

令和元年5月15日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15648

研究課題名(和文)新規ゲムシタピン耐性機構の研究

研究課題名(英文) Study on a novel mechanism of gemcitabine resistance

研究代表者

谷 里奈 (Fujiwara-Tani, Rina)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20783872

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)：ゲムシタピン耐性株MIA-PaCa2-GEMでは、親株であるMIA-PaCa2に比較しMAST4発現が亢進していた。MAST4発現はヒト膵管癌において癌の進行、予後不良、および、ゲムシタピン耐性と相関していた。耐性株においてMAST4をノックダウンするとゲムシタピン耐性は消失した。MAST4は核内においてAKT3と相互作用を示し、AKT3活性化によりFoxO3などを介してゲムシタピン耐性を誘導すると考えられた。また、MAST4発現亢進はmiR582-5p発現抑制により誘導されると考えられた。MAST4は膵管癌における新規ゲムシタピン耐性遺伝子・予後不良因子であり、新規分子標的として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵管癌は、早期診断・早期治療が困難で生物学的悪性度も高く、最も悪性度の高い難治癌である。治療困難の要因の一つが有効な抗がん剤の少なさと耐性獲得による抗がん剤の無力化である。ゲムシタピンは膵管癌に有効性な数少ない抗がん剤の一つであるが、多くの症例では投与中に耐性を生じ効果が失われる。本研究ではゲムシタピン耐性を解除する新たな分子標的を見出すことに成功しており膵管癌の治療の改善につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the gemcitabine resistant strain MIA-PaCa2-GEM, MAST4 expression was enhanced compared to the parent strain MIA-PaCa2. MAST4 expression has been correlated with cancer progression, poor prognosis, and gemcitabine resistance in human pancreatic ductal carcinoma. When MAST4 was knocked down in MIA-PaCa2-GEM, gemcitabine resistance disappeared. MAST4 interacts with AKT3 in the nucleus, and it is thought that AKT3 activation induces gemcitabine resistance via the AKT3-target genes, such as FoxO3. Moreover, it was thought that MAST4 upregulation was induced by miR 582-5p downregulation. MAST4 is a novel gemcitabine resistance gene in pancreatic ductal cancer and a prognostic factor, and is expected as a novel molecular target in pancreatic ductal cancer.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵管癌 ゲムシタピン 薬剤耐性 MAST4 AKT 酸化ストレス

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

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、増加を続けているがんの一つであり、2014年には男女がん死亡の第4位に達している。一方、膵癌は予後不良の難治癌として知られ、診断時80%の症例はstage IVであり、治癒切除率は低く、化学療法が膵癌の治療においては特に重要性が高い。しかし、化学療法は有効な regimen の少なさや抗がん剤耐性が問題となっており、膵癌の5年生存率は担癌患者を含めても10%程度である。このため、新規抗がん剤、あるいは、抗がん剤耐性の検出による適切な抗癌剤の選択および抗癌剤耐性機序の解明による耐性阻害物質の発見が急務とされる。

2. 研究の目的

MIA-PaCa2 からゲムシタピン長期持続処理によりゲムシタピン耐性株 MIA-PaCa2-GEM を樹立したが、両細胞株における遺伝子発現パターンの差異をアレイ解析により比較したところ、耐性株 MIA-PaCa2-GEM において発現が親株の7倍に増強しさらにこれまでがんと関連を含めその機能についての報告が乏しい遺伝子である MAST4 が抽出された。本研究では、MAST4 に対して、そのゲムシタピン耐性成立機序の解明を主眼に検討を行い、膵管癌の化学療法の有効性を向上することにつながる知見を得ることを目標とした。

3. 研究の方法

これまで、抗癌剤耐性機序としては、抗癌剤の細胞外汲み出し、抗癌剤代謝経路の亢進、DNA修復能の亢進などが知られるが、MAST4 は Ser/Thr キナーゼ活性を有する以外に機能的な手掛かりがない。本研究では、親株 MIA-PaCa2 と耐性株 MIA-PaCa2-GEM を比較しつつ、キナーゼの基質、physical association を行うタンパク、免疫染色において核局在を示す意味などから機序を解明した。

