

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10603

研究課題名(和文)膵臓癌の新規治療法開発を目的としたTrkB/BDNF経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of TrkB/BDNF signaling for development of a new therapeutic strategy for pancreatic cancer

研究代表者

梁井 公輔 (Yanai, Kosuke)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10621055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TrkBの発現抑制あるいはTrkBのチロシンキナーゼ阻害により、膵癌細胞株の増殖能および浸潤能が有意に低下することが分かった。一方、BDNF抑制では、増殖には影響を及ぼさなかったが、浸潤は有意に低下した。さらに、BDNFを添加したTrkB/BDNFシグナルの刺激系では、増殖には影響が認められなかったが、浸潤は有意に亢進した。これら結果は、TrkB/BDNFシグナルが膵癌の新規治療標的となり得ることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌に対するTrkB/BDNFシグナル解析を基礎として、固形癌に対する包括的な治療法開発を見据え、胆嚢癌および浸潤性胸腺癌においてもTrkB/BDNFシグナルの生物学的意義の解析を行った。その結果、TrkB/BDNFシグナルが胆嚢癌では新規治療標的分子であり予後予測バイオマーカーとなり得ること、また、浸潤性胸腺癌では新規治療標的分子および、診断のバイオマーカーとなり得ることを見出した。これら結果は、TrkB/BDNFシグナルが、固形癌に対する包括的な治療標的分子、バイオマーカーとなることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We have shown that proliferation and invasiveness in pancreatic cancer cells decreased significantly by the inhibition of TrkB expression or TrkB tyrosine kinase. Although there was no significant change in proliferation by BDNF inhibition, invasiveness decreased significantly by BDNF inhibition in pancreatic cancer cells. These results suggest that TrkB/BDNF signaling could be a new therapeutic target for pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：TrkB BDNF 膵癌 悪性形質誘導 治療法開発 増殖能 浸潤能 治療標的分子

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

1. 研究開始当初の背景

癌における Tropomyosin-related kinase B (TrkB)発現増強が、神経芽細胞腫 (Nakagawara A et al. Mol Cell Biol 14:759,1994)、肺癌、肝癌 (Yang ZF et al. Cancer Res 65:219,2005)、胆嚢癌(論文作成中)および前立腺癌(Montano X et al. FEBS Lett 30: 571-573, 2004)で確認され、予後不良因子としての可能性が報告されている。また、癌において TrkB の ligand である Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)が産生され、autocrine の系で TrkB/BDNF 経路が活性化している可能性が示唆されている。現在まで TrkB の高発現が報告された癌腫は、神経内分泌腫瘍との関連を有する癌腫が含まれている。一方、癌細胞における TrkB の機能に関しては、アポトーシス抵抗性 (Thomas R et al. Cancer Res 65:7033,2005)や転移能 (Smit MA et al. Mol Cell Biol 29:3722,2009) への関与を示唆する報告が増加しつつある。さらに、我々のこれまでの研究において悪性度の高い肺癌組織における BDNF 発現と TrkB 発現は正の相関を示すことが分かった。これらを総合すると、膵癌における TrkB をはじめとした neurotrophin(NT)ファミリーを標的とした治療法開発の実現性は高いと考えられる。

2. 研究の目的

我々は、研究を通じて、TrkB/BDNF 経路が予後不良である肺神経内分泌腫瘍の新規治療標的となる可能性を示唆する結果を得た (Odate S et al, Lung cancer, 2013, Onishi H et al, Anticancer Res, 2013)。本研究の目的は、膵癌に対する新規治療法を開発するために、「TrkB/BDNF 経路が、膵癌に対する 1) 診断補助因子、2) 予後予測因子、および 3) 治療標的分子となり得るかを検証する」ことである。

3. 研究の方法

(1) TrkB/BDNF 経路の治療標的としての特異性と安全性を再確認するために、手術時摘出組織 (膵癌および正常膵組織各 100 症例) における TrkB/BDNF 経路関連分子 (TrkA, TrkB, TrkC, NGF, BDNF) 発現を免疫組織染色、RT-PCR 法、Western blot 法および In situ hybridization 法で詳細に解析し、各種組織における TrkB/BDNF 経路関連分子発現プロファイルを作成する。

(2)TrkB/BDNF 経路関連分子の発癌予防標的経路としての可能性を探るために、Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN)および pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)における TrkB/BDNF 経路関連分子発現プロファイルを作成する。

