

令和元年9月2日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19910

研究課題名(和文)膵癌神経周囲浸潤におけるFbxw7/Notch1/ケモカインによる制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the control mechanism by Fbxw7 / Notch1 / chemokine in perineural invasion of pancreatic cancer

研究代表者

益田 邦洋(Masuda, Kunihiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30569645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌神経浸潤でのFbxw7と基質の蓄積による影響を解明すべく実験を行った。しかし、膵癌病理検体Fbxw7発現低下と病理学的因子の関連はなく、細胞株では基質の蓄積を確認できなかった。上記より、方針の転換を行い、胆道癌におけるFbxw7の発現と臨床病理学的な因子の関連、予後の解析を施行した。胆管癌組織の免疫組織化学でFBXW7低下は予後不良因子であった。NOTCH1とMCL1が胆管癌におけるFBXW7の基質として同定され、FBXW7の発現低下が予後不良因子で、FBXW7の発現を抑制するとNOTCH1やMCL1が蓄積し、胆管癌の悪性を促進する分子メカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌神経浸潤でのFbxw7と基質の蓄積による影響を解明すべく実験を行ったが、膵癌病理検体Fbxw7発現低下と病理学的因子の関連はなく、細胞株では基質の蓄積を確認できなかった。そのため、Fbxw7に変異を有する胆道癌で研究を行った。

胆道癌においてFbxw7の発現低下は臨床病理学的予後が不良であることを初めて確認した。また、それらのメカニズムとしてNotch1とMcl-1の蓄積の関与を明らかにした。

胆道癌においてFbxw7と基質タンパク質の分子メカニズムを明らかにし、それらを標的とする新規治療を確立することは個別化治療へと繋がる研究であり、更なる治療成績向上への第一歩となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I examined to elucidate the influence of Fbxw7 and the substrates accumulation in pancreatic cancer nerve infiltration. However, there was no association between Fbxw7 downregulation and pathological factors in pancreatic cancer pathological specimens. For that reason, I analyzed the relationship between the expression of Fbxw7 and clinicopathological factors in cholangiocarcinoma, which had Fbxw7 mutation. FBXW7 expression was associated with clinicopathological outcomes in cholangiocarcinoma patients. FBXW7 was the most important independent prognostic factor. I also demonstrate that the two FBXW7 substrates, NOTCH1 and MCL1, regulate cholangiocarcinoma progression. FBXW7 modulates the malignant potential of cholangiocarcinoma via independent regulation of NOTCH1 and MCL1.

研究分野：消化器外科学

キーワード：Fbxw7 胆道癌 膵癌

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

1. 研究開始当初の背景

神経周囲浸潤(Perineural invasion:PNI)を特徴とする膵癌で、PNI の分子メカニズムにユビキチンリガーゼ Fbxw7 と基質 Notch1、ケモカイン CCL2-CCR2 の関与を明らかにし、それらを標的とした新規治療法を確立することが本研究の目的である。Fbxw7 は Notch1、c-Myc、mTOR など癌遺伝子産物を基質特異的に分解する癌抑制遺伝子で膵癌では変異は約 2%と低い、KRAS 変異依存的な Erk 活性化による Fbxw7 発現低下が報告された。本研究では、膵癌臨床病理検体、細胞株を用いて、Fbxw7 の発現低下と Notch1 の蓄積、CCL2-CCR2 亢進を明らかにし、PNI などの臨床病理学的予後との関連、細胞生物学的解析を行う。マウス PNI モデルで細胞生物学的解析、生体での効果を解明し、膵癌 PNI の分子標的治療法開発の端緒とする。

2. 研究の目的

Fbxw7 発現が低下している膵癌では組織特異的な基質として Notch1 が候補にあがり、ケモカインを誘導され、PNI への関与が強く示唆されるものである。膵癌 PNI における Fbxw7/Notch1/ケモカインの役割を解明することで、膵癌に対する新たな治療戦略を開発する。

3. 研究の方法

- (1) 病理組織検体における Fbxw7 発現低下と基質タンパク(Notch1)蓄積の同定,ケモカイン CCL2-CCR2 の発現の同定
- (2) 膵癌細胞株における Fbxw7 の発現低下と異常蓄積タンパク Notch1 蓄積の同定,CCL2-CCR2 の発現同定

