

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02880

研究課題名(和文) 膵星細胞活性化におけるオートファジーを標的としたHIT化合物の同定とその評価

研究課題名(英文) Drug screening targeting pancreatic stellate cell activation

研究代表者

仲田 興平 (NAKATA, Kohei)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30419569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌組織の間質に存在する膵星細胞(PSC)は活性化することにより膵癌細胞との癌間質相互作用を介して癌細胞の増殖、転移、浸潤を促す。PSCの活性化メカニズムに関してはPSC内のオートファジーを抑制するとPSCの活性化が抑制され、膵癌細胞の転移、浸潤が抑制されることを以前に報告した。本研究では、膵星細胞の活性化メカニズムに基づく独自のスクリーニングシステムを作成し、化合物スクリーニングを行った。この中で候補化合物を選定し、得られた化合物が膵星細胞の活性化を抑制し、マウスモデルにおいて腫瘍の増殖を阻害することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた候補化合物は、今後膵癌の間質標的治療の新しい候補化合物となりうる可能性が示唆された。また本研究で開発したスクリーニングシステムは、膵星細胞の活性化抑制剤の開発のみならず、オートファジー抑制剤の同定にも応用可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to discover the new compound targeting for pancreatic cancer microenvironment. We developed new high-throughput screening platform that can quantify PSC activation. Drug library containing FDA approved drugs was screened by this platform, and candidate compounds selected from this screening suppressed the PSCs activation, and invasion of cancer cells by disrupting tumor-stromal interactions. In vivo testing in xenograft models showed that candidate compound suppressed tumor growth; this suppression was significantly increased when combined with gemcitabine. This screening system may be useful to discover new compounds that attenuate PSC activation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 膵星細胞 癌間質相互作用 オートファジー 化合物スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

膵癌の5年生存率は5%と低く、新規膵癌治療法の確立は社会的急務である。高い浸潤・転移能と治療抵抗性が膵癌の難治性に寄与するが、従来の腫瘍細胞のみを対象とした研究からは革新的な治療法の開発に至らず、現在、癌微小環境を含めた研究・治療戦略を立案する視点が重要となっている。

膵癌の病理学的特徴として豊富な細胞外基質を伴う間質増生 (desmoplasia) があり、癌細胞からの刺激で活性化された膵星細胞 (pancreatic stellate cells: PSCs) によって形成される (Bachem, Gastroenterology, 2005)。PSC は活性化することにより膵癌細胞との癌間質相互作用を介して癌細胞の増殖、転移、浸潤を促す。これまでに、抗線維化薬である Pirfenidone が PSC の活性化を抑制すること (Kozono, Cancer Research, 2013)、また PSC 内のオートファジーを抑制すると PSC の活性が抑制され、その結果、膵癌細胞の転移、浸潤が抑制されることを報告した (Endo, Gastroenterology, 2017)。膵癌において間質を標的とした治療は①乏血管性の微小環境を改善し既存の薬剤到達効率を高めることで抗腫瘍効果を高める②星細胞活性化抑制により癌間質相互作用の抑制から癌細胞の進展を抑えることが出来ると考えられている。膵癌に対する間質標的治療の臨床応用への期待は高く、多数の臨床試験が進行しているが、未だ有効性を示すことのできた化合物は存在しない。そこで、疾患の改善に直結する PSC のもつ表現系を利用した化合物スクリーニングシステムを開発し、創薬候補となる化合物を多数の化合物から選定し、効果を検討していくことで、停滞している新規膵癌治療の開発を進めることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、PSC の活性化を定量するスクリーニングシステムを開発し、多数の化合物の中から PSC の活性化を抑制し、膵癌の増殖を抑制する化合物を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

膵星細胞は炎症組織や癌組織内では刺激を受けて静止状態から活性状態に移行しているが、この際、活性状態に応じて変化する表現系を利用したスクリーニングシステムを作成する。作成したスクリーニングシステムを用いてハイスループットスクリーニングを行い、候補化合物の選択、評価を行う。候補化合物の評価は *in vitro* においてこれまで報告された PSC 活性化の際の細胞形態や分泌因子などの発現を以て評価する。さらに、マウス同所移植モデルを使用し、単剤及び既存抗癌剤との併用での腫瘍縮小・転移抑制効果を検討する。

4. 研究成果

1. 膵星細胞の樹立及び不死化星細胞の作製

膵癌患者より得られる手術切除標本を用いて、Bachem や Apte らにより報告された方法によりヒト膵星細胞株を 20 株以上作成した (Bachem, Gastroenterology, 1998、Apte, Gut, 1998)。作成された細胞株は、膵星細胞の特徴とされる Myofibroblast 様の形態を呈し、 α -SMA, CD90 が陽性であることを確認した。

