

令和 6 年 9 月 7 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08806

研究課題名（和文）膵癌特異的エネルギー代謝メカニズムに基づく革新的治療の開発

研究課題名（英文）Development of innovative treatments based on pancreatic cancer-specific energy metabolism mechanisms.

研究代表者

宇和川 匡（Uwagawa, Tadashi）

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70287209

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）：膵がん細胞内のライソゾーム酵素による糖代謝ネットワークを解析した結果、酸性セラミダーゼが治療ターゲットになると推測し、アデノウイルスベクター（AAV8）を使用したsiRNAおよびshRNAによる酸性セラミダーゼ阻害は、膵がん細胞のアポトーシスを誘導することが明らかにした。さらに酸性セラミダーゼ阻害は、ミトコンドリア機能障害、活性酸素種の蓄積、およびマンガンスーパーオキシドジスムターゼを抑制することで、セラミド蓄積を伴う膵臓癌細胞のアポトーシスを誘導することを昨年までの研究で明らかにし、その結果を論文化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は悪性疾患の中で最も予後不良であり、その治療法も限定的である。昨今のがん薬物療法には、分子標的治療や免疫チェックポイント阻害剤が用いられることが一般的となり、より多くの癌腫において今までにない長期生存が得られるようになった。しかし現時点ではこれらの薬物療法を用いても膵癌に対しては有効であるとは言い難い。本研究では、膵癌細胞の栄養獲得のメカニズム、すなわち膵癌特異的なエネルギー産生経路を明らかにすることで膵癌治療における新規ターゲットを明らかにした。これは既存の薬物療法と全く異なる治療メカニズムであり、既存の標準治療と併用することにより、膵癌に対する抗腫瘍効果の増幅が期待される。

研究成果の概要（英文）：As a result of analyzing the sugar metabolism network by lysosomal enzymes in pancreatic cancer cells, we speculated that acid ceramidase would be a therapeutic target. It was revealed that it induces apoptosis. Furthermore, research conducted until last year revealed that acid ceramidase inhibition induces apoptosis in pancreatic cancer cells with ceramide accumulation by suppressing mitochondrial dysfunction, accumulation of reactive oxygen species, and manganese superoxide dismutase. The results were published in a paper.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：酸性セラミダーゼ 膵臓癌 ライソゾーム酵素

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の着想に至った経緯と準備状況

膵臓癌非切除症例や再発例に対して化学療法を施行する中で、その悪性度の高さから病勢コントロール困難な状況に直面することが多い。コントロールを失った膵臓癌の進展は早く、2次治療に移行してからの生存期間中央値は3-6ヶ月と極めて予後不良である。現在、塩酸ゲムシタピンを中心とした様々な化学療法が検証されているが、その効果は限定的であり依然として予後不良である。従って、既存の抗癌剤に加えて新たな治療アプローチが渴望されている。申請者は、これまで抗癌剤投与によって活性化したNF- κ Bを阻害することで抗癌剤の抗腫瘍効果を増強させる報告してきたが、決定的な治療には至らない現状であった。一方で他癌腫に目を向けると、がん細胞の活発な代謝を標的とし、血管新生阻害薬などを用いて腫瘍のエネルギー供給を断つ方法が標準治療となっている。膵臓癌はそもそも乏血性であるという特性から血管新生阻害剤の効果を認めないため、エネルギー代謝に着目した治療がないという現状に着目した。そこで申請者はエネルギー供給路をオートファジーに依存する膵臓癌において、オートファジーの最終段階であるLysosome酵素を含んだ代謝経路を明らかにすることが重要であると考えた。代謝経路の鍵となる酵素を阻害することでグルコースへの異化経路を遮断し、がん細胞を決定的なエネルギー欠乏に陥らせるというこれまでにない治療法の着想に至った。現時点での準備状況であるが、当該研究は東京慈恵会医科大学倫理委員会において「膵臓癌におけるライソソーム酵素機能および発現解析」という題名で承認された(承認番号31-046(9545))。膵臓癌手術検体の採集(癌部および非癌部、血液)や臨床情報の収集を開始している。また各種Lysosome酵素測定系の条件検討を先行研究において行っている。

