

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18153

研究課題名（和文）SIRT媒介性オートファジー制御がもたらす膵癌間質リモデリング機構の制御

研究課題名（英文）Control of pancreatic cancer stromal remodeling mechanism brought about by the suppression of SIRT-mediated autophagy.

研究代表者

遠藤 翔（ENDO, Sho）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20801749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：当初我々はオートファジーの活性化に老化・ストレス耐性及び代謝を司るsirtuinが関与しているとの仮説を考えた。しかし、膵星細胞のオートファジー活性化に関与する遺伝子群をマイクロアレイで網羅的に探索したところ、小胞体関連遺伝子がよりオートファジー活性に関わっていると考えられたため、これらの遺伝子を対象に、オートファジーを介して癌間質相互作用に関わる影響を検証した。その結果、小胞体関連遺伝子をノックダウンした際に、有意にオートファジーの抑制を介して膵星細胞の活性化を抑制することを発見した。小胞体関連遺伝子が膵癌において、癌間質相互作用を標的とした治療の新たなターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の微小環境において中心的な役割を果たしている膵星細胞は、その活性化を抑制し休眠状態（Quiescent 状態）へと誘導することが膵癌細胞の悪性を抑制すると考えられているが、これまでに、膵星細胞をQuiescent 状態にする有効な方法は見つかっていない。本研究では、オートファジーにおける隔離膜形成の起源でもある小胞体に関連する遺伝子群が、オートファジーを介して膵星細胞の活性化に関与していることを明らかにした。小胞体関連遺伝子が膵癌において、癌間質相互作用を標的とした治療の新たなターゲットとなる可能性が示唆され、停滞を続ける膵癌治療において新たなブレイクスルーとなると期待される。

研究成果の概要（英文）：At first, we hypothesized that sirtuin, which controls aging stress tolerance and metabolism, was involved in the activation of autophagy. However, when we comprehensively searched for genes involved in autophagy activation of pancreatic stellate cells using a microarray, it was thought that endoplasmic reticulum-related genes were more related with autophagy activity. We examined the effects of cancer interstitial interactions via autophagy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 膵星細胞 オートファジー 癌間質相互作用 癌関連線維芽細胞 間質リモデリング 小胞体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究で、我々は膵星細胞との相互作用が膵癌の悪性を増加させることを報告し、膵星細胞の活性化を減弱させることが膵癌の有望な治療法となる可能性に関して以前から示唆してきた。しかし癌関連線維芽細胞や癌間質を治療標的とすることは逆に癌細胞の悪性を高めるとの報告があり (Cancer Cell 2014, Ozdemir et al.), 膵癌における間質の役割についてのさらなる解明が必要である。我々は、膵癌微小環境中における主要な間質細胞である膵星細胞のオートファジーの役割を解明し、膵星細胞の活性化にはオートファジーが必要であることを報告した (Gastroenterology, 2017, Endo et al.) しかしながら、オートファジーがどのような機序で膵星細胞の活性化を誘導するのか、その詳細な機序は未だに不明な点が多い。今回我々は、膵星細胞のオートファジー活性化メカニズムを解明する事が膵癌制御のブレークスルーにつながると考え、そのメカニズム解明に老化・代謝などヒトの多様な生命活動に参与している sirtuin の活性の制御に着目し、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

豊富な間質細胞および細胞外基質による癌間質相互作用は膵癌の特徴の一つであり、膵癌の浸潤・転移及び治療抵抗性に関与する因子として注目が集まっている。我々は以前より、膵癌の微小環境で中心的な役割を果たしている膵星細胞に着目しており、2017年には膵星細胞の活性化にオートファジーが関与していることを報告した。しかし、オートファジーが膵星細胞の活性化を誘導する詳細な機序は未だ解明されていない。今回我々はオートファジーを介した膵星細胞の活性化に、様々なタンパクの発現を制御し生物の生体内環境の調整を行う sirtuin が関与しているかという問いをたてた。オートファジーを介した膵星細胞の活性化の機序を解明することで、膵癌において、癌間質相互作用を標的とした新規治療を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