2. 化合物スクリーニングシステムの作成

膵星細胞の活性化を定量化した化合物スクリーニングシステムを作成することとした。活性化星細胞に対してオートファジー抑制剤であるクロロキンを添加し、得られた表現系の変化をイメージングサイトメーターで定量化することで、ハイスループットスクリーニングに使用可能な評価系を作成した。

3. スクリーニングによる星細胞活性化抑制を誘導する化合物の同定

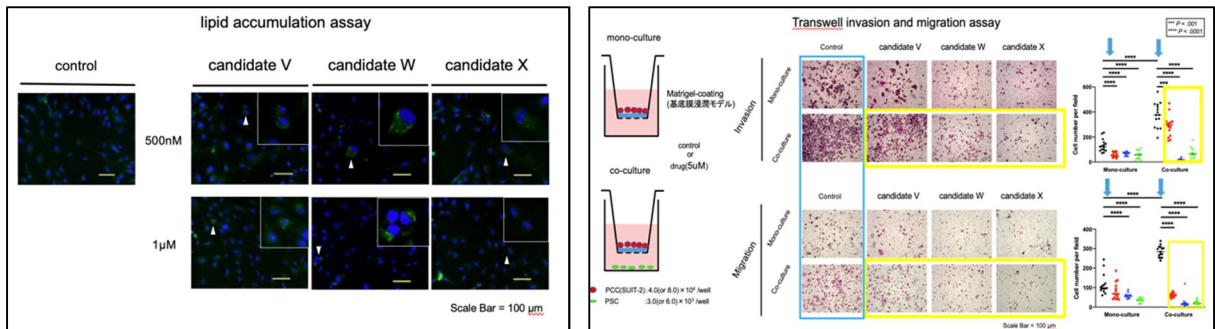
九州大学化合物ライブラリー創薬先端研究・教育基盤センターの支援をいただき、東京大学創薬オープンイノベーションセンターが保有する化合物ライブラリーを使用して PSC 活性化を抑制する化合物のスクリーニングを行った。得られた化合物のうち再現性が高く低濃度でも効果のある化合物を HIT 化合物として選択した。

4. スクリーニングで同定した HIT 化合物 X による PSC 活性化抑制の確認

スクリーニングで同定された HIT 化合物 X を PSC に投与し、PSC の活性化が抑制され

るかの validation assay を行った。PSC 活性化抑制の指標としては、Bodipy による脂肪滴の蓄積、さらには Western blot、蛍光免疫染色による活性化マーカー α SMA 発現の確認を行った。さらに、化合物を投与した際に PSC の遊走能が低下することを確認した。(下左図)

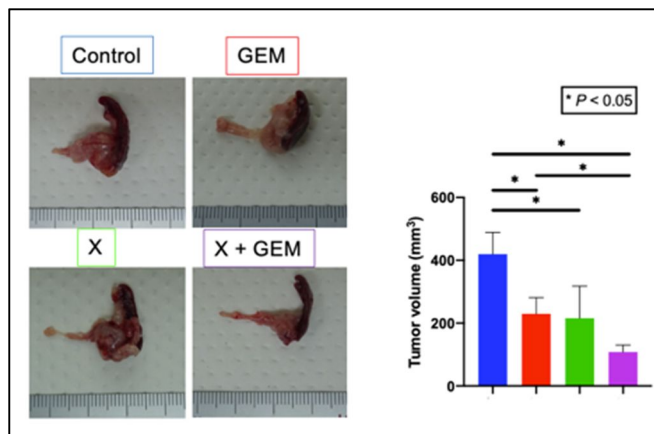
また、癌細胞と PSC の共培養モデルを作成し、これに化合物を投与し培養したところ、癌細胞の浸潤・遊走が優位に抑制された。化合物を投与して培養した PSC からの上清では、細胞外基質であるフィブロネクチン・コラーゲンの発現や、炎症性サイトカイン IL-6、さらに癌間質相互作用に関係する遺伝子群の発現が有意に抑制されていた。以上より、HIT 化合物は PSC の活性化を抑制し、癌間質相互作用を抑制することで、癌細胞の浸潤や遊走を抑制しうることが示唆された。(下右図)



5. マウスモデルを用いた治療実験

HIT 化合物 X と抗癌剤を腭同所移植マウスモデルに投与したところ、腫瘍の増殖は抑制された。組織学的検討では、癌細胞の増殖、及び線維性間質 desmoplastic marker の発現は有意に減少した。

また、既存薬の効果を高める取り組みとして、ナノ粒子製剤中に既存薬で PSC 活性化抑制剤である chloroquine を封入し、マウスモデルでの治療実験を行ったところ、既報の必要量よりも低濃度で同等の腫瘍抑制効果を認めた。また、候補化合物のうち検討を行っていなかった他の薬剤についても validation を行い、候補となる化合物を複数同定している(論文作成中)。