(2) 関連する国内外の研究動向と本研究の位置づけ

オートファジー機構は2016年にノーベル生理学・医学賞を受賞し、がん細胞においても亢進していることが示され、がん治療研究における有望な標的として注目されている。その一方で、これらの研究はオートファゴソーム形成の観点からの研究が大勢を占めており、分解の実態であるLysosomeの変化に着目した研究は非常に少ない。2015年には膵臓癌細胞においてLysosomeに関連する転写因子であるTFEBがオートファジー/Lysosome機構におけるアミノ酸代謝を調節し、Lysosomeが細胞内環境維持していることを明らかにしている(Bardeesy, et al. Nature, 2015)。さらにTFEBを介し、Lysosome機能が活性化することで抗癌剤耐性が誘導されることも報告されている(Liang C, et al. Nat Commun, 2018)。しかし、これら報告と本研究の決定的に異なる点は鍵となるエネルギー代謝の鍵となるLysosome酵素の同定し、治療の標的とする点である。本研究はLC-MS/MSをプロテオーム解析を行うことで50種類以上存在するLysosome酵素群の中で代謝の中心となる分子を酵素と基質の両面から網羅的に同定する。同定した代謝経路を指標に栄養的な手法や低分子化合物を用いた手法で抗癌剤抵抗性改善に寄与する新たな手法の開発につながる。これらの知見は膵臓だけでなく乏血流性の他癌種において明らかになっておらず、Lysosome酵素が全ての真核生物に保存される根源的な機構であるという側面から、本研究の実現は既存の治療に抵抗性を示す全てのがんに新たな治療戦略を提唱することとなる。

2. 研究の目的

本研究では乏血性腫瘍でありながら高度な増殖浸潤能を有する膵臓癌に特徴的なエネルギー代謝経路に明らかにすることを目的とし、エネルギー産生の鍵となるLysosome酵素群を明らかにする。具体的には膵臓癌患者検体を用いてメタボローム解析および網羅的なタンパク解析を行い、活性化されたLysosome酵素を同定する。詳細な解析にはオートファジーの最終段階であるLysosome酵素の働きを明らかにすることが必須と考え。代謝経路の鍵となる酵素を阻害することでグルコースへの異化経路を遮断し、がん細胞を決定的なエネルギー欠乏に陥らせるというこれまでにないアプローチでの治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、膵臓癌切除検体からLC-MS/MSを応用したiMPACT法(Nat Methods, 2017)を用いて網羅的なタンパク解析を行い、膵臓癌内のエネルギー代謝経路を明らかにする。またATP産生量やグルコースの蓄積に関して解析し、エネルギー代謝の全容を明らかにする。解明した経路よりエネルギー代謝の鍵となるLysosome酵素を特定する。

特定した酵素阻害によるがん細胞への影響を検証

特定した酵素の膵臓癌細胞内での働きを検証するために以下の実験を行う。

(i) 解糖系、クエン酸回路、電子伝達系を含むATP産生経路の解析

(ii) オートファジー経路、Lysosome酵素活性の測定

オートファジーに関して以下に示す各種関連タンパクの解析を行う。予備実験ではGAA阻害によりオートファジーのイニシエーターであるTFEBの核内移行が抑制されていることが明らかと

なった。mTOR, Beclin1, Bcl2, ATG13, ATG14, ATG5, ATG12, ATG7 など

(iii) マイトファジー、ミトコンドリア機能解析

LC3-GFP を搭載したレンチウイルスベクターを用い、LC3 発現の局在を免疫染色で観察し、ミトコンドリア上での LC3 低下を確認する。以下に示すマイトファジー関連タンパクの解析を行う。LC3, Parkin, PINK1, PARL, p62, LAMP2 など。先行実験 (図 5) の様にミトコンドリア膜電位を測定し、酸化リン酸化を行うミトコンドリア機能の低下を確認する。電子顕微鏡を用いて、ミトコンドリアの形態を観察する。

(iv) 酵素阻害での細胞増殖抑制、アポトーシス誘導

ウイルスベクター作製と動物実験

特定した標的遺伝子に対する shRNA を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を作成する。膵臓細胞に移行性が高い AAV-8 を用いる。ヒト膵臓癌細胞株のマウス皮下腫瘍モデルに対し、作製したベクターを局所注射し、抗腫瘍効果及び副作用を評価する。腫瘍の大きさや病理学的な死細胞の評価により抗腫瘍効果を判定するとともに、マウスの体重や採血により副作用の評価を行う。

