

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19911

研究課題名(和文) 膵癌新規予後規定因子SLP-2の機能解析-抗癌剤感受性予測因子としての検証-

研究課題名(英文) Functional analysis of Stomatin like protein 2, a new prognostic factor for pancreatic cancer, and verify the relevance to prognosis

研究代表者

有明 恭平(Ariake, Kyohei)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10754921

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)：shRNAの手法にて作成した膵癌細胞株2種類を用いて機能解析を行った。抗癌剤の感受性について検討したが、有意な結果は得られなかった。しかしながらSLP-2の発現を抑制した細胞株では、細胞の移動能及び浸潤能が顕著に低下し、EMTが制御されていることが示された。マウスを用いた肝転移モデルにおいて発現抑制株では肝転移の形成された個数が有意に低下していることが示された。以上よりSLP-2はEMTを介した癌細胞の浸潤転移を調整することで、肝転移に関与し予後を調整している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Functional analysis was performed using two types of pancreatic cancer cell lines prepared by shRNA technique. We examined the susceptibility of anticancer drugs, but no significant results were obtained. However, in the cell line that suppressed the expression of SLP-2, the migratory ability and invasive ability were remarkably decreased, indicating that the EMT was controlled. In the liver metastasis model using mouse, it was shown that the number of liver metastasis was significantly decreased in the SLP-2 suppressed cells. From the above, it is suggested that SLP-2 may regulate the invasive ability and metastasis of cancer cells via EMT.

研究分野：外科

キーワード：SLP-2 stomatin 膵癌 肝転移 EMT ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

我々の施設ではこれまで膵癌の予後に寄与する因子の探索的研究を行い、Stomatin like protein 2(SLP-2)が新規予後規定因子であることを世界に先駆け報告した<sup>1)</sup>。その手法として、Stage B膵癌のうち、5年生存が得られた予後良好な4例、早期再発から癌死に至った4例、正常膵組織5例からなるホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)を使用し、網羅的プロテオミクス解析から全1229タンパク質を抽出し、免疫染色法による評価確認を行い抽出した(図1)

Stomatin like protein2(SLP-2)は胃癌<sup>2)</sup>、

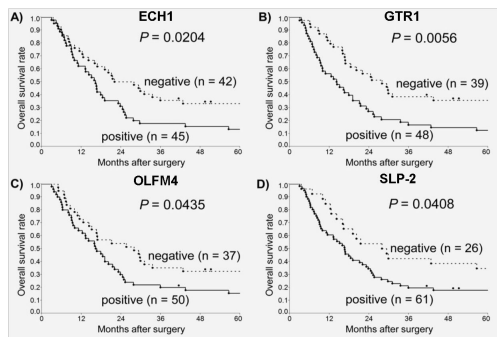


図1)膵癌の新規予後規定因子

肺癌<sup>3)</sup>、乳癌<sup>4)</sup>といった他癌種においても、その発現によって予後不良になることが報告され、近年癌の悪性化に関与する因子として注目されている(図2)。

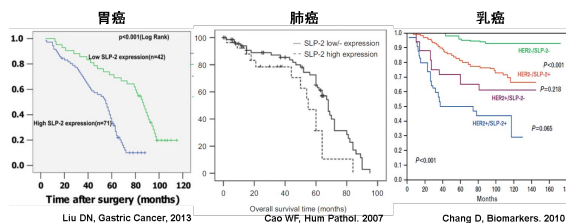


図2)SLP2は各種癌の悪性化に関与する

Stomatin はヒト赤血球の細胞膜から単離、同定された膜タンパク質であり、SLP-2 は N 末の疎水性領域を欠失したサブタイプとして同定された<sup>5)</sup>。細胞内ではミトコンドリアにその局在が集中しており、ミトコンドリア内膜に存在するカルジオリピンと結合することで膜の安定化に寄与することや、電子伝達系における呼吸鎖の形成に関与することなどがこれまで明らかにされている<sup>6)</sup>。また癌の悪性化について、これまで食道癌における

