

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20599013

研究課題名 (和文) 消化器癌におけるオートファジーの機能解析と治療への応用

研究課題名 (英文) Analysis of autophagy in cancer and new strategies for cancer therapy.

## 研究代表者

橋本 大輔 (HASHIMOTO DAISUKE)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：80508507

研究成果の概要 (和文)：膵癌細胞株におけるオートファジーの誘導について解析した。膵癌細胞株に抗癌剤 (5FU, CDDP, SN-38) を投与したり、放射線照射を行うと、オートファジーが誘導された。またオートファジーに必須の遺伝子である Atg5 に対する siRNA を用いて膵癌細胞株のオートファジーを抑制すると、抗癌剤の殺細胞効果が増強された。つまり、癌細胞がオートファジーを通じて抗癌剤というストレスに適応し細胞内の恒常性を維持しようとしている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Autophagy was induced in pancreatic cancer cell line by anticancer agents and irradiation. Suppression of autophagy resulted in the augmentation of anticancer drug-induced cell death. This result suggested that autophagy might have the cytoprotective effect on anticancer drug-induced cell death in pancreatic cancer cell.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	0	1,500,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：オートファジー、消化器癌の発生、消化器癌の発育、補助療法

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) オートファジーについて

オートファジーとは、細胞が自身をリソソームで分解する系の総称である。酵母から哺乳類にいたるまで幅広く全身の細胞で保存されているシステムである。オートファジーは細胞内での異常なタンパク質の蓄積を防いだり、栄養飢餓時に細胞内コンポーネントのリサイクルを行なうことで生体の恒常性維持に関与している (図1) (Mizushima N et

al. Molecular Biology of the Cell 2004, 15, 1101-1111)。オートファゴソーム関連蛋白であるmicrotubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)にGFPを融合したキメラ蛋白を全身で発現するトランスジェニックマウスでは、24時間の絶食後に肝、骨格筋、心筋、膵などほとんどすべての臓器でオートファジーの誘導が確認される (Mizushima N et al. Molecular Biology of the Cell 2004, 15, 1101-1111)。

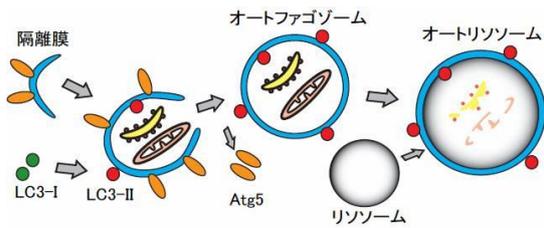


図1 オートファジーの模式図

(2) オートファジーと癌

発癌、癌の発育とオートファジーについて近年さまざまな報告がなされているが、その役割についてはいまだはっきりとした結論に至っていない (Levine B. Nature 2007, 446, 745-757)。オートファジーが癌の発育を促している可能性も考えられる。飢餓適応はオートファジーの重要な機能のひとつである。癌が血流が少なく、十分な栄養供給の無い状態で発育する時、癌細胞がオートファジーにより様々なストレスに適応出来るかもしれない。癌がオートファジーによって抗癌剤への耐性を獲得している可能性もある。逆に、抗癌剤により癌細胞にオートファジーによる細胞死が誘導されている可能性がある。つまり、抗癌剤の実際の作用機序のひとつがオートファジーである可能性である。しかしこの議論には決着がついていない(図2)。

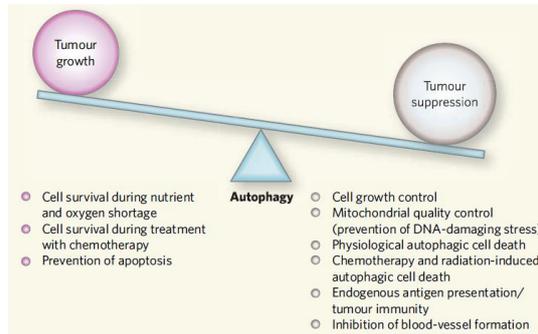


図2 癌に対するオートファジーの相反する作用 (Levine B. Nature 2007, 446, 745-757)

