

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16584

研究課題名(和文) 抗癌剤耐性におけるライソゾーム酵素の機能解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of lysosome in pancreatic cancer

研究代表者

白井 祥睦 (Shirai, Yoshihiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10785364

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)：切除不能膵臓癌における抗癌剤耐性について、ライソゾーム酵素に焦点を当て研究した。ヒト膵臓癌細胞株および動物実験モデルで検証された。マイクロアレイ解析では抗癌剤によって要求が上昇するライソゾーム酵素群を特定した。中でも酸性 グルコシダーゼや酸性セラミダーゼなど糖や脂質代謝に関連する酵素の上昇認めた。これらを標的としてRNA干渉を行い、細胞増殖抑制効果を確認した。酸性 グルコシダーゼ阻害では異常ミトコンドリアが蓄積し、細胞死に誘導された。酸性セラミダーゼ阻害では細胞内にセラミドやROSが蓄積し、細胞死誘導された。ウイルスベクターを用いた遺伝子治療をマウスモデルで検証し、腫瘍増殖抑制効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除不能膵臓癌には塩酸ゲムシタピンを中心とした化学療法が適応されている。生存期間中央値は7-9カ月と予後不良であり、抗癌剤耐性を示す症例に対する新たな治療法の開発が必要である。我々は抗癌剤耐性に関与するオートファジー機構の実態であるライソゾーム酵素に着目し、抗癌剤投与によって細胞内の要求が上昇する酵素群を特定し、その酵素を阻害することで抗癌体制を改善する方法を培養細胞および動物実験モデルで明らかにした。当該研究の結果は将来的に抗癌剤耐性を改善させ、膵臓癌化学療法の奏効率を大きく改善させる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Anticancer drug resistance in unresectable pancreatic cancer was investigated focusing on lysosomal enzymes. We used human pancreatic cancer cell line and an animal model. Microarray analysis identified a group of lysosomal enzymes whose requirements were increased by anticancer drugs. Above all, elevated levels of enzymes related to glucose and lipid metabolism such as acid -glucosidase and acid ceramidase were observed. RNA interference was performed with these enzymes as targets, and the cell growth inhibitory effect was confirmed. Inhibition of acid -glucosidase caused abnormal mitochondrial accumulation and cell apoptosis. Inhibition of acid ceramidase caused cell death by intracellular accumulation of ceramide and ROS. Gene therapies using an adeno virus vector were verified in a mouse model, and the tumor growth inhibitory effects were confirmed.

研究分野：膵臓癌

キーワード：膵臓癌 Lysosome オートファジー 酸性 グルコシダーゼ 酸性セラミダーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは現代医学が克服すべき大きなテーマである。日本国内のがん死亡者数は 36 万人に上り、死因全体の 30% を占め第 1 位である。中でも膵臓癌は最も予後不良な消化器がんの 1 つである。膵臓癌は悪性度の高さにより診断時に手術可能な症例は全体の 10-20% に留まる。これらの切除不能膵臓癌には塩酸ゲムシタピンを中心とした化学療法が適応されるが、その効果は限定的であり、生存期間中央値は 7-9 カ月と依然として予後不良である。そのため現行に加え新たな治療の開発が期待されている。近年、栄養飢餓により強く誘導され細胞内成分のリサイクルを担うオートファジーについて癌研究でも大きな注目が集まっており、膵癌治療においても有望な治療ターゲットとして捉えられ始めている。オートファジーは、ミトコンドリアなどのオルガネラの新陳代謝やタンパク質、脂質、核酸といった生体高分子の分解を担う細胞内大規模分解系であり、細胞内の栄養供給や恒常性維持に重要な役割を果たしており、全ての真核細胞で保存される根源的な機構である。実際に膵癌細胞などの癌細胞においてはオートファジーが亢進していることが示されており、悪性度に関与することが示されている。さらに、抗癌剤によってストレス環境に晒された細胞内においても細胞内環境の維持のためオートファジーが重要な役割を担い、治療抵抗性に関与することや、オートファジー抑制による抗腫瘍効果も報告され始めている。従って、オートファジーの抑制は現行の化学療法の効果を高めると考えられる一方で、オートファジーは極めて重要な生理的役割を担っているため、現象そのものの完全な抑制は多大な副作用をもたらすと考えられ、現実の治療とするためには新たな視点が必要である。