4. 研究成果

(1) 膵管癌症例における MAST4 発現

MAST4 発現を91例の膵管癌切除例で検討すると、45例49%に高発現が見られ、発現の程度は、組織学的 grade、T 因子、M 因子、stage、および、予後不良と関連していた。さらに、MAST4 高発現例で有意に予後は不良であった。また、ゲムシタピン使用例42例では、MAST4 高発現を認めた21例ではゲムシタピン(GEM)耐性が認められた。

(2) 耐性株 MIA-PaCa2-GEM における MAST4 の GEM 耐性への関与

MAST4 の GEM 耐性への関与を確認するため MIA-PaCa2-GEM において MAST4 をノックダウンしたところ、GEM 感受性は親株と同等に改善された。さらに、両株における5-FUおよびCDDPに対する感受性を検討したところ、MIA-PaCa2-GEM においては5-FUに対し約8倍の耐性を示したが、CDDP への感受性は親株と同等であった。また、膵管癌における既知の GEM 耐性遺伝子である MRP1、RRM1、RRM2、hENT などの発現を検討したが、両株に有意差は認められなかった。

(3) MAST4 細胞内局在と GEM 耐性

ヒト膵切除標本を用いた免疫染色を行ったが、MAST4 は正常膵管上皮では細胞質に、膵管癌細胞では細胞質と核に発現しており、核への染色性は予後と逆相関を示していた。MIA-PaCa2-GEM において、MIA-PaCa2 に比較し細胞質・核ともに MAST4 タンパクレベルの亢進が認められた。このように、核内 MAST4 が GEM 耐性機序に関与することが示唆された。

(4) 阻害剤スクリーニングアッセイを用いた MAST4 関連シグナルの検討

阻害剤スクリーニングセット(先端動物モデル支援プラットフォームより供与)を用いて約400種の阻害剤で MIA-PaCa2-GEM における GEM 耐性を抑制するものを検討した。その結果、AKT-mTor、Jak-Stat3、GSK-3 などのシグナル系の阻害が抽出された。このうち、AKT の発現を各 isoform について検討すると、MIA-PaCa2-GEM においては AKT1/2 の発現は MIA-PaCa2 と同等であったのに対し、AKT3 の発現が亢進していた。また、MAST4 ノックダウンにより AKT1/2 タンパクは変化しなかったが、AKT3 タンパクは減少した。このことから、MAST4 関連シグナルとして AKT3 が有望視された。さらに、MAST4 ノックダウンにより AKT3 の標的タンパクである FoxO3 のリン酸化レベルが低下した。また、AKT3 をノックダウンすることにより GEM 耐性が親株以下に低下した。さらに、Duolink PLA を用いて、MAST4 と AKT3 タンパクの共局在を検討したところ、核内に共局在シグナルが認められた。

(5) MAST4 発現に対する microRNA の関与

耐性株における MAST4 過剰発現に関して、MAST4 を標的遺伝子とする miR582-5p について検討した。miR582-5p の inhibitor を用いて MIA-PaCa2 を処理すると、MAST4 発現は亢進し GEM 感受性は約 1/2 倍に低下した。

上記のように、MAST4 は miR582-5p 発現低下により発現誘導され、核内において AKT3 のシグナル伝達プラットフォームとしてその作用を促進し、GEM 耐性を誘導する可能性が示唆され

た。

このように、MAST4 はこれまでにない機序を有する新規耐性遺伝子として注目される。新規ゲムシタピン耐性機構を解明することは、ゲムシタピンのみならず今後開発される化学療法剤の耐性阻害を可能にすると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

Nishiguchi Y, **Fujiwara-Tani R**, Sasaki T, Luo Y, Ohmori H, Kishi S, Mori S, Goto K, Yasui W, Sho M, Kuniyasu H. Targeting claudin-4 enhances CDDP-chemosensitivity of gastric cancer. **Oncotarget** 10 (22): 2189-2202; 2019. doi: 10.18632/oncotarget.26758

Fujiwara-Tani R, Sasaki T, Ohmori H, Luo Y, Goto K, Nishiguchi Y, Mori S, Nakashima C, Mori T, Miyagawa Y, Kawahara I, Fujii K, Kishi S, Tatsumoto N, Kuniyasu H. Concurrent expression of CD47 and CD44 in colorectal cancer promotes malignancy. **Pathobiology** 2019, in press

