

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32651  
研究種目：若手研究  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K16390  
研究課題名（和文）膵癌における糖脂質代謝異常と発癌メカニズム、癌の進展に注目した革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative therapies focusing on abnormalities of glycolipid metabolism, carcinogenesis mechanisms, and cancer progression in pancreatic cancer

研究代表者  
安田 淳吾（Yasuda, Jungo）  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90896870  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：膵臓癌において、癌細胞株間での酵素活性の相違がGBA蛋白発現量との相関を示し、GBA酵素活性の大きにかかわらず、細胞増殖抑制効果を示し、アポトーシス細胞の増加を示したGBAノックダウンにより、膵臓癌株においてミトコンドリアの機能不全を起こした。その原因評価にマイトファジー機構を検索したところ、その機能の低下を認めた。マイトファジー阻害材である mdivi-1を用いたPDAC細胞株においてアポトーシス細胞を誘導した。mdivi-1単独と比較して、GBAノックダウンとの組み合わせは、マイトファジーを有意に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
ライソゾーム酵素の一つである酸性グルコシダーゼの阻害により、マイトファジーが低下し、ミトコンドリア膜電位が低下し、不良ミトコンドリアが増殖した。その結果、活性酸素の蓄積を認めアポトーシスシグナルが増強し、抗腫瘍効果が増加したため膵臓癌細胞の細胞死が誘導された。このことにより膵臓癌治療の新たな標的として有望であることがしめされた。

研究成果の概要（英文）：In pancreatic cancer, differences in enzyme activity among cancer cell lines correlated with GBA protein expression levels, and GBA knockdown caused mitochondrial dysfunction in pancreatic cancer lines, which showed an inhibitory effect on cell growth and an increase in apoptotic cells regardless of the magnitude of GBA enzyme activity. The mitophagy mechanism was searched for to evaluate the cause of this dysfunction. We induced apoptotic cells in PDAC cell lines using mdivi-1, a mitophagy inhibitor. mdivi-1 in combination with GBA knockdown significantly suppressed mitophagy compared to mdivi-1 alone.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：ライソゾーム 酸性グルコシダーゼ マイトファジー ミトコンドリア膜電位 活性酸素 抗腫瘍効果  
膵臓癌

様式 C - 19、F - 19 - 1(共通)

機関番号:32651

研究種目:若手研究

研究期間:2021～2023

課題番号:21K16390

研究課題名(和文) 膵癌における糖脂質代謝異常と発癌メカニズム、癌の進展に注目した革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative therapies focusing on abnormalities of glycolipid metabolism and carcinogenesis mechanisms in pancreatic cancer and cancer progression.

研究代表者

安田淳吾(Yasuda Jungo)

東京慈恵会医科大学 外科学講座・助教

研究者番号:90896870

交付決定額(研究期間全体):(直接経費)3,500,000 円

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌患者は年々増加しており、医療技術の進歩にかかわらずその予後は依然として不良であり、予後の改善が望まれている。膵臓癌は乏血性の腫瘍であり、血管新生が乏しいことが知られている。膵臓癌では低酸素、低栄養環境下で増殖可能なようにオートファジーが亢進し、栄養が供給されることが特徴である。膵臓癌におけるオートファジーの活性低下が発癌の一因と考えられていることから、申請者らはオートファジーの最終段階である Lysosome 酵素に注目した。

### 2. 研究の目的

膵臓癌の発癌・進展において、糖脂質代謝酵素である Lysosome 酵素における糖脂質代謝ネットワークが膵臓癌の発癌との関連を解明する。さらに、重要な Lysosome 酵素のノックダウンにより、膵臓癌に対する革新的な治療方法を見出すことを目的とする。最終的には Lysosome をターゲットとした癌治療における基礎的知見の提供を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### **Lysosome 酵素と膵臓癌の発癌メカニズム解明を目指した実験**