増殖能や接着能への影響<sup>7)</sup>、神経膠腫における MMP の活性化や浸潤能への効果<sup>8)</sup>など、癌種によって様々な要因が報告されているが、膵癌についての報告はなく、その機能や予後との関連性については明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は SLP-2 の機能解析を行うことで、癌の悪性化に関与するメカニズムを明らかにすることにある。SLP-2 はミトコンドリア内膜に局在するタンパク質である。これまで膜の安定化に関与することでアポトーシス関連因子の放出を抑制し、抗アポトーシス効果として表現される<sup>9)</sup>。食道癌において、SLP-2 の発現を抑制することで、カンプトテシンやアドリアマイシン、シスプラチン投与時のアポトーシスが誘発されることが示されている<sup>10)</sup>。これらの報告から、SLP-2 の発現は抗癌剤由来のストレスが細胞に加わった際に、ミトコンドリア由来のアポトーシスに関与することで、抗癌剤に対する耐性獲得につながっている可能性があるのではないかと予測した。またこれ以外にも、細胞の移動能や接着能に関連する報告もあることから、本研究では第一に SLP-2 の発現をもとに抗癌剤感受性の予測を行うこと、次いで SLP-2 の発現と膵癌の予後を悪化させるメカニズムについて移動能、浸潤能などといった機能の評価することで明らかにしたいと考えた。

## 3. 研究の方法

本研究は SLP-2 の癌悪性化に関与するメカニズムを解明すべく、膵癌細胞株を用いた基礎的研究及び動物を用いた生体内での評価を平行して行うこととした。

### (1) 基礎的研究(in vitro)

SLP-2 の発現を調整した細胞株を用いて、細胞の増殖能や抗癌剤投与後の viability, アポトーシスへの影響について、ミトコンドリアの機能解析を行うとともに明らかにする。また SLP-2 の発現と細胞の移動能や浸潤能と

いった機能についての解析を行う。

## (2) 動物実験 (in vivo)

マウスを用いて SLP-2 の発現が腫瘍の形成能に及ぼす影響について検証する。また抗癌剤の感受性を評価すべく、形成された腫瘍に対し抗癌剤を投与することで腫瘍の縮小能やその後の生存期間への影響について検討する。また SLP-2 の発現が腫瘍の転移形成能に影響がないか検証すべく、細胞株を脾臓に注入する肝転移モデルを作成し発現量による変化について評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞選択・安定発現抑制株の作成

膵癌細胞株 6 種類 (Panc1, Miaapaca2, SUIT2, ASpc, BxPC3, SW1990) を用いて、SLP-2 の発現を比較したところ、Panc1, ASPC1 の発現量が高いことから、この 2 種類の細胞株を用いて研究を行うこととした。SLP-2 の shRNA を作成し、これを膵癌細胞株に導入し、安定発現抑制株及び安定発現株を作成した。以後の研究は本細胞株を用いて行うこととした (図 3)。

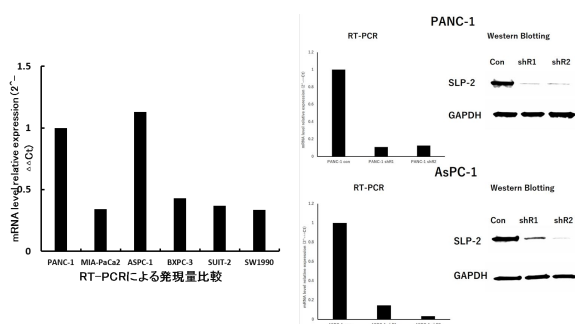


図3) SLP-2の安定発現株及び発現抑制株の作成

### (2) 抗癌剤感受性についての検証

安定発現株及び安定発現抑制株を用いて 5Fluorouracil, Gemcitabine の IC50 について測定した。結果として SLP-2 の発現量の変化による抗癌剤の感受性変化は認められず、感受性に対する影響は低いものと考えられた。

