

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08747

研究課題名（和文）膵癌におけるヘキソサミン経路を介した化学療法誘導転移及び耐性獲得機序の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of chemotherapy-induced metastasis via the hexosamine pathway in pancreatic cancer

研究代表者

有明 恭平（Ariake, Kyohei）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：10754921

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は膵臓癌において抗癌剤治療を投与することでその発現が上昇するGFPT2の機能解析を行ったものである。マウスを用いた検討ではゲムシタピンを投与することで、残存腫瘍におけるGFPT2の発現が上昇していることが明らかとなり、細胞株を用いた検証にて、GFPT2の発現がヘキソサミン合成経路の活性化を介して細胞の移動浸潤能を亢進していることが示された。これらの結果は膵臓癌において抗癌剤による転移能の亢進というchemotherapy-induced metastasisにヘキソサミン合成経路が寄与している可能性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓癌治療において抗癌剤治療は必須である。しかしながら長期間にわたる抗癌剤治療によって、腫瘍は次第に増大するとともに、やがて多数の遠隔転移を形成するようになる。近年抗癌剤治療そのものが遠隔転移を誘導するというchemotherapy-induced metastasis(CIM)という概念が提唱されている。本研究によってCIMにGFPT2を介したヘキソサミン経路(HBP)が関与していることが示された。HBPには多数の阻害剤が開発されていることから、今後これらの薬剤を用いた新たな治療戦略の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：GEM induction upregulated GFPT2 expression. Elevated GFPT2 levels promoted invasion by activating the HBP, suggesting the potential role of this mechanism in promoting chemotherapy-induced metastasis.

研究分野：膵臓癌，外科

キーワード：CIM ヘキソサミン合成経路 GFPT2 膵臓癌 化学療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌治療では外科的切除に加え化学療法による治療が重要な役割を担っている。しかしながら抗癌剤治療は永続的な効果が得られる訳ではなく、継続投与によって耐性化が獲得され、次第にその効果は乏しくなる。この結果腫瘍は再増大をきたし新規病変が出現するといった病期の進行につながる事となる。近年、抗癌剤治療そのものが腫瘍の転移能を亢進させるという chemotherapy induced metastasis (CIM) という概念が提唱され、克服すべき課題として注目を集めている。癌細胞に対するメカニズムの一つに、抗癌剤治療に対する細胞障害への修復過程で変異をきたし、上皮間葉変換(epithelial-mesenchymal transition:EMT)が誘導されることなども報告されている。また腫瘍周囲の微小環境が変化することで炎症性サイトカインやケモカインが放出され、転移に適した環境が形成されることで、転移が誘発されることも CIM の重要なメカニズムとして報告されている。

当研究室ではこれまで膵癌における Stomatin like protein 2(SLP2)の機能解析を行い、SLP2 が細胞の移動浸潤能を制御し、肝転移形成に重要な役割を担うことを明らかにした。また SLP2 は Gemcitabine(GEM)の曝露によりその発現が上昇すること、術前化学療法施行例ではその発現量が増加していることが明らかとなった。網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、SLP2 の発現に関連する因子として Glutamine-Fructose-6-Phosphate Transaminase 2(GFPT2) が同定された。GFPT2 は、糖代謝経路において解糖系からヘキソサミン合成経路(Hexosamine Biosynthetic Pathway: HBP)への分岐に必要な律速酵素である。HBP は糖代謝の 2-5% を担っており、最終代謝産物である UDP-Acetylglucosamine が基質となり、様々なタンパク質のセリン・スレオニン残基に O-N-Acetylglucosamine(O-GlcNAc)を付加するグリコシル化を行うことで、翻訳後修飾による細胞機能の調節を担っている。近年癌と HBP との関連が報告されており、癌細胞では β -catenin や c-Myc、p53、や NF κ B がグリコシル化されることで、その活性化が促され、EMTなどを介した癌細胞の移動・浸潤能の促進や抗癌剤への耐性化を示すことが明らかにされている。膵癌においても GFPT2 のサブタイプである GFPT1 が高発現している症例では予後が不良となることが報告されているほか、GFPT1 が HBP を活性化することで β -catenin のグリコシル化を介し、膵癌細胞の悪性化を促進していることが報告され、HBP の活性化が癌悪性化のメカニズム深く関係していることが明らかになりつつある。