Kawahara I, Goto K, Kodama K, Luo Y, **Fujiwara-Tani R**, Mori T, Miyagawa Y, Tanaka H, Kodama H, Hirayama A, Hosoito N, Taniguchi Y, Miki Y, Kuniyasu H. Magnetic hyperthermia using self-controlled heating elements consisting of Fe-Al milling alloy induces cancer cell apoptosis while preserving skeletal muscle. **Pathobiology** 2019, in press

Kusuoka O, **Fujiwara-Tani R**, Nakashima C, Fujii K, Ohmori H, Mori T, Kishi S, Miyagawa Y, Goto K, Kawahara I, Kuniyasu H. Intermittent calorie restriction enhances epithelial-mesenchymal transition through alteration of energy metabolism in a mouse tumor model. **Int J Oncol** 52: 413-423, 2018. doi: 10.3892/ijo.2017.4229

Nakashima C, Yamamoto K, **Fujiwara-Tani R**, Luo Y, Matsushima S, Fujii K, Ohmori H, Sasahira T, Sasaki T, Kitadai Y, Kirita T, Kuniyasu H. Expression of cytosolic malic enzyme (ME1) is associated with disease progression in human oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci** 109(6):2036-2045, 2018. doi: 10.1111/cas.13594

Kishi S, **Fujiwara-Tani R**, Luo Y, Kawahara I, Goto K, Fujii K, Ohmori H, Nakashima C, Sasaki T, Kuniyasu H. Pro-metastatic signaling of elaidic acid, a trans fatty acid, is associated with lipid rafts. **Oncol Lett** 15(4): 4423-4426, 2018. doi: 10.3892/ol.2018.7817

Nakashima C, Kishi S, **Fujiwara-Tani R**, Luo Y, Kawahara I, Goto K, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Expression of the long-chain fatty acid receptor GPR40 was associated with cancer progression in colorectal cancer. **Oncol Lett** 15(6): 8641-8646, 2018. doi: 10.3892/ol.2018.8383

Matsushima-Otsuka S, **Fujiwara-Tani R**, Sasaki T, Ohmori H, Nakashima C, Kishi S, Nishiguchi Y, Fujii K, Luo Y, Kuniyasu H. Significance of intranuclear angiotensin-II type 2 receptor in oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 9(93): 36561-36574, 2018. doi.org/10.18632/oncotarget.26337

Miyagawa Y, Mori T, Goto K, **Fujiwara-Tani R**, Kishi S, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Kawahara I, Kuniyasu H. Intake of medium-chain fatty acids induces oxidative stress and to atrophy the myocardium. **Lipids in Health and Disease** 17:258, 2018. doi.org/10.1186/s12944-018-0908-0

Fujiwara-Tani R, Sasaki T, Luo Y, Ohmori H, Nishiguchi Y, Kishi S, Mori S, Goto K, Kondoh M, Kuniyasu H. Anti-claudin-4 extracellular domain antibody enhances the antitumoral effects of chemotherapeutic and antibody drugs in colorectal cancer. **Oncotarget** 9(100):37367-37378, 2018. doi: 10.18632/oncotarget.26427

Fujii K, Luo Y, Nishiguchi Y, **Fujiwara R**, Kishi S, He S, Yang S, Sasaki T, Ohmori H, Kuniyasu H. Pro-metastatic intracellular signaling of elaidic acid, a trans fatty acid. **Int J Oncol** 50(1): 85-92, 2017. doi: 10.3892/ijo.2016.3797

Ohmori H, Fujii K, Kadochi Y, Mori S, Nishiguchi Y, **Fujiwara R**, Kishi S, Sasaki T, Kuniyasu H. Elaidic acid, a trans fatty acid, enhances the metastasis of colorectal cancer cells. **Pathobiology** 84(3):144-151, 2017. doi: 10.1159/000449205

Tanabe E, Kitayoshi M, Fujii K, Ohmori H, Luo Y, **Fujiwara R**, Kadochi Y, Mori S, Kuniyasu H. Fatty acids inhibit anti-cancer effect of 5-fluorouracil in mouse cancer cell lines. **Oncol Lett** 14(1): 681-686, 2017. doi: 10.3892/ol.2017.6190

Mori S, Kadochi Y, Luo Y, **Fujiwara-Tani R**, Nishiguchi Y, Kishi S, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Proton pump inhibitor induces-collagen expression in colonocytes is associated with collagenous colitis. **World J Gastroenterol** 23(9):1586-1593, 2017. doi: 10.3748/wjg.v23.i9.1586

