における転移浸潤機構や化学療法耐性機構における EMT の役割を解明し、予後マーカーとなりうるかどうかを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 細胞株と試薬・抗体

ヒト胆道癌細胞株(TFK-1, NOZ, CCLP-1)を使用した。通常酸素培養は、5%のCO₂条件下、低酸素培養は、0.1%のO₂, 5%のCO₂, 94%のN₂の条件下にて培養を行った。免疫組織化学染色および蛋白電気泳動に、マウスモノクローナル抗ヒト PLOD2 抗体、ウサギポリクローナル抗ヒト PLOD2 抗体、ウサギポリクローナル抗ヒト beta-actin を使用した。

(2) RNA 抽出と cDNA 合成、リアルタイム PCR

回収した細胞株より、総 RNA を抽出した。総 RNA より AVM reverse transcriptase のプロトコールに従い、cDNA を合成した。qRT-PCR はライトサイクラーを用いて測定した。

(3) ウェスタンブロット

ポリアクリルアミドゲルを使用し、細胞から回収した蛋白質を電気泳動した。蛋白を polyvinylidene difluoride 膜に転写した。膜に抗 PLOD2 抗体、抗 beta-actin 抗体を反応させた。

(4) siRNA の遺伝子導入

PLOD2 の siRNA を使用し、scrambled siRNA を陰性コントロールとして使用した。RNAiMAX は、プロトコールに従い使用した。

(5) GEM による growth inhibition assay

各細胞株を各ウェルに 5000cells 播種し、24 時間培養後に各濃度の GEM を含有した培地を使用した。MTT 陽性細胞の比率を算出した。

(6) 免疫組織化学染色:

大阪大学医学部付属病院にて根治切除術を施行した肝外胆管癌 54 例を対象とした。切除検体の使用に関しては、全ての患者よりインフォームドコンセントを行い、文書による同意

を得た。

(7) 統計学的手法

データは、平均値と標準偏差にて表示し、統計学的解析は、Student の t 検定、Fisher の正確検定を使用した。生存曲線は、Kaplan-Meier 法を使用して比較した。予後因子の解析には、Cox の比例ハザードモデルを使用した。P 値が 0.05 以下を統計学的有意差ありとした。統計学的解析は、JMP pro を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 胆道癌細胞株における低酸素培養と PLOD2 発現変化

ヒト胆道癌細胞株 (CCLP-1, TFK-1, NOZ) の低酸素培養により PLOD2 の mRNA 発現は、培養開始後 24 時間で 2.6 倍、72 時間で 5 倍に上昇を認めた。Western blot 法では、PLOD2 の発現は正常酸素培養でも認められたが、低酸素培養によりその発現程度は増加を認めた。また低酸素培養により細胞株は経時的に紡錘状変化を認めた (図 1 A-B)

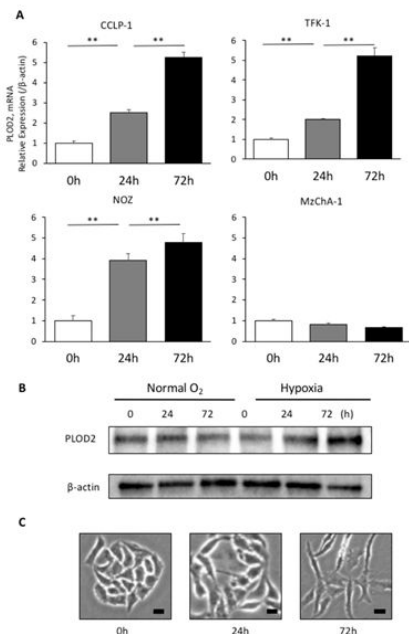


図1 低酸素培養によるPLOD2発現変化と形態変化 (a) mRNA変化 (b) 蛋白発現変化 (c) CCLP-1株の形態変化

(2) Gemcitabine 耐性株における PLOD2 の発現および siRNA 法による PLOD2 発現抑制と化学療法耐性の改善

胆道癌に対する主要な抗癌剤である Gemcitabine (GEM) の長期暴露により樹立した GEM 耐性株 (GR) における PLOD2 の発現は、親株 (Pt) と比較して、TFK-1, NOZ, CCLP-1 のいずれにおいても 2.5 倍から 12 倍に増加を認めた。siRNA 法により PLOD2 の発現は親株と同等レベルまで抑制を認めた。siRNA 法による PLOD2 の発現抑制により、TFK-1, NOZ, CCLP-1 のいずれの細胞株において、GEM への感受性は改善を認めた (図 2A-D)。