GFPT1 のサブタイプである GFPT2 についても近年悪性腫瘍との関連が明らかになりつつある。しかしながら膵癌についてはこれまで GFPT2 との関連についての報告はなされておらず、その役割は不明である。先行研究において我々が明らかにした GEM 刺激による GFPT2 の発現上昇は、HBP の活性化を促すことで癌の悪性化に寄与している可能性があるが、抗癌剤刺激が GFPT2 もしくは GFPT1 の発現を上昇させるといった報告は他癌腫を含めても確認されておらず、癌の悪性化メカニズム、特に CIM を解明する上で新たな知見になりうるものと推察する。

2. 研究の目的

膵癌において抗癌剤治療は非切除症例のみならず、切除可能症例に対する術前治療としても標準治療となりつつあり、ほぼ全症例に対して使用される治療法である。一方で CIM のように抗癌剤には転移を促進するという側面も出てきており、その対策は急務である。本研究の目的は膵癌において GEM による抗癌剤刺激が GFPT2 の発現量を上昇させるかを検証するとともに、GFPT2 の発現上昇が HBP の活性化を制御することで遠隔転移形成の亢進に関与するかを明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1). 細胞株を用いた機能解析

GFPT2 の発現量を調整した膵癌細胞株を作成し、GFPT2 の発現がヘキソサミン合成経路を活性化するかを評価するとともに、細胞機能に及ぼす影響について検討する。また HBP の下流においてどのようなシグナルが活性化されているかについても併せて検証する。

(2).マウス Xenograft model を用いた解析

膵癌細胞株を用いて同所移植モデルを作成し,腫瘍形成が確認されたのちにマウスに対し隔週で6回 GEM 投与を行う. GEM 投与後に残存する腫瘍を摘出し, GFPT2 の発現量を評価するとともに, そのサブタイプである GFPT1 の発現量を併せて測定する.

(3). 臨床検体を用いた検討

臨床検体を用いて, 実臨床において術前抗癌剤治療が施行された症例を対象とし, 抗癌剤非施行例と比較し GFPT2 の発現量が増加しているかについて評価する. 評価には免疫染色法を用いて行い, immunoreactivity score を算出することで GFPT2 の発現量を定量化し評価する.

4. 研究成果

GFPT2 過剰発現株及び安定発現抑制株の作成

膵癌細胞株 4 種類(PANC-1, SUIT2, BxPC3, PK1)を用いて GFPT2 の発現量を測定したところ, SUIT2 の発現量が他の細胞株に比較し有意に高値であった. 一方他の 3 種類はほぼ同等であった(Fig. 1a). この結果を考慮し, 3 種類の細胞株のうち, 先行研究での使用していた PANC1 を用いて GFPT2 の過剰発現株を作成し(Fig. 1b, c), SUIT を用いて安定発現抑制株の作成を行った(Fig. 1d, e).