4. 研究成果

膵臓癌細胞内のライソゾーム酵素による糖代謝ネットワークを解析した結果、酸性セラミダーゼが治療ターゲットになると推測し、アデノウイルスベクター (AAV8) を使用した siRNA および shRNA による酸性セラミダーゼ阻害は、膵臓癌細胞のアポトーシスを誘導することが明らかにした。さらに酸性セラミダーゼ阻害は、ミトコンドリア機能障害、活性酸素種の蓄積、およびマンガスーパーオキシドジスムターゼを抑制することで、セラミド蓄積を伴う膵臓癌細胞のアポトーシスを誘導することを昨年までの研究で明らかにし、その結果を論文化した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yanagaki M, Shirai Y, Shimada Y, Hamura R, Taniat T, Horiuchi T, Takada N, Haruki K, Furukawa K, Uwagawa T, Kobayashi H, Ikegami T.	4. 巻 43
2. 論文標題 Inhibition of lysosomal acid α -glucosidase induces cell apoptosis via impairing mitochondrial clearance in pancreatic cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 826-837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Uwagawa T, Sakamoto T, Gocho T, Shiba H, Onda S, Yasuda J, Shirai Y, Hamura R, Furukawa K, Yanaga K, Ikegami T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Phase II trial of nafamostat mesilate/gemcitabin/S-1 for unresectable pancreatic cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	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） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kamada T, Ohdaira H, Okada S, Takahashi J, Nakashima K, Nakaseko Y, Suzuki N, Uwagawa T, Yoshida M, Yamanouchi E, Suzuki Y.	4. 巻 109
2. 論文標題 Oesophageal elongation using magnets in adult patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Br J Surg	6. 最初と最後の頁 472-473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hamura R, Haruki K, Taniat T, Yanagaki M, Shirai Y, Furukawa K, Usuba T, Fujioka S, Okamoto T, Nakabayashi Y, Uwagawa T, Ikegami T.	4. 巻 27
2. 論文標題 The impact of S-1 for the patient with lymph nodal metastasis biliary tract cancer as adjuvant chemotherapy: a multicenter database analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1188-1195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Taniai T, Shirai Y, Shimada Y, Hamura R, Yanagaki M, Takada N, Horiuchi T, Haruki K, Furukawa K, Uwagawa T, Tsuboi K, Okamoto Y, Shimada S, Tanaka S, Ohashi T, Ikegami T.	4. 巻 112
2. 論文標題 Inhibition of acid ceramidase elicits mitochondrial dysfunction and oxidative stress in pancreatic cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4570-4579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Uwagawa T, Sakamoto T, Yasuda J, Shiozaki H, Furukawa K, Onda S, Gocho T, Shiba H, Yanaga K.	4. 巻 50
2. 論文標題 Phase II Study of Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine and Nafamostat Mesilate for Pancreatic Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 313-316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Maruki Y, Morizane C, Arai Y, Ikeda M, Ueno M, Ioka T, Naganuma A, Furukawa M, Mizuno N, Uwagawa T, Takahara N, Kanai M, Asagi A, Shimizu S, Miyamoto A, Yukisawa S, Kadokura M, Kojima Y, Furuse J, Nakajima TE, Sudo K, Kobayashi N, Hama N, Yamanaka T, Shibata T, Okusaka T.	4. 巻 56
2. 論文標題 Molecular detection and clinicopathological characteristics of advanced/recurrent biliary tract carcinomas harboring the FGFR2 rearrangements: a prospective observational study (PRELUDE Study)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 250-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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0件

〔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	恩田 真二 (Onda Shinji) (10459620)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	
研究分担者	白井 祥睦 (Shirai Yoshihiro) (10785364)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	阿部 恭平 (Abe Kyouhei) (30751292)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	後町 武志 (Gocho Takeshi) (40338893)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	
研究分担者	春木 孝一郎 (Haruki Koichiro) (60720894)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	池上 徹 (Ikegami Toru) (80432938)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	
研究分担者	古川 賢英 (Furukawa Kenei) (80624973)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

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