4. 研究成果

- (1)病理組織検体における Fbxw7 発現低下と病理学的因子の関連
予後が明らかな手術切除症例に対して、Fbxw7 の免疫染色を行った。膵臓組織での発現を確認したが、Fbxw7 発現量と予後の相関は認めなかった。
- (2) 膵癌細胞株 3 種を用いて、FBXW7 のタンパク質レベルでの発現、mRNA の発現を確認、siRNA3 種でノックダウンを行った。発現量の低下を認めたが、基質である Notch1 等の発現は細胞株ごとに異なっていた。そのため、表現型の解析が十分にできなかった。

上記より、方針の転換を行い、Fbxw7 変異を認める胆道癌における Fbxw7 の発現と臨床病理学的な因子の関連、予後の解析を行う方針とした。

胆管癌臨床検体における FBXW7 の発現と臨床病理学的因子との関係

胆管癌臨床検体における FBXW7 の発現と臨床病理学的因子との関係を検討するため、胆管癌症例 154 例を、H-score > 110 を FBXW7 高発現群 (n=37)、H-score ≤ 110 (n=117) を FBXW7 低発現群として分類した。胆管癌臨床検体において FBXW7 の発現と臨床病理学的因子とを比較、検討した。FBXW7 発現と有意に相関する臨床病理学的因子は認めなかった。

FBXW7 発現と臨床病理学的予後との関係

FBXW7 高発現群、低発現群における胆管癌症例の切除後の予後を比較するため、Kaplan-Meier 法を用いて生存期間を算出した。Disease-free survival (DFS; 無再発生存期間)、overall survival (OS; 全生存期間)ともに、FBXW7 低発現群で予後が有意に悪かった (それぞれ、P=0.001、P < 0.001)。5 年生存率は FBXW7 低発現群が 38.6%、FBXW7 高発現群は 89.7%であった。

FBXW7 の発現と臨床病理学的予後因子の解析

FBXW7 が臨床病理学的予後を規定するかを評価するため、DFS と OS における単変量解析を行った。DFS における単変量解析では、FBXW7 (P=0.001)、UICC-pT (P=0.002)、UICC-pN (P < 0.0001)、リンパ管浸潤 (P=0.004)、静脈浸潤 (P=0.01)、神経浸潤 (P=0.001)、術後補助化学療法 (P=0.001)が有意な予後因子となった。これらの因子を Cox 比例ハザードモデルに当てはめて多変量解析すると、FBXW7 (P=0.006)と UICC-pN (P < 0.0001)のみが、DFS における独立した予後予測因子となった。

また、OS における単変量解析では、FBXW7 (P=0.0001)、UICC-pT (P=0.001)、UICC-pN (P < 0.0001)、UICC-pM (P < 0.0001)、リンパ管浸潤 (P=0.013)、神経浸潤 (P=0.029)、R 切除 (P=0.029)、術後補助化学療法 (P=0.005)が有意な予後因子となった (Table. 2B)。これらの因子を Cox 比例ハザードモデルに当てはめて多変量解析すると、FBXW7 (P=0.0004)、UICC-pT (P=0.032)、UICC-pN (P=0.001)、UICC-pM (P=0.029)が抽出され、OS における独立した予後予測因子となった。以上より胆管癌において、既知の予後予測因子に加え、FBXW7 が有意な予後予測因子となった。

胆管癌細胞株における FBXW7 発現抑制と基質 NOTCH1 の蓄積

胆管癌臨床検体における免疫組織化学の解析により、FBXW7 発現低下が胆管癌の予後悪化に有意に関連することが明らかとなった。その分子メカニズムを検討するため、胆管癌細胞株 (RBE、HuCC1、TFK-1) を用いて FBXW7 の機能を解析した。

胆管癌細胞株に siRNA を導入し、FBXW7 を抑制した際の基質タンパク質の発現を検討した。全ての細胞株において、NOTCH1 の発現のみ上昇を認めた。

q-PCR による解析では、FBXW7 発現抑制細胞株で NOTCH1 mRNA の発現量はコントロール群と比

較し変化を認めなかった。

FBXW7 は NOTCH1 を mRNA レベルではなくタンパク質レベルで制御していることが考えられ、胆管癌細胞株において NOTCH1 は FBXW7 の基質タンパク質であることが示された。