2. 研究の目的

我々は癌におけるオートファジーの意義を明らかにすることを目的として研究を行った。具体的には、膵癌細胞株を用いて通常培養条件下や抗癌剤投与におけるオートファジーの役割を検証した。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

膵癌細胞株、PANC-1 および MiaPaCa-2 を用いた。抗癌剤は 5-FU、CDDP、SN38 を用いた。オートファジーを抑制するために、オートファジーに必須の遺伝子である Atg5 に対する siRNA (small interfering RNA) を作成し用いた。

(2) 実験方法

オートファジーの発現の程度を解析するため、Atg5 に対する RT-PCR、抗 LC3 抗体を用いたウェスタンブロッティング、電子顕微鏡による解析を行った。細胞増殖能を検証するため MTT assay をおこなった。

4. 研究成果

(1) 生理的条件下のオートファジー

PANC-1 細胞を用いて通常培養条件下でのウェスタンブロッティングを行ったところ、LC3 の発現を認めた。つまり通常条件下でオートファジーがある程度誘導されていた。

(2) 抗癌剤投与時のオートファジー

PANC-1 に 5-FU、CDDP、SN38 を投与し電子顕微鏡で解析した。細胞質内に多数のオートファゴソームを認めた(図 3)。つまり抗癌剤投与によりオートファジーが誘導された。

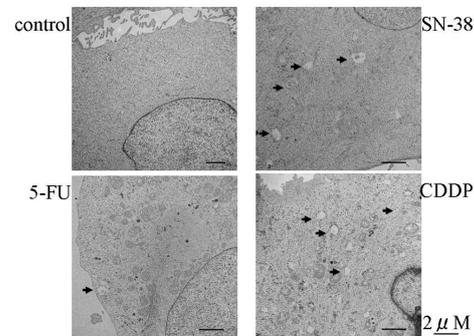


図3 抗癌剤投与時の細胞形態(PANC-1)。矢印はオートファゴソームを示す。

次に抗癌剤 5-FU、CDDP、SN38 を PANC-1 および MiaPaCa-2 を投与して抗 LC3 抗体によるウェスタンブロッティングを行った。細胞質型 LC3-I 蛋白 (18 kDa) は LC3-II (16 kDa) に変換され、オートファゴソーム膜 (内側および外側) に結合する。つまり LC3-II の (LC3-I に対する) 相対的な量がオートファゴソーム形成の程度と関連する。いずれの癌細胞においても、抗癌剤により特に LC3-II の強い発現を認めた。つまりオートファジーが強く誘導されることが示された(図 4)。

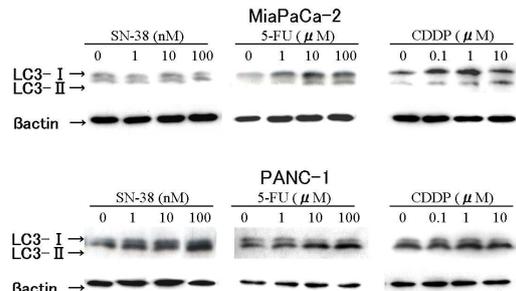


図4 抗癌剤投与時の LC3 蛋白に対するウェスタンブロッティング

### (3) オートファジーの抑制実験

抗癌剤投与時に誘導されるオートファジーを抑制するため、Atg5 に対する siRNA を作成し PANC-1 および MiaPaCa-2 に導入してオートファジーのノックダウンを行った。RT-PCR では、明らかに Atg5 の発現が抑制された(図 5A)。抗 LC3 抗体によるウェスタンブロットリングでは、生理的条件下、および抗癌剤(SN-38)投与時の LC3 の発現が明らかに抑制された(図 5B)。つまりオートファジーが抑制された。