##### In vivo

K-rasG12D 変異誘導アデノウイルスベクターを用いて免疫系が正常なマウス(C57BL/6)の膵臓に前癌病変 PanIN を発症させる。膵臓癌、肺癌等で高頻度に遺伝子変異がみられる K-ras を用いれば、2~4 週間でマウスに PanIN が発生する。用いるベクターはアデノウイルスを用いる。アデノウイルスは膵管、腺房中心細胞、介在管、腺房細胞に感染することが知られており、効率的にマウスの膵臓に感染させることができる。

##### In vitro

マウスに発症した膵臓癌の前癌病変である PanIN を摘出し、膵癌細胞を初代培養する。初代培養細胞の RNA-seq 解析を行い、全ての Lysosome 酵素遺伝子発現を調べ、発癌に重要な Lysosome 酵素を抽出する。さらに、PanIN おける Lysosome 酵素群の病的意義を明らかにするため、オートファジー機能への影響を p62 や LC3 抗体を用いてウエスタンブロットング法でたんぱく質の発現を評価する。加えて、ウイルスベクターを用いた Lysosome 酵素抑制により、PanIN 発症の抑制効果を確認する。さらに増殖因子等、膵癌細胞の細胞増殖能や細胞内オルガネラへ及ぼす影響を調べる。

#### **Lysosome 酵素と膵臓癌の進展メカニズム解明を目指した実験**

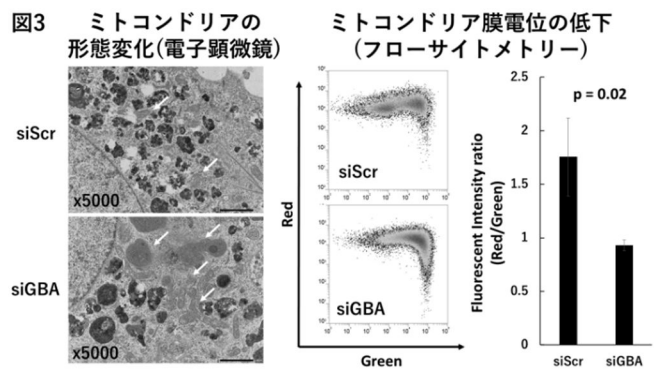
##### In vitro

##### **1. Lysosome 酵素活性・タンパク質発現量・細胞増殖能抑制効果の確認**

ヒト膵癌細胞株(PANC-1、MiaPaca-2、AsPC-1、BxPC-3)を用いる。siRNA を用いた RNA 干渉で RNA-seq で抽出した Lysosome 酵素をノックダウンし、酵素活性が低下することを確認する。また、その際の細胞増殖能を確認し、増殖能が低下していた場合は、アポトーシスシグナル(Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-8, Cleaved PARP)をウエスタンブロットングで評価し、アポトーシス細胞の増減をフローサイトメトリー(Annexin V-FITC assay)で定量し、評価する。

##### **2. Lysosome 酵素ノックダウンによるミトコンドリアを中心とした細胞内オルガネラの変化の確認**

電子顕微鏡による細胞内オルガネラの観察を行う。免疫蛍光染色を用いてミトコンドリアと Lysosome を染色(Mitotracker®, LysoTracker®)し、ミトコンドリアの蓄積や Lysosome の活性を評価する。ミトコンドリア機能の評価を蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーを用いてミトコンドリア膜電位を間接的に測定する(GBA ノックダウンにおける膵癌細胞株 BxPC-3 での結果が図 3)。ミトコンドリアの機能低下が確認できた場合、細胞内、ミトコンドリア内の活性酸素種(ROS)産生をフローサイトメトリーで測定する。



### 3. GBA KD によるマイトファジーの評価

ミトコンドリア蓄積の原因を評価するため、ミトコンドリアの選択的オートファジーであるマイトファジーを定性・定量する。蛍光顕微鏡において、ミトコンドリア嗜好性のある Mtpagy Dye が酸性オートリソソームに取り込まれる時に赤色蛍光を発色する蛍光法で評価する。さらのその蛍光をフローサイトメトリーで定量し、Lysosome 酵素ノックダウンにおけるマイトファジーを評価する。