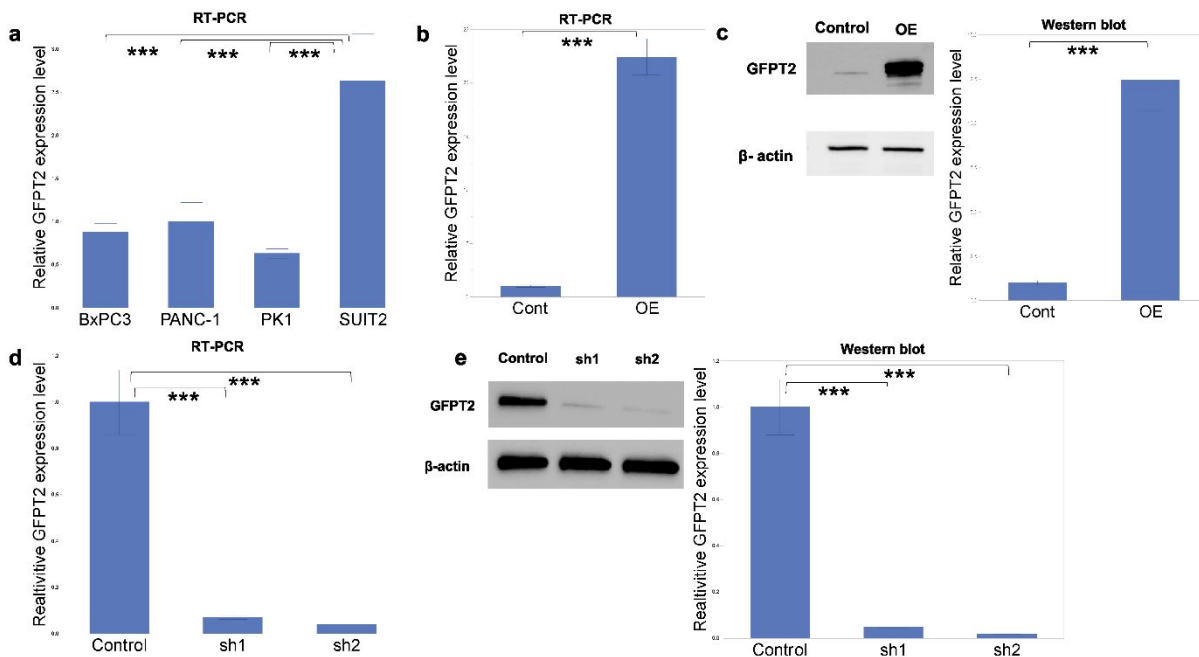


Fig. 1 GFPT2 expression in PaCa cells

GFPT2 の発現は膵癌においてもヘキソサミン合成経路の活性化を誘導する

GFPT2 の発現が膵癌細胞におけるヘキソサミン合成経路に与える影響を評価すべく, GFPT2 の発現量を調節した細胞株を用いて最終代謝産物である O-GlcNAc の発現量測定した. 結果 GFPT2 の発現量を抑制した SUIT2 細胞株では O-GlcNAc protein(OGP)の発現量が低下し(Fig. 2a), 一方で過剰発現を行った PANC-1 細胞では OGP の発現量が増加した(Fig. 2b). 以上の結果から GFPT2 の発現は膵癌において HBP の活性化に関与していることが明らかとなった.

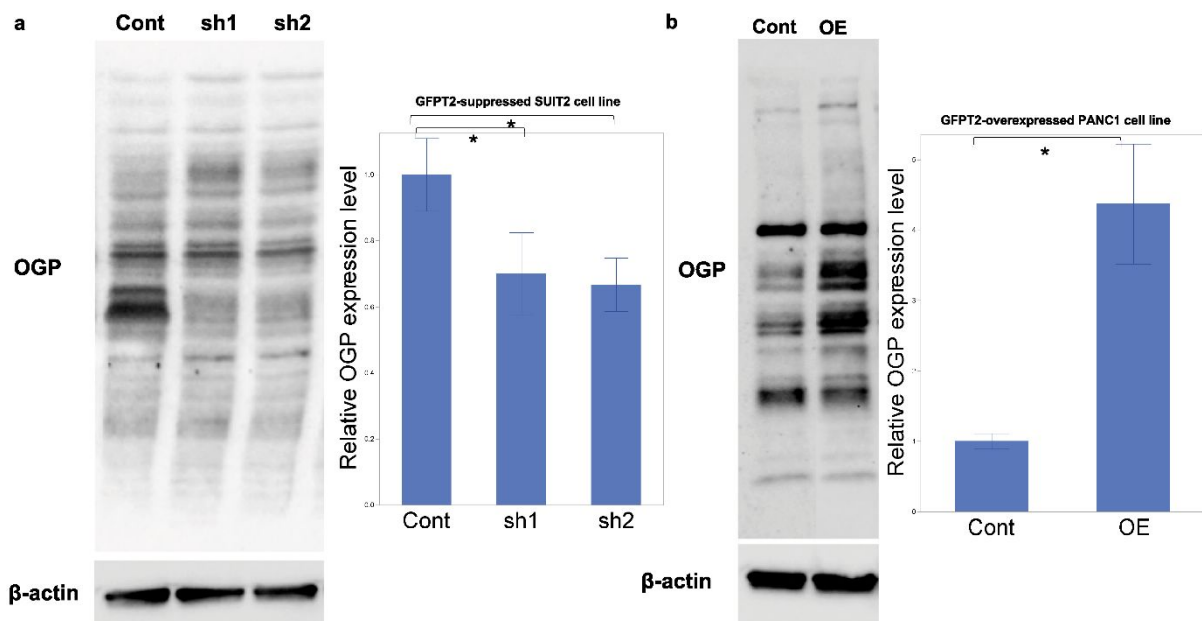


Fig. 2 O-GlcNAc protein expression in PaCa cells (a) O-GlcNAc protein expression in GFPT2-suppressed SUI2 cells

GFPT2 はヘキソサミン合成経路の活性化を通じて細胞の移動浸潤能を制御している

Scrach assay の結果 GFPT2 の発現を抑制した SUI2 細胞株では移動能が有意に低下しており(Fig. 3a) ,PANC1 を用いた過剰発現株では移動能は有意に亢進していた(Fig. 3b).