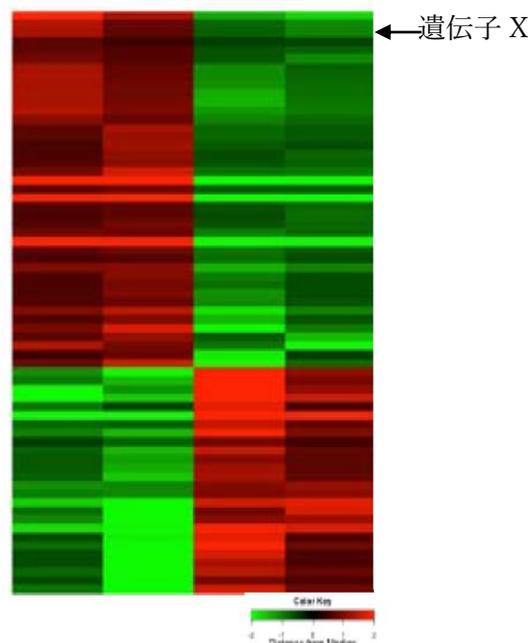
当初は sirtuin のみを標的遺伝子として考え、オートファジーを介して活性化状態にある膵星細胞と、オートファジー活性が低く静止化状態にある膵星細胞の両方の細胞株をヒト手術検体から樹立した。これらをマイクロアレイに提出して遺伝子発現を比較することで膵星細胞におけるオートファジーを介した活性化に関与する遺伝子の網羅的解析を行うこととした。

- ① マイクロアレイによる膵星細胞の活性化に関わる遺伝子群の網羅的解析
- ② 同定遺伝子のノックダウン実験
- ③ 遺伝子をノックダウンした際の In vitro での遊走能、浸潤能の評価
- ④ In vivo での腫瘍形成能の評価

4. 研究成果

① マイクロアレイによる膵星細胞の活性化に関わる遺伝子群の網羅的解析

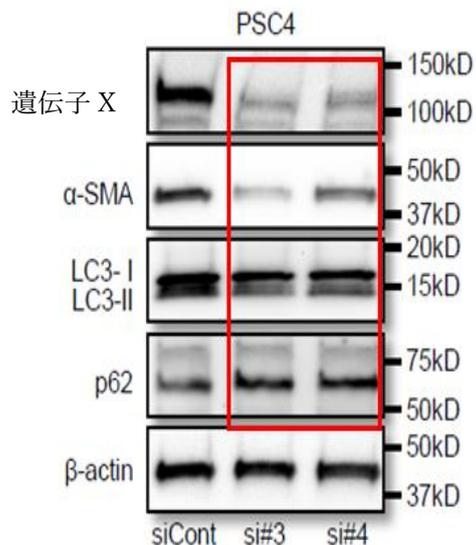
オートファジーを介して活性化状態にある膵星細胞と、オートファジー活性が低く静止化状態にある膵星細胞をヒト手術検体から樹立し、マイクロアレイによる mRNA 発現解析を行った。その結果、活性化膵星細胞では有意に小胞体関連遺伝子群の発現が上昇していた。



② 同定遺伝子のノックダウン実験

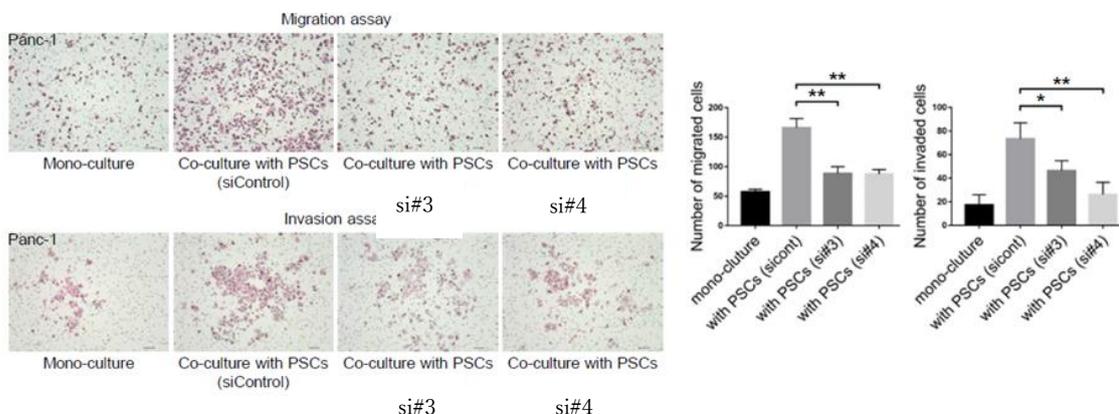
マイクロアレイの結果から得られた上位遺伝子群をターゲットとし、それらを siRNA を用いてノックダウンした際の PSC の活性化、オートファジーの活性化を評価した。PSC の活性化については α -SMA や細胞外基質の発現、IL6 などの炎症性サイトカインの発現を WB で評価し、さらに脂肪滴の蛍光染色も行って活性化を評価し