FBXW7 発現抑制による増殖への影響

はじめに、胆管癌細胞株において FBXW7 が増殖に及ぼす影響を検討した。FBXW7 の発現を抑制し、24 時間ごとに細胞数を数え、コントロール群と比較した。FBXW7 抑制群とコントロール群とに有意な増殖の差は認めなかった。

FBXW7 発現抑制による胆管癌転移・浸潤への影響

次に、FBXW7 発現変化が胆管癌細胞株の長期的な phenotype に与える影響を検討するため、胆管癌細胞株 RBE に shFBXW7 を導入し、FBXW7 安定発現抑制胆管癌細胞株を作成した。FBXW7 安定発現抑制 RBE においても、NOTCH1 はタンパク質レベルでのみ発現上昇を認め、mRNA の発現には変化を認めなかった。

FBXW7 発現低下は胆管癌の予後悪化に関与するにも関わらず、FBXW7 を抑制しても増殖は変化しなかった。本研究で NOTCH1 が FBXW7 の基質であること、NOTCH signaling が癌細胞において、自己複製能、増殖、遊走能促進などに関与することから、colony formation assay、wound healing assay、migration assay により、自己複製能や遊走能への影響を検討した。

Colony formation assay では、FBXW7 抑制によりコントロール群と比較し、コロニーの数、大きさともに増大した(Fig. 4A)。wound healing assay、migration assay では、コントロール群に比べ FBXW7 抑制群で細胞の移動能、遊走能は亢進した。

移動能、遊走能の変化が NOTCH1 の蓄積に起因するかを検討するために、FBXW7 抑制細胞株において NOTCH1 の発現を抑制した。NOTCH1 抑制により遊走能、移動能はコントロール群と同等程度まで低下した。胆管癌細胞株において、FBXW7 を抑制すると NOTCH1 の細胞内での蓄積を介して遊走能、移動能を促進することが示された。

CDDP 投与におけるアポトーシスの変化と基質 MCL1 の蓄積

胆管癌において CDDP は標準治療薬であることから、FBXW7 の発現が CDDP によるアポトーシスに影響を及ぼすかを検証した。CDDP 非投与時は、FBXW7 発現抑制群とコントロール群とでアポトーシスに変化は認めなかった。一方で CDDP を投与すると、FBXW7 発現抑制群はコントロール群と比較しアポトーシス細胞の減少がみられた。

FBXW7 の基質の一つである MCL1 の発現上昇が、様々な癌腫において CDDP 耐性に関与すると報告されていることから、アポトーシスの変化が MCL1 を介したメカニズムによるかを検討した。

まず、CDDP 投与時に MCL1 の発現に変化があるかを検討した。FBXW7 発現抑制 RBE において、CDDP 非投与時には MCL1 の蓄積はみられないが、CDDP 投与時には MCL1 の蓄積を認めた。MCL1 mRNA の発現量は変化しなかった。胆管癌細胞株において、CDDP 投与時にのみ MCL1 は FBXW7 の基質としてタンパク質が蓄積することが示された。

FBXW7 が MCL1 の発現調節を介してアポトーシスに影響を及ぼしているかを検証するため、FBXW7 発現抑制 RBE において MCL1 の発現を抑制した。MCL1 発現抑制群ではコントロール群と同程度までアポトーシスが増加した。

胆管癌細胞株において、FBXW7 の発現抑制が MCL1 の蓄積を介して CDDP によるアポトーシスを抑制することが示された。

結論

FBXW7 の発現量は胆管癌において予後予測因子となる。FBXW7 は基質 NOTCH1 や MCL1 の調節を介して胆管癌悪性度を制御しており、それらメカニズムが胆管癌に対する新規治療標的として期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

【あたらしい外科局所解剖全図-ランドマークとその出し方】肝胆膵 Special Lecture 尾状葉門脈枝のバリエーション

益田 邦洋, 中川 圭, 青木 修一, 海野 倫明

臨床外科 73(11) 212-218 2018 年 10 月

FBXW7 modulates malignant potential and cisplatin-induced apoptosis in cholangiocarcinoma via NOTCH1 and MCL1.