またECMatrix™ でコーティングされた Boyden chamber を用いた浸潤能の評価では GFPT2 の発現を抑制することで浸潤能が有意に低下しており(Fig. 3c) , 過剰発現株では浸潤能の有意な亢進が認められた(Fig. 3d).GFPT2 の過剰発現株に対して HBP の阻害剤である DON を添加したところ, 亢進していた浸潤能は通常のレベルにまで低下していた(Fig. 3e) . 以上より浸潤能の亢進はヘキソサミン経路の活性化を介して制御されていることが示された .

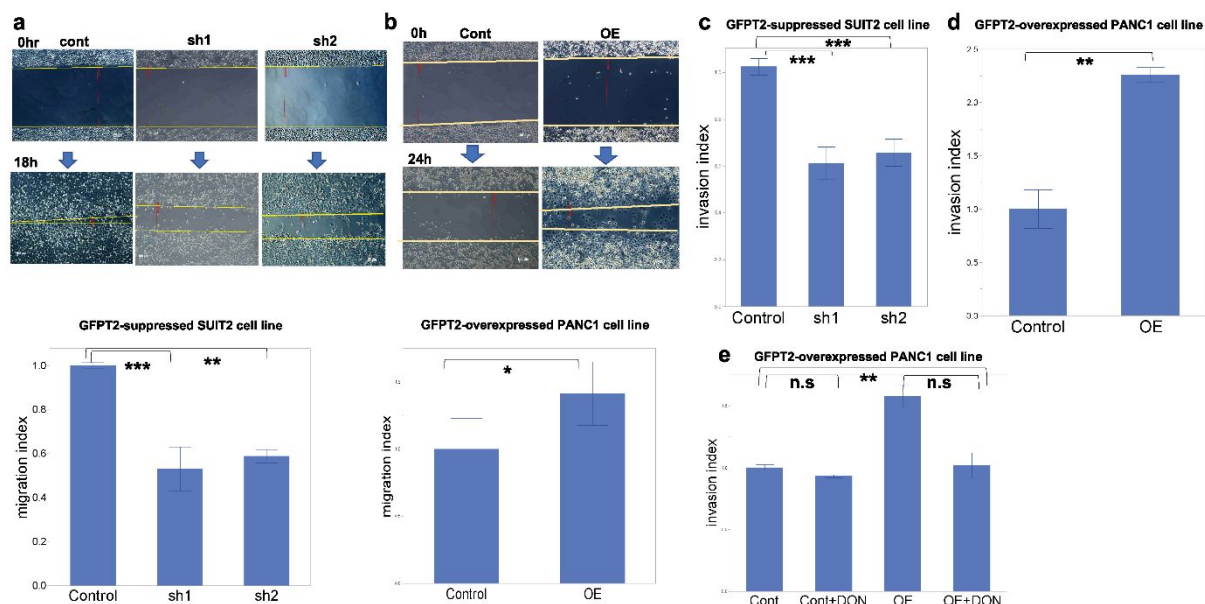


Fig. 3 Migration of and invasion by PaCa cells.

GFPT2 induces EMT in pancreatic cancer cells

GFPT2 の発現は肺癌細胞においてEMT の誘導に関与する .

GFPT2 の過剰発現株を用いて EMT 関連因子の発現量を測定したところ, ZEB-1 と Vimentin の発現量が増加し, E-cadherin の発現低下が認められた(Fig. 5). 以上より HBP の下流にて EMT が誘導されている可能性が示された .

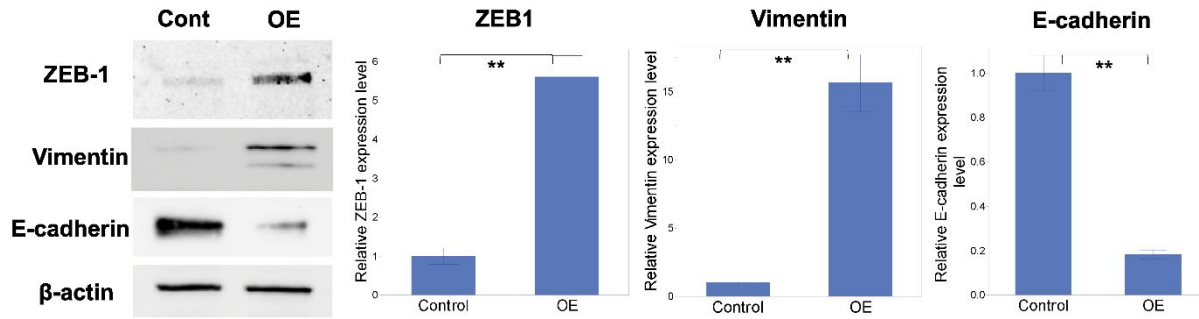


Fig. 5 Expression of EMT-related proteins in PANC-1-OE cells

GEMの投与はGFPT2の発現を選択的に上昇させる

マウス同所移植を行い, GEMを6週間投与したところ, GFPT1の発現量に大きな変化はないものの, GFPT2の発現が選択的に上昇していることが明らかとなった (Fig. 6).