(3)膵癌細胞株 (ASPC-1 および SUII-2) を標的細胞とし、TrkB/BDNF 経路抑制 (TrkB 阻害剤 : K252a、あるいは siRNA による TrkB および BDNF 発現を抑制) が、細胞増殖、細胞浸潤 (Matrigel invasion assay) 薬剤抵抗性に及ぼす影響を解析する。同様に、TrkB 陰性膵癌細胞株を用いて、TrkB 強制発現 (TrkB 遺伝子導入) が細胞機能に及ぼす影響を解析する。

(4)細胞周期や浸潤に関与するシグナル系の活性化剤、抑制剤の TrkB/BDNF 経路関連分子発現に及ぼす影響を real time RT-PCR 法および DNA アレイにより網羅的に解析し、TrkB/BDNF 経路関連分子発現制御経路を検索する。

(5)膵癌細胞を免疫不全マウスに移植する系を用いて、シグナル阻害剤、siRNA による抗腫瘍効果を確認する。

4. 研究成果

(1)膵癌細胞株 ASPC-1、SUII-2、Panc-1 を標的細胞とした。これら 3 細胞株において、TrkB、BDNF が発現しており、TrkB/BDNF シグナルが活性化していることを western blot 法で確認した。

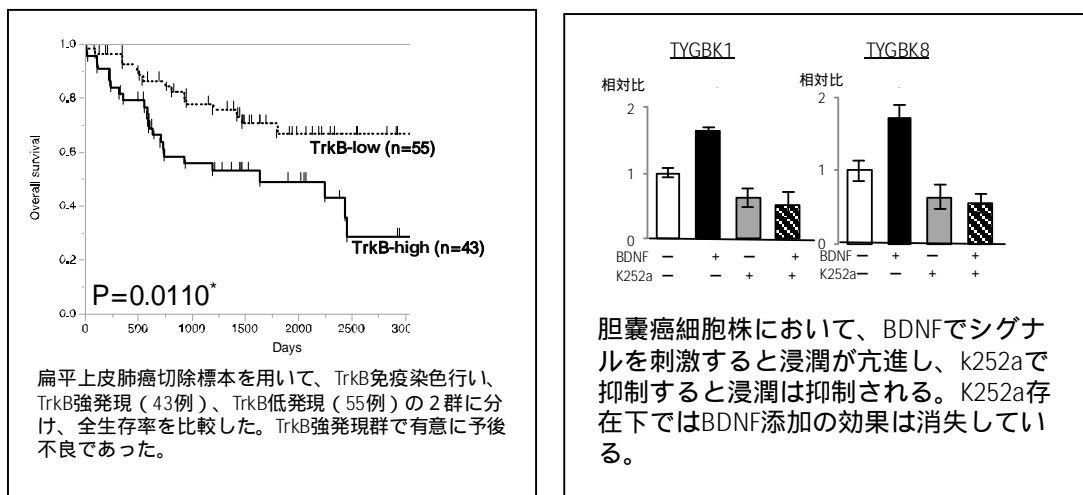
(2)まず増殖能について評価した。TrkB siRNA を導入して TrkB を抑制すると、3 細胞株共に増殖は有意に抑制された。しかし、TrkB のチロシンキナーゼ阻害剤である k252a を添加しても増殖に影響は認められなかった。また、BDNF を添加して TrkB/BDNF シグナルを刺激しても、増殖には影響が認められなかった。現在、免疫不全マウスに皮下移植するモデルを用いて TrkB 抑制による治療実験を施行中である (論文作成中)。

(3)次に浸潤能を評価した。TrkB siRNA を導入して TrkB を抑制すると、3 細胞株共に浸潤は有意に抑制された。K252a を添加すると、増殖とは異なり、濃度依存性に浸潤能は低下した。しかし、BDNF を添加して TrkB シグナルを刺激しても、増殖には影響が認められなかった。浸潤能に関与するメカニズムを endothelial mesenchymal transition や metalloproteinase 発現の観点から、western blot 法で解析を行っているところである (論文作成中)。

(4)肺扁平上皮癌における TrkB/BDNF 経路の生物学的意義を解析する研究において、TrkB/BDNF 経路が肺扁平上皮癌の増殖、浸潤に関与しており、新規治療標的となるという結果が、本研究の副次的な結果として得られた (業績 6)。下図左は、扁平上皮肺癌切除標本を用