Mori A, Masuda K, Ohtsuka H, Shijo M, Ariake K, Fukase K, Sakata N, Mizuma M, Morikawa T, Hayashi H, Nakagawa K, Motoi F, Naitoh T, Fujishima F, Unno M

Cancer science 2018 年 10 月 [査読有り]

【胆管癌の手術】肝門部領域胆管癌に対する動脈再建を伴う拡大切除

中川 圭, 宮城 重人, 深瀬 耕二, 益田 邦洋, 元井 冬彦, 海野 倫明

手術 72(10) 1491-1498 2018 年 9 月

【ここまで来た ナビゲーション手術】肝門部領域胆管癌に対する術前シミュレーションと術中応用

益田 邦洋, 中川 圭, 伊関 雅裕, 高舘 達之, 元井 冬彦, 海野 倫明
消化器外科 41(9) 1305-1315 2018年8月

【R0 切除をめざした胆管癌の術前・術中・術後における診断・治療の工夫】胆道癌に対する術後補助療法の意義と適応

高舘 達之, 中川 圭, 益田 邦洋, 深瀬 耕二, 林 洋毅, 海野 倫明
胆と膵 39(7) 647-651 2018年7月

18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Predicts Recurrence in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.

Ariake K, Motoi F, Shimomura H, Mizuma M, Maeda S, Terao C, Tatewaki Y, Ohtsuka H, Fukase K, Masuda K, Hayashi H, Takadate T, Naitoh T, Taki Y, Unno M
Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract 22(2) 279-287 2018年2月 [査読有り]

【Borderline resectable 膵癌に対する集学的治療】Borderline resectable 膵癌に対する治療前 PET SUVmax 値を用いた層別化:術前治療の適応に関する考察

元井 冬彦, 高舘 達之, 前田 晋平, 有明 恭平, 益田 邦洋, 青木 豪, 石田 晶玄, 深瀬 耕二, 水間 正道, 坂田 直昭, 大塚 英郎, 森川 孝則, 林 洋毅, 中川 圭, 内藤 剛, 江川 新一, 海野 倫明
癌の臨床 63(5) 397-403 2018年1月

Locally advanced pancreatic cancer successfully treated by distal pancreatectomy with celiac axis resection (DP-CAR) after S-1 with radiation therapy followed by gemcitabine/nab-paclitaxel therapy: a case report.

Ariake K, Motoi F, Mizuma M, Murakami K, Takadate T, Ohtsuka H, Fukase K, Masuda K, Hayashi H, Nakagawa K, Sakata N, Morikawa T, Maeda S, Naitoh T, Egawa S, Unno M
Surgical case reports 3(1) 15 2017年12月 [査読有り]

A case of adult undifferentiated embryonal sarcoma of the liver successfully treated with right trisectionectomy: a case report.

Mori A, Fukase K, Masuda K, Sakata N, Mizuma M, Ohtsuka H, Morikawa T, Nakagawa K, Hayashi H, Motoi F, Naitoh T, Murakami K, Unno M
Surgical case reports 3(1) 19 2017年12月 [査読有り]

Predictive risk factors for peritoneal recurrence after pancreatic cancer resection and strategies for its prevention.

Ariake K, Motoi F, Ohtsuka H, Fukase K, Masuda K, Mizuma M, Hayashi H, Nakagawa K, Morikawa T, Maeda S, Takadate T, Naitoh T, Egawa S, Unno M
Surgery today 47(12) 1434-1442 2017年12月 [査読有り]

切除不能膵癌に対する Gemcitabine+Nab-Paclitaxel 療法を用いた集学的治療

元井 冬彦, 高舘 達之, 前田 晋平, 有明 恭平, 益田 邦洋, 石田 晶玄, 深瀬 耕二, 水間 正道, 大塚 英郎, 坂田 直昭, 林 洋毅, 中川 圭, 森川 孝則, 内藤 剛, 海野 倫明
癌と化学療法 44(12) 1241-1244 2017年11月

[Multidisciplinary Therapy with Gemcitabine and Nab-Paclitaxel for Unresectable Pancreatic Cancer].

Motoi F, Takadate T, Maeda S, Ariake K, Masuda K, Ishida M, Fukase K, Mizuma M, Ohtsuka H, Sakata N, Hayashi H, Nakagawa K, Morikawa T, Naitoh T, Unno M
Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy 44(12) 1241-1244 2017年11月 [査読有り]

MK2461, a Multitargeted Kinase Inhibitor, Suppresses the Progression of Pancreatic Cancer by Disrupting the Interaction Between Pancreatic Cancer Cells and Stellate Cells.