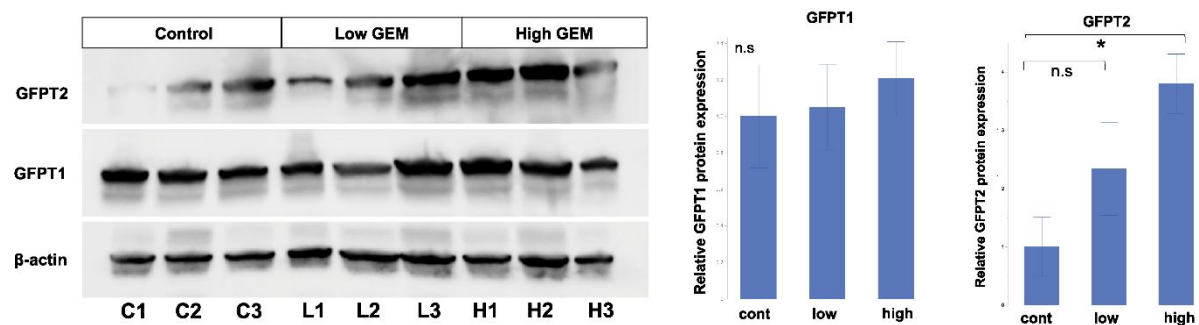


Fig. 6 GFPT expression after gemcitabine administration in a mouse xenograft model

術前抗癌剤治療施行例ではGFPT2の発現量が増加する

161例の切除検体を用いて, 術前治療施行例と非施行例においてGFPT2の発現量を比較したところ, 術前治療施行例ではGFPT2の発現量が有意に高いことが明らかとなった.

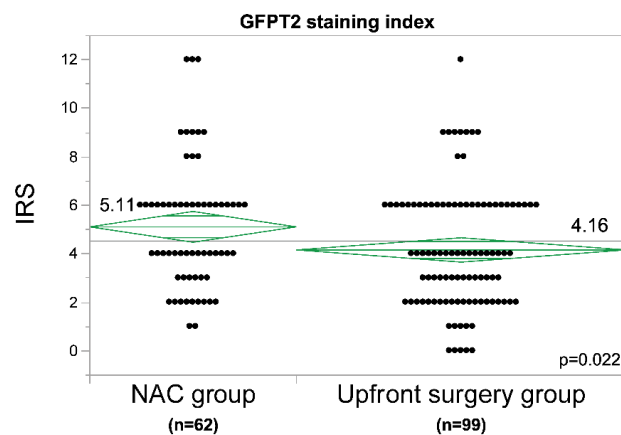


Fig. 7 Comparison of GFPT2 expression between patients receiving NAC and upfront surgery

以上の結果より膵癌においてGEM刺激によってHBPの律速酵素であるGFPT2の発現が選択的に上昇することが示された. またGFPT2の発現はHBPを活性化することで, 膵癌細胞のEMTを誘導し細胞の移動・浸潤能を制御していることが明らかとなった. これらの結果は抗癌剤による転移促進CIMのメカニズムを解明する上で重要な役割を担っているものと推察される. 今後抗癌剤投与時にHBP阻害剤を併用することで, 長期にわたる抗癌剤使用における転移能の亢進を制御できるかという検討を行っていく必要があると考える.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎健人, 有明恭平, 石田晶玄, 中山舜, 井上亨悦, 堂地 大輔, 青木 修一, 伊関 雅裕, 三浦 孝之, 大塚 英郎, 水間 正道, 中川 圭, 森川 孝則, 亀井 尚, 海野 倫明
2. 発表標題 GFPT2はGemc1 tabine刺激によって発現が誘導されヘキソサミン経路を介した癌細胞の移動・浸潤能を亢進する
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023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
研究分担者	佐藤 聡子 (Sato Satoko) (30815957)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	大塚 英郎 (Ohtsuka Hideo) (50451563)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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
---------	---------