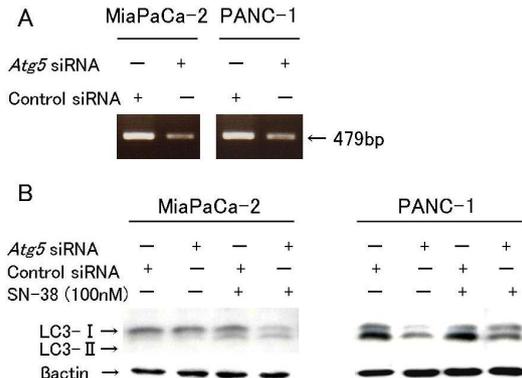


図 5 siRNA によるオートファジーの抑制実験。A: Atg5 に対する RT-PCR を示す。B: LC3 に対するウェスタンブロットリングを示す。

抗癌剤投与時、さらにオートファジー抑制時における細胞増殖能を MTT assay で解析した。いずれの癌細胞においても、Atg5 に対する siRNA でオートファジーを抑制すると、抗癌剤投与時の細胞増殖能が減少し、殺細胞効果が増強した(図 6)。つまり、抗癌剤はオートファジーに対して拮抗して働いていることが示された。

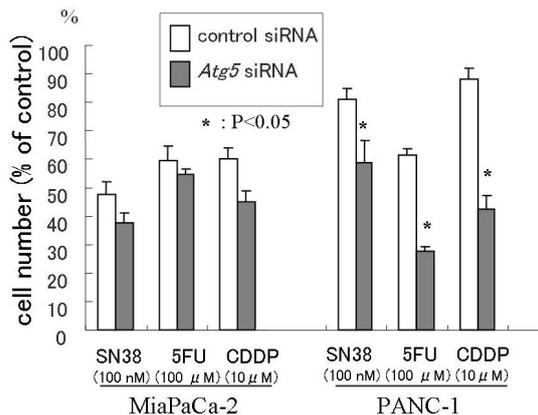


図 6 抗癌剤投与時の細胞増殖能を示す。

### (4) 考察

膵癌細胞では恒常的に、一定レベルのオートファジーが発現していた。癌は生体内で低栄養状態、低酸素状態などさまざまなストレスにさらされているはずである。そのような環境に打ち勝ち、癌が成長していく武器の 1 つが、オートファジーである可能性が示された。実際に抗癌剤を投与したときには、さら

に強いオートファジーが膵癌細胞内に誘導された。このオートファジーを抑制すると抗癌剤の殺細胞効果が増強されたため、オートファジーは抗癌剤に対して拮抗的に働いていたことがわかった。我々の解析は、オートファジーを抑制することが膵癌治療の新しい strategy となる可能性を示した。

今後は①オートファジーが抗癌剤に拮抗しているメカニズム、②マウスにおける癌とオートファジーの解析、などの解析へとすすみ、臨床応用のために有効な手段を具体的に検討していく。

### 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 16 件)

① Hashimoto D, Hirota M, Sakata K, Yagi Y, Baba, H. Adult transmesenteric hernia: Report of two cases. 査読有、Surgery Today (in press 2011)

② Hashimoto D, Kuroki H, Motomura Y, Ishikawa S, Inayoshi A, Udaka N, Tanoue T, Arita T, Hiroto M, Yagi Y, Baba H. Trichoblastic carcinoma arising from colostomy. 査読有、Am J Surg (in press 2011)

③ Hashimoto D, Hirota M, Sakata K, Hirata K, Kiyota Y, Ishikawa S, Tanoue T, Inayoshi A, Arita T, Yagi Y, Baba, H. Umbilicus Saving Three-Port Laparoscopic Cholecystectomy. 査読有、WebmedCentral LAPAROSCOPY 2011;2(4):WMC001882

④ 廣田昌彦、橋本大輔、大村谷昌樹、山村研一 急性膵炎の発症とオートファジー機構 消化器内科 査読有、52(2)、2011

⑤ Ikuta Y, Takamori H, Ikeda O, Tanaka T, Sakamoto Y, Hashimoto D, Ozaki N, Nakahara O, Furuhashi S, Abe S, Beppu T, Shimada S, Yamashita Y, Baba H. Detection of liver metastases secondary to pancreatic cancer: utility of combined helical computed tomography during arterial portography with biphasic computed tomography-assisted hepatic arteriography. 査読有、J Gastroenterol 2010 Dec;45(12):1241-1246

⑥ Hashimoto D, Takamori H, Sakamoto Y, Ikuta Y, Nakahara O, Furuhashi S, Tanaka H, Watanabe M, Beppu T, Hirota M, Baba H. Is Estimation of physiologic ability and surgical stress (E-PASS) able to predict operative morbidity after pancreaticoduodenectomy? 査読有、J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2010 Mar;17(2):132-138