そこで本研究では、オートファジーの実態が多様な加水分解酵素を内包する細胞内小器官であるライソゾームに依存した分解系であることに着目し、ライソゾーム内の特定の酵素を制御することでオートファジーの抑制を誘導し抗がん剤の治療効果を高める方法を着想した。ライソゾーム機能の低下とオートファジー効率の低下との関係は、ゴーシェ病やファブリー病をはじめとする種々の先天性のライソゾーム酵素欠損症で詳細に解析されており、基本的には 1 種類の酵素活性を低下させるだけでオートファジーの抑制を引き起こすことができる。さらに、一部のライソゾーム酵素については臨床で使用可能な組換え酵素製剤が存在しており、これらを使用することでライソゾーム酵素の抑制による副作用のコントロールが可能である。申請者らが行った予備的検討では、塩酸ゲムシタピンを投与した膵癌細胞 PANC-1 においてオートファジー関連遺伝子と共に酸性 グルコシダーゼ (GAA) や ガラクトシダーゼ A (GLA) などの様々なライソゾーム酵素の発現増加や、酵素活性の上昇を確認しており、本研究の実現可能性は非常に高いと考えられる。これまでの膵臓癌治療研究にはこのような視点からのアプローチはなく、本研究は全く新たな治療戦略を提唱する研究である。

2. 研究の目的

- 1) 抗癌剤耐性を示す複数の膵臓癌株化細胞に対し塩酸ゲムシタピンを投与し、マイクロアレイ解析により、各細胞に共通して遺伝子発現が増強するライソゾーム酵素を明らかにする。
- 2) 上記膵臓癌細胞に対し siRNA を用いてライソゾーム酵素を網羅的にノックダウンし、抗癌剤投与で細胞株に共通して増殖性に生じたライソゾーム酵素を明らかにする。
- 3) 1)と 2)の解析結果で共通した酵素についてノックダウンした際のライソゾームやオートファジー機能への影響を解析し、抗癌剤投与によるアポトーシスの変化について生化学的および形態学的に明らかにする。
- 4) 3)で標的としての有用性が確認された酵素遺伝子に対する shRNA を搭載したアデノウイルスベクターを作製し、同ベクターによるノックダウン効果を 3)の観点で評価すると共に、その作用に拮抗する組換え酵素タンパク質濃度を検討する。

- 5) 異種同所性膵臓癌担癌マウスを作成し、塩酸ゲムシタピン投与に加えて腫瘍に対して上記ウイルスベクターを局注することで腫瘍発育の抑制増強や生存率の延長について評価する。摘出した腫瘍については3)の観点で評価を行い、動物モデルへの有効性を明らかにする。
- 6) 上記マウスにおける副作用解析として肝臓についても3)の観点で評価を行い、副作用が認められた場合、4)で決定した濃度をもとに組換え酵素を用いた酵素補充療法による副作用の軽減と腫瘍に対する影響を明らかにする。

3. 研究の方法

抗癌剤投与膵臓癌細胞を対象にマイクロアレイ解析及び siRNA によるライソゾーム酵素遺伝子の網羅的ノックダウン（55 遺伝子）を行い、抗癌剤耐性に寄与する遺伝子を同定する。

同定した遺伝子に対する shRNA 搭載ウイルスベクターを作成し、培養細胞に投与することで、ノックダウンの影響を生化学的、形態学的に評価する、また、組換えライソゾーム酵素の投与を行い、ノックダウンの影響に拮抗する濃度を決定する。

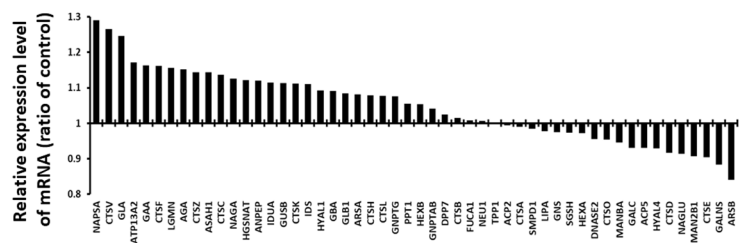
膵臓癌担癌マウスを作成し、ウイルスベクターによるライソゾーム酵素遺伝子ノックダウンと抗癌剤の併用効果を解析する。

4. 研究成果

(1) 塩酸ゲムシタピン投与によるマイクロアレイ解析

抗癌剤耐性を示す膵臓癌細胞株に塩酸ゲムシタピンを投与し、ライソゾーム酵素群を含めたマイクロアレイ解析を行った（図1）。

解析結果では糖、脂質代謝に関するライソゾーム群の発現上昇を認めた。当該酵素群の中から酸性グルコシダーゼ（GAA）を標的として解析を行った。



(2) 塩酸ゲムシタピン投与による GAA 活性の変化

膵臓癌細胞株（PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, BxPC-3）に塩酸ゲムシタピンを投与し、GAA タンパク発現および酵素活性が抗癌剤濃度依存的、時間依存的に上昇した。

(3) GAA 阻害による細胞増殖抑制効果、細胞死誘導

siRNA を用いて膵臓癌細胞株の GAA 発現をノックダウンし、細胞増殖効果および細胞死誘導効果を検証した。全ての細胞株において、GAA ノックダウンにより細胞増殖抑制効果が認められた。同様に cleave caspase-3, -8, cleaved PARP などのアポトーシスシグナルの増強を認め、細胞死誘導された。これらは塩酸ゲムシタピン投与による上乗せ効果も認められた。