マイトファジーの低下が確認されれば、オートファジー関連タンパク質である LC3、p62/SQSTM1、ライソソーム関連膜タンパク質である LAMP2、マイトファジーに重要な役割を果たすユビキチンリガーゼである PINK1/Parkin をウエスタンブロッティング法で評価する。

#### In vivo

### 4. ウイルスベクターを作製し、皮下腫瘍モデルでの抗腫瘍効果の確認

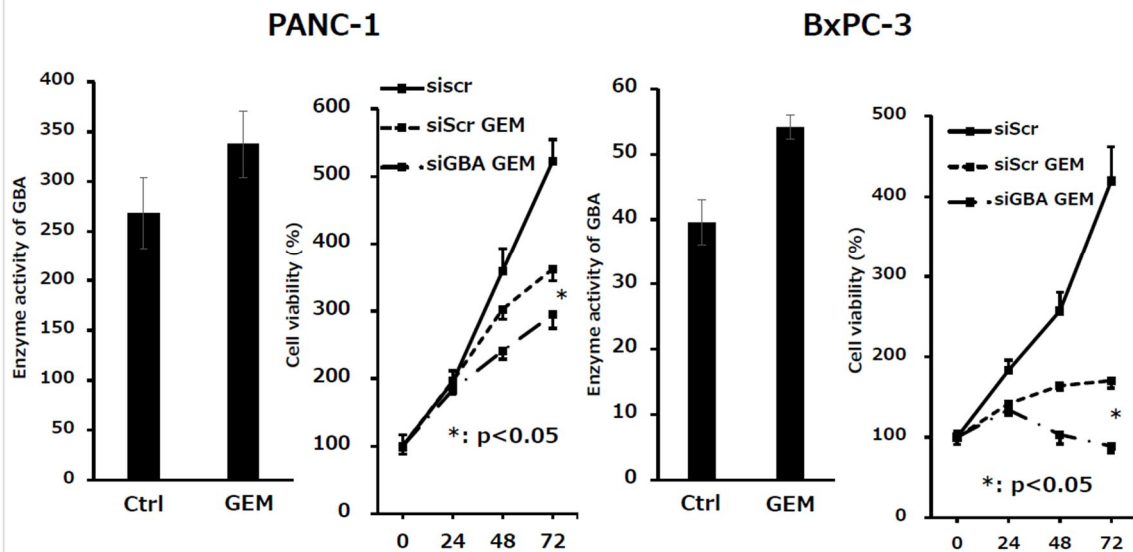
特定の Lysosome 酵素をノックダウンする shRNA を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を作成する。AAV による膵癌細胞株への遺伝子導入効率を確認し、抗腫瘍効果が増強することを確認する。ベクターの安全性を確認したのち、ヌードマウス皮下担癌モデルを作成し、皮下腫瘍にベクターを局注し、抗癌剤の抗腫瘍効果を確認する。抗腫瘍効果が増強することを確認した後、癌細胞特異的に遺伝子導入可能なプロモーターを導入する。膵臓癌腹膜播種モデルに対し遺伝子導入し、予後改善効果を確認する。