以上より、当研究では腭星細胞の活性化に着目したスクリーニングシステムを作成した。このシステムを使用した化合物スクリーニングで得られた候補化合物は、PSC の活性化を抑制し、マウスモデルにおいて腭癌の増殖を抑制することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sagara Akiko, Nakata Kohei, Yamashita Tomohiro, Guan Weiyu, Zhong Pingshan, Matsumoto Sokichi, Endo Sho, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Moriyama Taiki, Ohuchida Kenoki, Mizumoto Kazuhiro, Nakamura Masafumi	4. 巻 -
2. 論文標題 New high-throughput screening detects compounds that suppress pancreatic stellate cell activation and attenuate pancreatic cancer growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pan.2021.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okumura T, Ohuchida K, Kibe S, Iwamoto C, Ando Y, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Koikawa K, Sada M, Horioka K, Mochidome N, Arita M, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M	4. 巻 144
2. 論文標題 Adipose tissue-derived stromal cells are sources of cancer-associated fibroblasts and enhance tumor progression by dense collagen matrix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1401 ~ 1413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.31775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 松本奏吉、仲田興平、関維雨、相良亜希子、池永直樹、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 ナノ粒子DDSを用いた新規膵星細胞活性化抑制剤の開発
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相良亜希子、仲田興平、山下智大、関維雨、松本奏吉、伊達聡美、池永直樹、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 膵癌微小環境の制御に着目した新規膵癌治療薬剤の探索
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Matsumoto S, Nakata K, Ikenaga N, Date S, Guan W, Sagara A, Ohuchida K, Ohtsuka T, Nakamura M
2 . 発表標題 Efficient Targeted Therapy for Pancreatic Cancer Using Nanosystem and Focusing on the Suppression of Pancreatic Stellate Cell Activation
3 . 学会等名 14th World Congress of International Hepeto-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Sagara A, Nakata K, Yamashita T, Guan W, Matsumoto S, Date S, Ohtsubo Y, Shinkawa T, Kimura R, Fujii A, Ando Y, Iwamoto C, Watanabe Y, Shindo K, Ikenaga N, Moriyama T, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2 . 発表標題 Repositioning of Duloxetine as a New Drug for Targeting Pancreatic Cancer Microenvironment
3 . 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Guan W, Nakata K, Ohuchida K, Sagara A, Endo S, Ando Y, Yan Z, Matsumoto S, Shinkawa T, Ohtsubo Y, Iwamoto C, Moriyama T, Ikenaga N, Shindo K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2 . 発表標題 A Novel Target That Required for Autophagy, Associated With Activation of Pancreatic Stellate Cells, Promotes Pancreatic Cancer Progression
3 . 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sagara A, Nakata K, Yamashita T, Matsumoto S, Ohtsubo Y, Shinkawa T, Shindo K, Moriyama T, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2 . 発表標題 A new investigation of drug repurposing using for duloxetine as targeting pancreatic cancer microenvironment
3 . 学会等名 Digestive Disease Week 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Sagara A, Nakata K, Endo S, Matsumoto S, Ohtsubo Y, Shinkawa Tomohiko S, Shindo K, Moriyama T, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2. 発表標題 AUTOPHAGY INHIBITION ENHANCES ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF SALINOMYCIN IN PANCREATIC CANCER CELLS
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相良亜希子、仲田興平、山下智大、松本奏吉、大坪慶志輝、新川智彦、安藤陽平、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 膵癌微小環境の制御に着目した既存薬剤を用いた膵癌治療の新たな展開
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相良亜希子、仲田興平、遠藤翔、大坪慶志輝、新川智彦、松本奏吉、米永晃子、安藤陽平、岐部晋、中山宏道、武居晋、進藤幸治、森山大樹、大内田研宙、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 膵癌細胞のオートファジー抑制は、サリノマイシンによる増殖抑制効果を増強する
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 Koikawa K, Ohuchida K, Yonenaga A, Sagara A, Ando Y, Kibe S, Takesue S, Nakayama H, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2. 発表標題 Endo180 Expression and Histologic Categorization in Cancer Stroma is an Independent Prognostic Index in Pancreatic Cancer.
3. 学会等名 49th Annual Meeting of the APA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相良亜希子、仲田興平、遠藤翔、米永晃子、安藤陽平、岐部晋、中山宏道、武居晋、進藤幸治、森山大樹、宮坂義浩、大内田研宙、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 オートファジー抑制は、サリノマイシンによる膀胱細胞増殖抑制効果を増強する
3. 学会等名 第49回日本膀胱学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 オートファジー阻害剤及び抗癌剤	発明者 仲田興平	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-178556	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	宮坂 義浩 (MIYASAKA Yoshihiro) (40507795)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	森 泰寿 (MORI Yasuhisa) (50632642)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	進藤 幸治 (SHINDO Koji) (00788432)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	池永 直樹 (IKENAGA Naoki) (90759755)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	貞茹 良彦 (SADAKARI Yoshihiko) (80784503)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関