- ⑦ Hashimoto D, Takamori H, Sakamoto Y, Tanaka H, Hirota M, Baba H. Can the Estimation of Physiologic Ability and Surgical Stress (E-PASS) scoring system predict operative morbidity after distal pancreatectomy? 査読有、Surgery Today 2010 Jul;40(7):632-637
- ⑧ Hashimoto D, Arita T, Kuroki H, Motomura Y, Ishikawa S, Inayoshi A, Udaka N, Tanoue T, Hiroto M, Yagi Y, Baba H. Acute afferent loop necrosis after Roux-en-Y cholangiojejunostomy. 査読有、Clin J Gastroenterol. 2010 Jun;3(3):165-167
- ⑨ Ida S, Fujiyama Y, Hirota M, Imamura Y, Ozaki N, Suyama K, Hashimoto D, Ohmuraya M, Tanaka H, Takamori H, Baba H. Significance of Endothelial Molecular Markers in the Severity Evaluation of Acute Pancreatitis. 査読有、Surg Today. 2009 Apr;39(4):314-319
- ⑩ Hashimoto D, Watanabe M, Hayashi N, Nakahara O, Hirashima K, Iyama KI, Baba H. Gastric metastasis of malignant fibrous histiocytoma diagnosed preoperatively by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy: Report of a case. 査読有、Surgery Today. 2009 Dec;39(12):1073-1075
- ⑪ Hashimoto D, Ohmuraya M, Wang J, Yamamura K, Hirota M, Baba H. Effect of low-molecular-weight trypsin inhibitor, nafamostat mesilate, on trypsin activity using the pancreatic acinar cells. 査読有、Pancreas 2009 Jul;38(5):595-597.
- ⑫ Kume S, Kubota T, Takahashi M, Hashimoto D, Hirata T, Torigoe Y, Ikeda O. A case of locally advanced rectal cancer responding to FOLFOX. 査読有、Gan To Kagaku Ryoho. 2009 Apr;36(4):659-61. Japanese.
- ⑬ 廣田昌彦, 橋本大輔, 大村谷昌樹, 馬場秀夫 急性膵炎の発症における細胞内イベント 査読有、肝・胆・膵(0389-4991) 2009; 59(2): 165-7
- ⑭ 橋本大輔, 大村谷昌樹, 広田昌彦, 高森啓史, 山村研一, 馬場秀夫 査読有、膵腺房細胞内のトリプシン活性とプロテアーゼインヒビター Surgery Frontier 16 巻1号 Page114-119 (2009.03)
- ⑮ Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, Okumura Y, Takahashi E, Kido H, Araki K, Baba H, Mizushima N, Yamamura K. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. 査読有、J Cell Biol. 2008 Jun 30;181(7):1065-72.
- ⑯ 大村谷昌樹, 広田昌彦, 橋本大輔, 馬場秀夫. 遺伝子改変マウスを用いた膵炎の発症機構の解析 査読有、膵臓(0913-0071)23

巻1号;20-24;2008

[学会発表] (計15件)