た。オートファジーの活性化については、オートファジーマーカーである LC3, p62 の発現を WB で評価した。これらの結果、小胞体関連遺伝子の一つである遺伝子 X をノックダウンした際に、最も優位に PSC の活性化を抑制し、さらにオートファジーも抑制されることが分かった。BODIPY を用いた脂肪滴染色、蛍光免疫染色でも、同様に PSC の静止化とオートファジーの抑制を確認することができた。



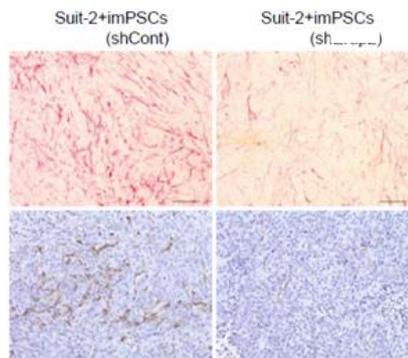
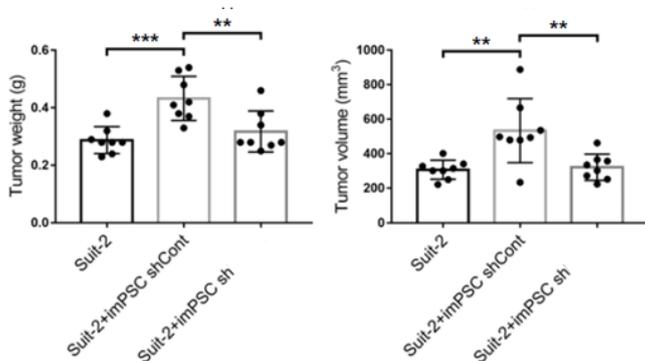
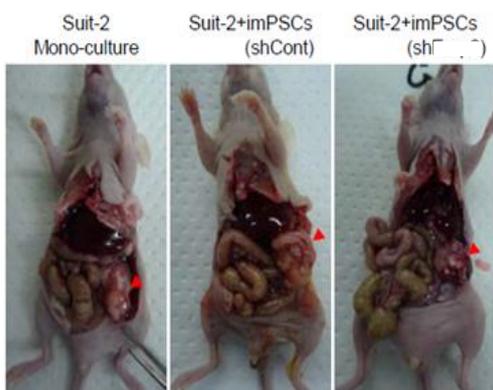
② In vitro での遊走能、浸潤能の評価

小胞体関連遺伝子をノックダウンした際の PSC の静止化とオートファジーの抑制が、癌細胞に与える影響を in vitro で評価した。ヒト手術検体から樹立した PSC と膵癌細胞株を共培養すると、癌細胞の浸潤能・遊走能は有意に促進した。しかし、遺伝子 X をノックダウンした PSC と癌細胞を共培養したところ、コントロール群と比較して有意に癌細胞の浸潤能・遊走能を抑制した。



③ In vivo での腫瘍形成能の評価

ヒト手術検体から樹立した PSC において、小胞体関連遺伝子の一つである遺伝子 X を、レトロウイルスを用いた shRNA 導入によりノックダウンした細胞株を樹立した。遺伝子 X ノックダウン PSC とコントロール PSC を、それぞれ膵癌細胞と共に、ヌードマウスの膵臓に共移植して腫瘍形成能の比較を行った。その結果、遺伝子 X ノックダウン PSC と共移植した膵同所移植マウスでは、コントロールの PSC と共移植したマウスと比較して有意に腫瘍縮小効果を認めた。さらに、形成された腫瘍各々に対し sirius red、α-SMA の免疫染色を行い、腫瘍間質の形成を比較したところ、遺伝子 X ノックダウン群では有意に間質形成が抑制されていた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 小山虹輝, 仲田興平, 相良亜希子, 山下智大, 池永直樹, 松本奏吉, 新川智彦, 林昌孝, 大内田研宙, 中村雅史
2. 発表標題 膵星細胞に着目した膵癌治療の新たな展開
3. 学会等名 第57回九州外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相良亜希子, 仲田興平, 鐘坪杉, 池永直樹, 大内田研宙, 水元一博, 中村雅史
2. 発表標題 抗ヒスタミン薬Azelastineは膵星細胞の活性化を抑制する
3. 学会等名 第57回九州外科学会
4. 発表年 2021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

〔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

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