### (3) SLP-2 の発現を抑制することで膵癌細胞の移動能・浸潤能は低下する

scratch assay 及び trans-well assay を用い

て移動能についての評価を行った。SLP-2 の発現量を抑制することで移動能が有意に低下することが明らかとなり、matrigel でコーティングされた Boyden chamber を用いた浸潤能の評価でも同様に SLP-2 の発現が抑制されることで浸潤能が有意に抑制されることが明らかとなった (図 4, 5)。

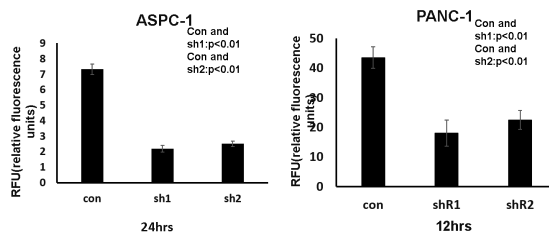


図4)移動能 (transwell assay)

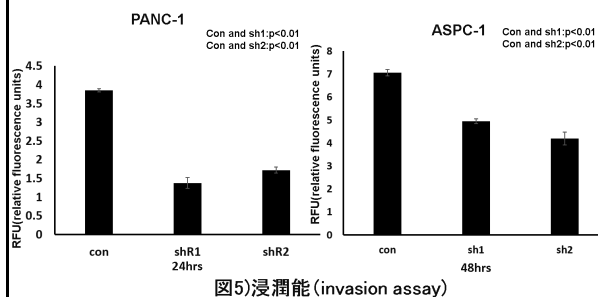


図5)浸潤能 (invasion assay)

### (4) SLP-2 の発現は Epithelial-mesenchymal transition を制御している

SLP-2 の発現が癌細胞の移動・浸潤能に深く関与していることことから、そのメカニズムを解明すべく、EMT 関連マーカーの発現を western blot 法を用いて評価した。その結果 SLP2 の発現を抑制した細胞株では上皮系マーカーである E-cadherin の発現が上昇し、間葉系マーカーである Vimentin の発現が抑制された。以上より SLP-2 の発現が上昇することで、癌細胞では EMT が誘導されている可能性が示唆された (図 6)。

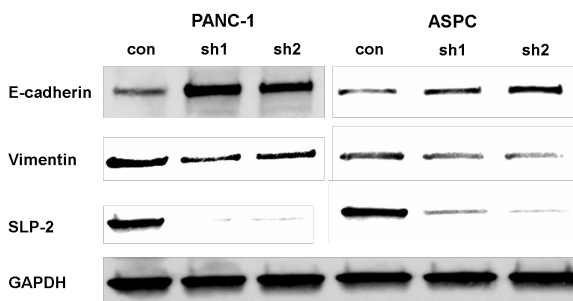


図6) SLP-2の発現とEMT関連マーカーの発現について

### (5) SLP-2 の発現は生体内における肝転移形成に深く関与している

SCID マウスを用いた Xenograft model を作成した。SLP-2 の安定発現株及び安定発現抑制株( $1.0 \times 10^5$  cells)をマウスの肝臓に注入し、6 週間後に形成された肝転移の個数を評価した。その結果安定発現株では平均 22 個の肝転移を形成するのに対し、安定発現抑制株 (sh1, sh2) では sh1 で平均 2.3 個、sh2 では平均 1.6 個と有意に転移形成数が抑制され、SLP-2 の発現が生体内において肝転移形成に顕著に関与していることが示された。