(4) ミトコンドリア形態変化および膜電位低下

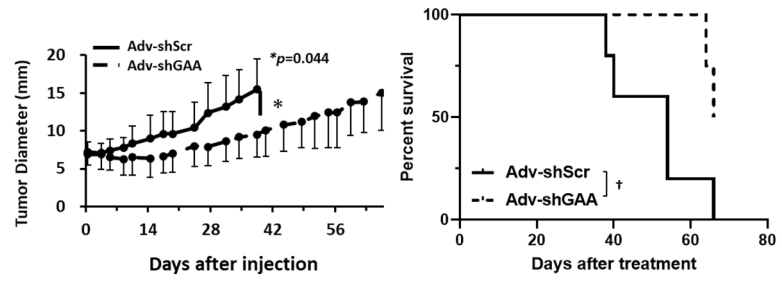
GAA 発現をノックダウンして細胞内を電子顕微鏡で観察すると、著明に腫大したミトコンドリアの蓄積を認めた。フローサイトメトリーでも同様にミトコンドリア数の上昇を認めた。その一方でミトコンドリア膜電位は著明に低下していた。以上より、蓄積したミトコンドリアは異常なミトコンドリアでありアポトーシスの原因と考えられた。

(5) マイトファジー、ライソゾーム解析

免疫染色を行い、マイトファジーが低下していることを明らかにした。以上より、異常ミトコンドリアの蓄積はマイトファジー低下によるものであることが明らかとなった。GAA 阻害によりライソゾーム機能の低下が起こり、マイトファジー機構を障害し異常ミトコンドリアが蓄積したことにより、細胞内環境を悪化させ細胞死に誘導したと考察した。

(6) アデノウイルスベクターによる動物実験

shGAA を搭載したアデノウイルスベクターを搭載し、膵臓癌皮下腫瘍モデルに対して治療を行った。腫瘍増殖抑制効果および生存率の上昇を認められた(図2)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hamura R, Shirai Y, Saito N, Taniai T, Shimada Y, Horiuchi T, Sugano H, Takada N, Kanegae Y, Ohashi T, Yanaga K.
2. 発表標題 Inhibition of lysosomal enzyme activity enhances antitumor effect of gemcitabine in pancreatic cancer cells.
3. 学会等名 14th Annual Academic Surgical Congress (ASC) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hamura R, Shirai Y, Saito N, Taniai T, Shimada Y, Horiuchi T, Sugano H, Takada N, Kanegae Y, Ohashi T, Yanaga K
2. 発表標題 Suppression of lysosomal enzyme improves chemoresistance in pancreatic cancer cells.
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 羽村凌雅, 矢永勝彦, 白井祥睦, 谷合 智彦, 斉藤庸博, 嶋田洋太, 堀内 堯, 菅野 宏, 高田直樹, 鐘ヶ江裕美, 大橋十也, 大木隆生.
2. 発表標題 抗癌剤耐性膵癌におけるライソソーム酵素の機能解析と遺伝子制御による塩酸ゲムシタピンの抗腫瘍効果増強の試み
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryoga Hamura, Yoshihiro Shirai, Nobuhiro Saito, Tomohiko Taniai, Yota Shimada, Takashi Horiuchi, Hiroshi Sugano, Naoki Takada, Yumi Kanegae, Toya Ohashi, Katsuhiko Yanaga
2. 発表標題 Down-regulation of acid alpha glucosidase induces antitumor effect via mitochondrial dysfunction in pancreatic cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko Taniai, Yoshihiro Shirai, Ryoga Hamura, Takashi Horiuchi, Nobuhiro Saito, Mitsuru Yanagaki, Yota Shimada, Naoki Takada, Toya Ohashi, Katsuhiko Yanaga
2. 発表標題 Inhibition of acid ceramidase enhances antitumor effect of gemcitabine on pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	羽村 凌雅 (Hamura Ryoga)	東京慈恵会医科大学 (32651)	
研究協力者	谷合 智彦 (Taniai Tomohiko)	東京慈恵会医科大学 (32651)	
研究協力者	柳垣 充 (Yanagaki Mitsuru)	東京慈恵会医科大学 (32651)	
連携研究者	嶋田 洋太 (Shimada Yohta) (20560824)	東京慈恵会医科大学・遺伝子治療研究部・助教 (32651)	
連携研究者	鐘ヶ江 裕美 (Kanegae Yumi) (80251453)	東京慈恵会医科大学・基盤研究施設・教授 (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	堀内 堯 (Horiuchi Takashi) (00838774)	東京慈恵会医科大学・外科学講座・助教 (32651)	
連携研究者	斉藤 庸博 (Saito Nobuhiro) (80742775)	東京慈恵会医科大学・外科学講座・助教 (32651)	
連携研究者	坪井 一人 (Tsuboi Kazuhito) (80346642)	川崎医科大学・薬理学講座・講師 (35303)	
連携研究者	岡本 安雄 (Okamoto Yasuo) (80293877)	川崎医科大学・薬理学講座・教授 (35303)	