- ① 橋本大輔 膵温存3ポート腹腔鏡下胆嚢摘除術 熊本外科治療講演会 熊本市 熊本大学 2011年2月1日
- ② 橋本大輔 厚生労働科学研究(がん臨床研究)推進事業研究成果等一般向け発表会 膵癌治療の最前線-手術と化学療法- 熊本市 熊本県立劇場 2011年1月8日
- ③ 橋本大輔 人工肛門部に発生し術前に下行結腸癌と診断した、毛嚢由来の皮膚癌(trichoblastic carcinoma)の一例 第8回日本消化器外科学会大会 横浜市 パシフィコ横浜 2010年10月16日
- ④ 橋本大輔 絞扼性イレウス74例の手術経験から 第65回日本消化器外科学会総会 下関市 下関市民会館 2010年7月14日
- ⑤ Ohmuraya M Pancreatic acinar cell death pathways in acute pancreatitis. Joint meeting of the international association of pancreatology and the Japan pancreas society 2010 福岡市 福岡国際会議場 2010年7月12日
- ⑥ Ohmuraya M A mouse line expressing Spink3-driven Cre recombinase. The 42nd Meeting of the European Pancreatic Club スウェーデンストックホルム市 Clarion Sign Hotel 2010年6月18日
- ⑦ 橋本大輔 急性膵炎における栄養管理 熊本大学消化器外科学術講演会 熊本市 熊本大学 2010年4月28日
- ⑧ 橋本大輔 摂食、絶食が急性膵炎に及ぼす影響 第35回九州代謝・栄養研究会 熊本市 熊本大学 2010年3月6日
- ⑨ 橋本大輔 Can the Estimation of Physiologic Ability and Surgical Stress (E-PASS) scoring system predict operative morbidity after pancreatic resection? 40th Anniversary Joint Meeting of the American Pancreatic Association & Japan Pancreas Society ホノルル ヒルトンハワイアンビレッジ アメリカ 2009年11月6日
- ⑩ 橋本大輔 膵温存尾側膵切除に対するE-PASSスコアリングシステムを用いた術後合併症の解析 第64回日本消化器外科学会総会 ワークショップ「尾側膵切除における膵温存の適応と成績」大阪市 大阪国際会議場 2009年7月18日
- ⑪ 橋本大輔 E-PASS (Estimation of physiologic ability and surgical stress) スコアリングシステムは膵体尾部切除術後合併症の発生予測に有用である 第21回日本肝胆膵外科学会・学術集会 サージカルフォーラム 名古屋市 ウェスティンナゴヤキャッスル 2009年6

- 月 11 日
- ⑫ 橋本大輔 膵頭十二指腸切除術に対する E-PASS scoring system によるリスク評価 第 109 回日本外科学会定期学術集会 福岡市 マリンメッセ福岡 2009 年 4 月 4 日
  - ⑬ 橋本大輔 急性膵炎におけるオートファジーの誘導と食餌の影響 第 39 回日本膵臓学会大会 横浜市 パシフィコ横浜 2008 年 7 月 30 日
  - ⑭ 橋本大輔 高齢化社会における外科手術後合併症発生の抑制に対する取り組みの有用性について 第 63 回日本消化器外科学会総会 札幌市 札幌市教育文化会館 2008 年 7 月 17 日
  - ⑮ 橋本大輔 膵腺房細胞内のトリプシン活性に対する nafamostat mesilate (FUT) の抑制効果 第 108 回日本外科学会定期学術集会 長崎市 長崎新聞文化ホール 2008 年 5 月 15 日

[図書] (計 3 件)

- ① Laparoscopy-assisted distal pancreatectomy. Hirota M, Hashimoto D, Sakata K, Kuroki H, Tanaka Y, Ishiko T, Motomura Y, Ishikawa S, Kiyota Y, Arita T, Inayoshi A, Yagi Y. Laparoscopy ISBN: 978-953-307-205-0., 査読無 (in press2011) published by InTech (Australia).
- ② 廣田昌彦、大村谷昌樹、橋本大輔、馬場秀夫 急性膵炎の発症とオートファジー Annual Review 消化器、査読無、2010、p212-217
- ③ 広田昌彦、大村谷昌樹、橋本大輔、陶山浩一、市原敦史、藤村美憲、田中洋、高森啓史、馬場秀夫 急性膵炎の病態生理 新しい診断と治療の ABC 膵炎・膵癌、査読無、最新医学社 54(8) 2008 Page16-24

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 大輔 (HASHIMOTO DAISUKE)  
熊本大学・医学部附属病院・  
非常勤診療医師  
研究者番号：80508507

### (2) 研究分担者

馬場 秀夫 (BABA HIDEO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：20240905

大村谷 昌樹 (OHMURAYA MASAKI)  
熊本大学・大学院先端機構・特任助教  
研究者番号：60398229

田中 洋 (TANAKA HIROSHI)  
熊本大学・医学部附属病院・  
非常勤診療医師  
研究者番号：70452901

坂本 快郎 (SAKAMOTO YASUO)  
熊本大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：00452897  
(H20 年度のみ)

尾崎 宣之 (OZAKI NOBUYUKI)  
熊本大学・医学部附属病院・  
非常勤診療医師  
研究者番号：40551255