Inoue K, Ohtsuka H, Tachikawa M, Motoi F, Shijo M, Douchi D, Kawasaki S, Kawaguchi K, Masuda K, Fukase K, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M, Terasaki T
Pancreas 46(4) 557-566 2017年4月 [査読有り]

【膵・胆道癌の治療戦略:こんなときどうするか?-ガイドラインにないエキスパートオピニオン-】肝内胆管癌で腹腔内リンパ節はどこまで切除するか?

益田 邦洋, 中川 圭, 深瀬 耕二, 元井 冬彦, 海野 倫明
胆と膵 37(6) 505-510 2016年6月

〔学会発表〕(計8件)

肝門部領域胆管癌における両葉ドレナージが門脈塞栓術後肝肥大に及ぼす影響

益田 邦洋, 中川 圭, 深瀬 耕二, 伊関 雅裕, 高館 達之, 大塚 英郎, 水間 正道, 林 洋毅, 森川 孝則, 元井 冬彦, 内藤 剛, 亀井 尚, 菅野 敦, 正宗 淳, 海野 倫明
胆道 32(3) 611-611 2018年8月

【肝】肝内胆管癌の予後改善に向けた取り組み 腫瘍形成型肝内胆管癌に対するリンパ節郭清を伴う胆管切除の意義

益田 邦洋, 中川 圭, 伊関 雅裕, 高館 達之, 深瀬 耕二, 大塚 英郎, 元井 冬彦, 内藤 剛, 亀井 尚, 海野 倫明
日本消化器外科学会総会 73回 267-267 2018年7月

胆管癌におけるFBXW7発現の意義と基質MCL1を介した分子メカニズム

盛 彬子, **益田 邦洋**, 有明 恭平, 深瀬 耕二, 大塚 英郎, 中川 圭, 元井 冬彦, 亀井 尚, 内藤 剛, 海野 倫明
日本消化器外科学会総会 73回 741-741 2018年7月

進行胆嚢癌に対する集学的治療と新たな治療 進行胆嚢癌の治療成績から見た手術適応と治療戦略

益田 邦洋, 林 洋毅, 畠 達夫, 伊関 雅裕, 高館 達之, 有明 恭平, 石田 晶玄, 深瀬 耕二, 大塚 英郎, 水間 正道, 中川 圭, 森川 孝則, 元井 冬彦, 石田 孝宣, 亀井 尚, 内藤 剛, 海野 倫明
日本外科学会定期学術集会抄録集 118回 696-696 2018年4月

胆管癌における予後予測因子としてのFBXW7発現の意義と分子メカニズム

盛 彬子, **益田 邦洋**, 四條 正浩, 有明 恭平, 深瀬 耕二, 大塚 英郎, 水間 正道, 森川 孝則, 林 洋毅, 中川 圭, 元井 冬彦, 藤島 史喜, 内藤 剛, 石田 孝宣, 亀井 尚, 海野 倫明
日本外科学会定期学術集会抄録集 118回 989-989 2018年4月

遠位胆管癌へのアプローチ 各診療科のコラボレーション 遠位胆管癌切除例の予後不良因子と術後補助化学療法の有用性

益田 邦洋, 中川 圭, 海野 倫明
胆道 31(3) 410-410 2017年8月

胆管細胞癌に対する治療戦略 肝門部領域のMF型およびMF+PI型肝内胆管癌と肝門部胆管癌との治療成績の比較

益田 邦洋, 中川 圭, 深瀬 耕二, 水間 正道, 大塚 英郎, 林 洋毅, 森川 孝則, 元井 冬彦, 内藤 剛, 海野 倫明
日本消化器外科学会総会 72回 02-97 2017年7月

肝内胆管癌の局在および多様性から見た術式選択 肝門部領域のMF型およびMF+PI型肝内胆管癌の治療成績

益田 邦洋, 中川 圭, 深瀬 耕二, 高館 達之, 前田 晋平, 有明 恭平, 青木 豪, 石田 晶玄, 水間 正道, 坂田 直昭, 大塚 英郎, 森川 孝則, 林 洋毅, 元井 冬彦, 内藤 剛, 海野 倫明
日本外科学会定期学術集会抄録集 117回 WS-19 2017年4月

〔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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(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。