いて、TrkB 免疫染色行い、TrkB 強発現 (43 例)、TrkB 低発現 (55 例) の 2 群に分け、全生存率を比較した結果である。

(5) 胆嚢癌における TrkB/BDNF 経路の生物学的意義を解析する研究において、TrkB/BDNF 経路が胆嚢癌の増殖、浸潤、腫瘍形成に関与しており、新規治療標的となるという結果が、本研究の副次的な結果として得られた(業績7)。下図右は、BDNF でシグナルを刺激、あるいは k252a でシグナルを抑制したときの浸潤能を胆嚢癌細胞株を用いて評価した結果である。



(6) 浸潤性胸腺癌および胸腺腫を用いて、TrkB/BDNF 経路の生物学的意義を解析する研究において、TrkB/BDNF 経路が浸潤性胸腺癌において診断や予後予測のバイオマーカーとなり得ること、また TrkB/BDNF 経路が浸潤性胸腺癌の新規治療標的分子となり得ることを新たに見出した(論文投稿中)

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 7 件)

Onishi H, Yamasaki A, Nakamura K, Ichimiya S, Yanai K, Umebayashi M, Nagai S, Morisaki T. Liprin- α 4 as a new therapeutic target for SCLC as an upstream mediator of HIF1 α . *Anticancer Res* 査読有, 39(3), 2019 1179-1184. DOI: 10.21873/anticancer.13227

Onishi H, Ichimiya S, Yanai K, Umebayashi M, Nakamura K, Yamasaki A, Imaizumi A, Nagai S, Murahashi M, Ogata H, Morisaki T. RBPJ and MAML3: Potential therapeutic targets for small cell lung cancer. *Anticancer Res* 査読有, 38(8), 2018, 4543-4547. DOI: 10.21873/anticancer.12758

Kawamoto M, Umebayashi M, Tanaka H, Koya N, Nakagawa S, Kawabe K, Onishi H, Nakamura M, Morisaki T: Combined gemcitabine and metronidazole is a promising therapeutic strategy for cancer stem-like cholangiocarcinoma. *Anticancer Res*. 査読有, 38(5), 2018, 2739-2748. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29715094>

Kawamoto M, Ozono K, Oyama Y, Yamasaki A, Oda Y, Onishi H. The novel selective pan-TRK inhibitor ONO-7579 exhibits antitumor efficacy against human gallbladder cancer in vitro. *Anticancer Res*. 査読有, 38(4), 2018, 1979-1986. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29599313>

Onishi H, Nakamura K, Nagai S, Yanai K, Yamasaki A, Kawamoto M, Imaizumi A, Morisaki T. Hedgehog inhibition upregulates TRK expression to antagonize tumor suppression in small cell lung cancer cells. *Anticancer Res*. 査読有, 37 (9), 2017, 4987-4992. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28870922>

Ozono K, Ohishi Y, Onishi H, Nakamura K, Motoshita J, Kato M, Nakanishi Y, Nakamura M, Oda Y. Brain-derived neurotrophic factor / tropomyosin-related kinase B signaling pathway contributes to the aggressive behavior of lung squamous cell carcinoma. *Lab Invest*. 査読有, 97(11), 2017, 1332-42. DOI: 10.1038/labinvest.2017.45

Kawamoto M, Onishi H, Ozono K, Yamasaki A, Imaizumi A, Kamakura S, Nakano K, Oda Y, Sumimoto H, Nakamura M. Tropomyosin-related kinase B mediated signaling contributes to the induction of malignant phenotype of gallbladder cancer. *Oncotarget* 査読有, 8(22), 2017, 36211-36224. DOI:10.18632/oncotarget.16063

[学会発表](計 14 件)

中村 勝也、大西 秀哉、尾立 西市、大園 慶吾、梁井 公輔、中村 雅史. 肺癌における神経栄養因子受容体 TrkB の治療標的としての可能性の検討、2018 年 12 月 14 日、第 31 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

中村 勝也、大西 秀哉、尾立 西市、大園 慶吾、梁井 公輔、中村 雅史. TrkB/BDNF signaling pathway could be a therapeutic target for lung cancer. 2018 年 9 月 29 日、第 77 回 日本癌学会学術総会、大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

大西 秀哉、山崎 章生、中村 雅史. RBPJ could be a new therapeutic target for refractory solid neuroendocrine type tumors. 2018 年 9 月 27 日、第 77 回 日本癌学会学術総会、大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