Kadochi Y, Mori S, **Fujiwara-Tani R**, Luo Y, Nishiguchi Y, Kishi S, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Remodeling of energy metabolism by a ketone body and medium-chain fatty acid suppressed proliferation of CT26 mouse colon cancer cells. **Oncol Lett** 14(1): 673-680, 2017. doi: 10.3892/ol.2017.6195

Kawahara I, Mori T, Goto K, Fujii K, Ohmori H, **Fujiwara-Tani R**, Kuniyasu H. Fatty acids induce stemness in the stromal cells of a CT26 mouse tumor model. **Pathobiology** 84(5):237-242, 2017. doi: 10.1159/000471854

[学会発表](計 12 件)

谷 里奈, 森 汐莉, 佐々木隆光, 岸 真五, 國安弘基
膵管癌細胞株 MIA-PaCa-2 の gemcitabine 耐性獲得におけるミトコンドリア代謝変化の検討
第 108 回日本病理学会総会、東京都、2019.5.9-11

Fujiwara-Tani R, Mori S, Kishi S, Sasaki T, Kuniyasu H
MAST4 expression correlates with gemcitabine resistance in pancreatic ductal carcinoma.
先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、大津市、2018.1.24-25

谷 里奈, 森 汐莉, 佐々木隆光, 岸 真五, 國安弘基
膵管癌の gemcitabine 耐性獲得における MAST4 の役割
第 107 回日本病理学会総会、札幌市、2018.6.21-23

谷 里奈, 森 汐莉, 佐々木隆光, 岸 真五, 國安弘基
膵管癌の gemcitabine 耐性獲得における MAST4 の役割
第 27 回日本癌転移学会、横浜市、2018.7.19-20

Fujiwara-Tani R, Kishi S, Mori S, Sasaki T, Kuniyasu H
MAST4 expression correlates with gemcitabine resistance in pancreatic ductal carcinoma.
77th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Osaka, 2018.9.28-30

谷 里奈, 森 汐莉, 岸 真五, 庄 雅之, 國安弘基
膵管癌における gemcitabine 耐性に関する MAST4 作用機序の検討
先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会 2018、茅野市蓼科、2018.9.6-8

谷 里奈, 森 汐莉, 岸 真五, 庄 雅之, 國安弘基. 膵管癌の gemcitabine 耐性獲得における MAST4 と AKT3 の役割. 第 29 回日本消化器癌発生学会、東京都、2018.11.16-17

Nishiguchi Y, Luo Y, **Fujiwara-Tani R**, Sasahira T, Kondo M, Sho M, Kuniyasu H. The effect of anti-claudin-4 antibody on chemotherapeutic sensitivity in gastric cancer. 12th International Gastric Cancer Congress, Beijing, China, 2017.4.20-23

谷 里奈, 佐々木隆光, 岸 真五, 羅 奕, 國安弘基. MAST4 は膵癌における新規ゲムシタピン耐性遺伝子である. 第 106 回日本病理学会総会、東京都、2017.4.27-29

谷 里奈, 佐々木隆光, 羅 奕, 國安弘基. 膵癌における新規ゲムシタピン耐性遺伝子である MAST4 の作用機序. 第 26 回日本癌転移学会、大阪市、2017.7.27-28

Fujiwara-Tani R, Mori S, Kishi S, Sasaki T, Kuniyasu H. Gemcitabine resistance of MIA-PaCa-2 human pancreatic duct carcinoma cells. 76th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2017.9.28-30

谷 里奈, 佐々木隆光, 森 汐莉, 岸 真吾, 國安弘基. 膵癌における新規ゲムシタピン耐性遺伝子である MAST4 の作用機序. 第 28 回日本消化器癌発生学会・第 9 回国際消化器癌発生会議、熊本市、2017.11.17-18

[図書](計 1 件)

Fujiwara-Tani R, Matsushima-Otsuka S, Nishiguchi Y, Mori S, Kuniyasu H. Protumoral effect of angiotensin system. **JNMA** 69(4-6):57-66, 2018.

〔その他〕

ホームページ等

奈良県立医科大学分子病理学 HP (<http://www.naramed-u.ac.jp/~molepath/>)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：國安 弘基

ローマ字氏名：(KUNIYASU, Hiroki)

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。