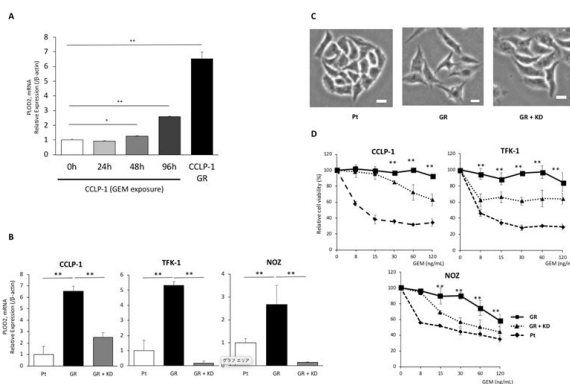


図2 PLOD2発現と化学療法耐性 (a) GEM投与による経時的変化および耐性株における発現 (b) siRNAによるPLOD2発現抑制 (c) PLOD2発現抑制による形態変化 (d) PLOD2発現抑制による化学療法耐性の改善

(3) GEM 耐性株における EMT マーカーの発現および PLOD2 発現抑制による変化

GEM 耐性株 (GR) において、親株と比較して上皮系マーカーの E-cadherin の発現低下、間葉系マーカーの N-cadherin の発現亢進を認めましたが、PLOD2 の発現抑制により、CDH1 の発現の回復、CDH2、Vimentin、SNA11 の発

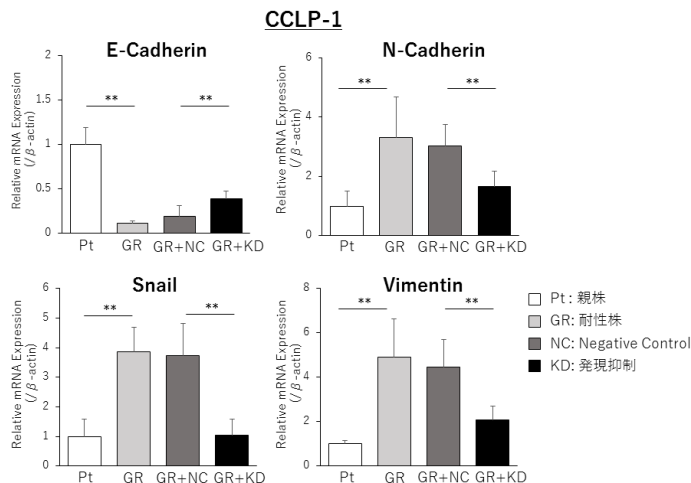


図3 PLOD2発現抑制と上皮間葉移行マーカーの発現変化

現の減弱を認めた(図3)。

(4) 胆道癌における PLOD2 発現の意義

胆道癌切除検体における免疫組織化学染色の結果、主に細胞質に発現が認められ、染色強度により陰性(n=26)、弱陽性(n=7)、強陽性(n=19)の3段階に分類された。強陽性を PLOD2 強陽性群、陰性と弱陽性を PLOD2 弱発現群の2群に分類した。PLOD2 弱発現群と強発現群の2群間において、臨床病理学的因子の比較を行ったが、年齢、性別、腫瘍の局在、腫瘍径、pT 因子、pM 因子、組織型、手術における根治度、補助化学療法の有無に有意差を認めなかったが、pN 因子、pStage では、強陽性群においてリンパ節転移の陽性例(p=0.037)および pStage が進行した症例(p=0.001)が有意に高頻度であった。Kaplan-meyer 法による、胆道癌切除例における PLOD2 の発現程度別の無再発生存および全生存解析では、いずれにおいても強発現例において有意に予後不良であった(p=0.0012, p<0.0001)。全生存における Cox の比例ハザードモデルにおける単変量解析では、pN 因子、pM 因子、PLOD2 の発現が有意な因子として同定され、さらに多変量解析では、PLOD2 が独立した予後不良因子であった(Hazard ratio:2.481, 95%信頼区間: 1.164 - 5.178, p=0.019)(図4)。