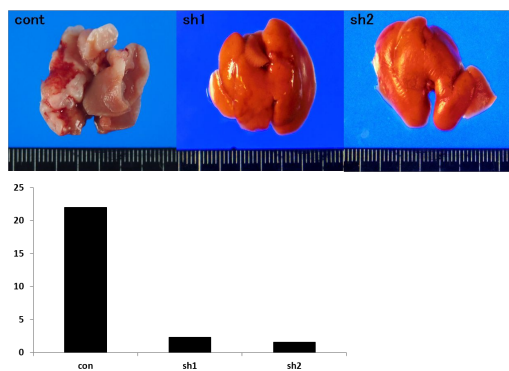


図7) SLP-2の発現を抑制することで肝転移の個数が有意に低下した

以上の結果から SLP-2 は EMT を介した癌細胞の浸潤転移を調整することで、肝転移を制御し膵癌の予後に関与している可能性が示唆された。SLP-2 は細胞内においても特にミトコンドリアに発現が偏在しているタンパク質である。ミトコンドリア由来の単一タンパク質が EMT 及び、肝転移を制御するという報告は少なく、極めて興味深い知見であるといえる。今後はミトコンドリア由来タンパク質である SLP2 を通じた遠隔転移形成に関与するシグナル伝達のメカニズムを明らかにすることで、癌の予後規定因子のみならず、新たな分子標的治療の標的としての可能性について検証していく必要があると考える。

#### 引用文献

1) Takadate T et al, Novel prognostic protein markers of resectable pancreatic cancer identified by coupled shotgun and

targeted proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues, *Int J Cancer*, 132. 6. 1368-82. 2013

2) Liu et al. Increased levels of SLP-2 correlate with poor prognosis in gastric cancer. *Gastric Cancer* 16(4). 498-504. 2013

3) Chang et al, SLP-2 overexpression is associated with tumour distant metastasis and poor prognosis in pulmonary squamous cell carcinoma. *Biomarkers*, 15(2): 104-10. 2010

4) Cao et al. SLP-2 overexpression could serve as a prognostic factor in node positive and HER2 negative breast cancer. *Pathology*. 43(7): 713-8. 2011

5) Wang Y et al. Identification and characterization of human SLP-2, a novel homologue of stomatin (band 7.2b) present in erythrocytes and other tissues. *J Biol Chem*. 17; 275(11): 8062-71. 200

6) Mitsopoulos P et al. Stomatin-like protein 2 is required for in vivo mitochondrial respiratory chain supercomplex formation and optimal cell function. *Mol Cell Biol*. 35(10): 1838-47. 2015

7) Zhang L et al, Stomatin-like protein 2 is overexpressed in cancer and involved in regulating cell growth and cell adhesion in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 12(5): 1639-46. 2006

8) Song L et al, Knockdown of stomatin-like protein 2 (STOML2) reduces the invasive ability of glioma cells through inhibition of the NF- $\kappa$ B/MMP-9 pathway. *J Pathol*. 226(3): 534-43. 2012

9) Christie D et al, Stomatin-like protein 2 binds cardiolipin and regulates

mitochondrial biogenesis and function. Mol Cell Biol. 31(18):3845-56. 2011

10) Wang Y et al, Downregulation of a mitochondria associated protein SLP-2 inhibits tumor cell motility, proliferation and enhances cell sensitivity to chemotherapeutic reagents. Cancer Biol Ther. 8(17):1651-8. 2009

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 3件)

Ariake K, Motoi F, Shimomura H, et al. 18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Predicts Recurrence in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. J Gastrointest Surg, 査読あり, 22(2), 2018 :279-287.

doi: 10.1007/s11605-017-3627-3.

Ariake K, Motoi F, Ohtsuka H, et al. Predictive risk factors for peritoneal recurrence after pancreatic cancer resection and strategies for its prevention. Surg Today. 査読有, 47(12):2017 1434-1442.

doi: 10.1007/s00595-017-1531-9.

Ariake K, Motoi F, Mizuma M, et al. 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. Surg Case Rep. 査読有, 3(1):15.2017

doi: 10.1186/s40792-017-0290-6. Epub 2017 Jan 18.

〔学会発表〕(計 1件)

有明恭平, Stomatin like protein 2 は EMT を介した膵癌細胞の移動浸潤能を制御する, 第 118 回日本外科学定期学術集会, 2018 年 4

月 7 日, 東京国際フォーラム(東京)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.surg.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有明 恭平 (Ariake, Kyohei)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 10754921