大西 秀哉、大山 康博、川元 真、山崎 章生、中村 雅史. 膵癌、胆嚢癌の治療法開発のための TrkB/BDNF シグナル経路の生物学的機能解析、2018 年 7 月 12 日、第 73 回 日本消化器外科学会総会、かごしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市)

大西 秀哉、中村 勝也、梁井 公輔、川元 真、大山 康博、中山 和典、山崎 章生、三好 圭、中村 雅史. TrkB シグナルと Hedgehog シグナルの負のクロストークを考慮した小細胞肺癌に対する新たな治療法の開発、2018 年 4 月 6 日、第 118 回 日本外科学会定期学術集会、東京国際フォーラム (東京都・千代田区)

川元 真、大西 秀哉、森崎 隆、中村 雅史. 選択的汎 Trk 阻害剤 (ONO-8560570) は胆嚢癌に対し抗腫瘍効果を示すか、2017 年 12 月 2 日、第 21 回バイオ治療法研究会学術集会、福大メディカルホール (福岡県・福岡市)

大西 秀哉、中村 勝也、梁井 公輔、川元 真、藤村 晶子、大山 康弘、中山 和典、山崎 章生、中村 雅史. Hedgehog シグナルと TrkB シグナルとのクロストークの視点に立った小細胞肺癌に対する新規治療法開発、2017 年 11 月 30 日、第 30 回 第 30 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、ホテルグランヴェール岐山 (岐阜県・岐阜市)

尾立 西市、大西 秀哉、中村 勝也、内山 明彦、加藤 雅人、中村 雅史. 肺大細胞神経内分泌細胞癌における TrkB/BDNF シグナル経路の生物学的意義の解析、2017 年 4 月 28 日、第 117 回 日本外科学会定期学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

大山 康博、大西 秀哉、藤村 晶子、川元 真、山崎 章生、中村 雅史. 神経栄養因子受容体 TrkB/脳由来神経栄養因子 BDNF シグナル経路は膵癌の新規治療標的となる、2017 年 4 月 29 日、第 117 回 日本外科学会定期学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

川元 真、大西 秀哉、大山 康博、大園 慶吾、山崎 章生、中村 雅史. 脳由来神経栄養因子 BDNF/神経栄養因子受容体 TrkB/シグナル経路は胆嚢癌の悪性化に関与し新規治療標的となり得る (第 2 報)、2017 年 4 月 28 日、第 117 回 日本外科学会定期学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

M. Kawamoto, H. Onishi, K. Ozono, A. Yamasaki, M. Nakamura. TrkB-mediated signaling contributes to malignant phenotypes of gallbladder cancer. 2017 年 4 月 5 日、AACR2017, Walter E. Washington Convention Center, (USA, Washington DC)

大山 康博、大西 秀哉、今泉 晃、山崎 章生、川元 真、藤村 晶子. 神経栄養因子受容体 TrkB/脳由来神経栄養因子 BDNF シグナル経路の膵臓癌における生物学的意義の解析、2016 年 12 月 1 日、第 29 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、久留米シティプラザ (福岡県・久留米市)

川元 真、大西 秀哉、大山 康博、藤村 晶子、山崎 章生、今泉 晃、中村 雅史. 神経栄養因子受容体 TrkB/脳由来神経栄養因子 BDNF シグナル経路の胆嚢癌における生物学的意義の解析、2016 年 12 月 1 日、第 29 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、久留米シティプラザ (福岡県・久留米市)

M. Kawamoto, H. Onishi, K. Ozono, A. Yamasaki, A. Imaizumi, M. Nakamura.
TrkB/BDNF signaling promotes EMT mediated invasiveness and is a potential therapeutic target for gallbladder cancer. 2016年10月8日、Bella Center Copenhagen, (Denmark, Copenhagen)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院 先端医療医学部門 腫瘍制御学分野

<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：大西 秀哉

ローマ字氏名：(ONISHI, hideya)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学院医学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30553276

研究分担者氏名：中村 勝也

ローマ字氏名：(NAKAMURA, katsuya)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：共同研究員

研究者番号(8桁)：60585743

研究分担者氏名：今泉 晃

ローマ字氏名：(IMAIZUMI akira)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：共同研究員

研究者番号(8桁)：30624051

研究分担者氏名：永井 俊太郎

ローマ字氏名：(NAGAI shuntaro)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：90755240

(2016年7月26日に追加)

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。