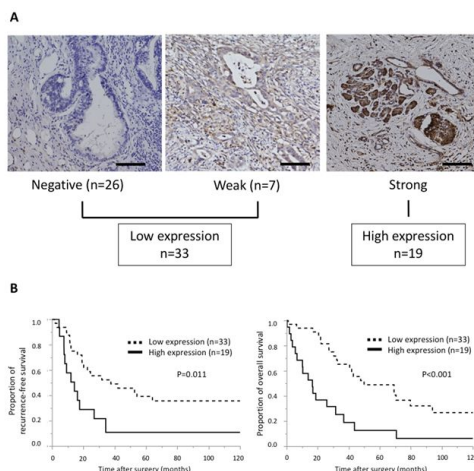


図4 胆道癌における PLOD2 発現と予後 (a) 免疫組織化学染色結果 (b) PLOD2 発現による無再発生存および全生存

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- Okumura Y, Noda T, Eguchi H, Sakamoto T, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Kobayashi S, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Hypoxia-Induced PLOD2 is a Key Regulator in Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Biliary Tract Cancer. *Ann Surg Oncol*. 査読有, 2018 25(12) 3728-3737.
- Toshiyama R, Konno M, Eguchi H, Takemoto H, Noda T, Asai A, Koseki J, Haraguchi N, Ueda Y, Matsushita K, Asukai K, Ohashi T, Iwagami Y, Yamada D, Sakai D, Asaoka T, Kudo T, Kawamoto K, Gotoh K, Kobayashi S, Satoh T, Doki Y, Nishiyama N, Mori M, Ishii H. Poly(ethylene glycol)-poly(lysine) block copolymer-ubenimex conjugate targets aminopeptidase N and exerts an antitumor effect in hepatocellular carcinoma stem cells. *Oncogene*. 査読有 2018 38(2) 244-260
- Shinke G, Noda T, Eguchi H, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Kawamoto K, Gotoh K, Kobayashi S, Takeda Y, Tanemura M, Mizushima T, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Surgical outcome of extended liver resections for colorectal liver metastasis compared with standard liver resections. *Mol Clin Oncol*. 査読有 2018 9(1) 104-111
- Noda T, Eguchi H, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Gotoh K, Kawamoto K, Kobayashi S, Hashimoto Y, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Minimally invasive liver resection for hepatocellular carcinoma of patients with liver damage B: A propensity score-based analysis. *Hepatol Res*. 査読有 2018 48(7) 539-548
- Okumura Y, Noda T, Eguchi H, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Kawamoto K, Gotoh K, Kobayashi S, Umeshita K, Hashimoto Y, Takeda Y, Tanemura M, Shigekawa M, Morii E, Takehara T, Mori M, Doki Y. Middle segment pancreatectomy for a solid serous cystadenoma diagnosed by MRCP and review of the literature: A case report. *Mol Clin Oncol*. 査読有 2018 8(5) 675-682.
- Noda T, Eguchi H, Wada H, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Gotoh K, Kawamoto K,

Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Short-term surgical outcomes of minimally invasive repeat hepatectomy for recurrent liver cancer. Surg Endosc. 査読有 2018 32(1) 46-52.

7. Okumura Y, Noda T, Eguchi H, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Marubashi S, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Short- and Long-term Outcomes of De Novo Liver Transplant Patients Treated With Once-Daily Prolonged-Release Tacrolimus. Transplant Direct. 査読有 2017 3(9) e207.

8. Toshiyama R, Noda T, Eguchi H, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Morii E, Umeshita K, Mori M, Doki Y. Two cases of resectable pancreatic cancer diagnosed by open surgical biopsy after endoscopic ultrasound fine-needle aspiration failed to yield diagnosis: case reports. Surg Case Rep. 査読有 2017 3(1) 39.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 奥村雄一郎, 野田剛広, 江口英利, 岩上佳史, 山田大作, 秋田裕史, 浅岡忠史, 後藤邦仁, 小林省吾, 土岐祐一郎, 森正樹 低酸素誘導遺伝子 PLOD2 の胆道癌における悪性度および臨床病理学的因子との関連に関する検討 第 73 回日本消化器外科学会総会 2018
2. 奥村雄一郎, 野田剛広, 江口英利, 阪本卓也, 岩上佳史, 山田大作, 浅岡忠史, 和田浩志, 川本弘一, 後藤邦仁, 梅下浩司, 土岐祐一郎, 森正樹 低酸素誘導遺伝子 PLOD2 の胆道癌における発現と臨床病理学的因子の検討 第 26 回 日本がん転移学会学術集会・総会 2017
3. 奥村雄一, 野田剛広, 江口英利, 阪本卓也, 岩上佳史, 山田大作, 浅岡忠史, 和田浩志, 川本弘一, 後藤邦仁, 梅下浩司, 森正樹, 土岐祐一郎 胆道癌における PLOD2 の発現と EMT を介した化学療法耐性の検討 第 117 回 日本外科学会定期学術集会 2017
4. Okumura Y, Noda T, Eguchi H, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Kobayashi S, Doki Y, Mori M. PLOD2 induced under hypoxia is involved in resistance to gemcitabine and poor prognosis in biliary tract cancer AASLD 2017

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：和田 浩志

ローマ字氏名：Wada Hiroshi

所属研究機関名：地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）

部局名：その他部局等

職名：消化器外科 副部長

研究者番号（8桁）：00572554

研究分担者氏名：後藤 邦仁

ローマ字氏名：Gotoh Kunihito

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：10362716

研究分担者氏名：阪本 卓也

ローマ字氏名：Sakamoto Takuya

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部附属病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：40645074

研究分担者氏名：江口 英利

ローマ字氏名：Eguchi Hidetoshi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90542118

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。