#### 4. 研究成果

まず GBA 酵素活性とタンパク質発現量の評価を行った。膵臓癌細胞株と正常膵管細胞に関して GBA 酵素活性を測定し、癌細胞株間での酵素活性の相違が、GBA 蛋白 発現量との相関を示した。また siRNA 法を用いて GBA をノックダウンし、GBA 酵素活性と蛋白発現量が有意な減少を確認 GBA 酵素活性の大きさにかわらず、細胞増殖抑制効果を認め、同時にアポトーシス細胞の増加、アポトーシスシグナルの増強を認めた。膵癌株において GBA ノックダウンによる形態学的評価を行った各細胞株で膨化したミトコンドリアの蓄積が確認され、蛍光顕微鏡下でのミトコンドリアの蓄積 と、ライソソーム活性の低下も確認された。細胞内の活性酸素種(ROS)を評価したところ、細胞内、ミトコンドリア内での ROS の蓄積が確認されミトコンドリア の機能不全が示唆された。ミトコンドリア膜電位をフローサイトメトリーを行い、膜電位の低下を認め、不良ミトコンドリアであることが示された。不良ミトコンドリアの蓄積の原因の評価に、マイトファジー機構を検索した。蛍光顕微鏡においてマイトファジーを評価した。フローサイトメトリーと免疫蛍光染色のいずれでも、GBA ノックダウンによりマイトファジー活性が低下していた。その評価のためオートファジー関連蛋白質の発現をウエスタンブロッティングで行ったところ、LC3II 蛋白質の蓄積を認めた。マイトファジー阻害材である mdivi-1 を用い PDAC 細胞株においてアポトーシス細胞を誘導した。mdivi-1 単独と比較して、GBA ノックダウンとの組み合わせは、マイトファジーを有意に抑制した。

## 研究成果の概要

膵臓癌において、癌細胞株間での酵素活性の相違が GBA 蛋白発現量との相関を示し、GBA 酵素活性の大きさにかかわらず、細胞増殖抑制効果を示し、アポトーシス細胞の増加を示した GBA ノックダウンにより、膵臓癌株においてミトコンドリアの機能不全を起こした。その原因評価にマイトファジー機構を検索したところ、その機能の低下を認めた。マイトファジー阻害材である mdivi-1 を用い PDAC 細胞株においてアポトーシス細胞を誘導した。mdivi-1 単独と比較して、GBA ノックダウンとの組み合わせは、マイトファジーを有意に抑制した。ライソゾーム酵素の一つである酸性グルコシダーゼの阻害により、マイトファジーが低下し、ミトコンドリア膜電位が低下し、不良ミトコンドリアが増殖した。その結果、活性酸素の蓄積を認めアポトーシスシグナルが増強し、抗腫瘍効果が増加したため膵臓癌細胞の細胞死が誘導された。このことにより膵臓癌治療の新たな標的として有望であることがしめされた



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Uwagawa Tadashi, Sakamoto Taro, Gocho Takeshi, Shiba Hiroaki, Onda Shinji, Yasuda Jungo, Shirai Yoshihiro, Hamura Ryoga, Furukawa Kenei, Yanaga Katsuhiko, Ikegami Toru	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 0267623 0267623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0267623	査読の有無 無
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 Tsunematsu Masashi, Gocho Takeshi, Yanagaki Mitsuru, Shirai Yoshihiro, Haruki Koichiro, Furukawa Kenei, Yasuda Jungo, Onda Shinji, Sakamoto Taro, Ikegami Toru	4. 巻 6
2. 論文標題 The impact of postoperative exocrine index on non alcoholic fatty liver disease following pancreaticoduodenectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 704 ~ 711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12572	査読の有無 無
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 NAKASEKO YUICHI, FURUKAWA KENEI, HARUKI KOICHIRO, ONDA SHINJI, YASUDA JUNGO, SHIRAI YOSHIHIRO, OKUI NORIMITSU, NAKASHIMA KEIGO, SUZUKI YUTAKA, IKEGAMI TORU	4. 巻 42
2. 論文標題 Standardized and Feasible Laparoscopic Approach for Tumors Located in the Caudate Lobe	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3621 ~ 3625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15850	査読の有無 無
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 Yanagaki Mitsuru, Haruki Koichiro, Taniai Tomohiko, Igarashi Yosuke, Yasuda Jungo, Furukawa Kenei, Onda Shinji, Shirai Yoshihiro, Tsunematsu Masashi, Ikegami Toru	4. 巻 30
2. 論文標題 The significance of osteosarcopenia as a predictor of the long term outcomes in hepatocellular carcinoma after hepatic resection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 453 ~ 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.1246	査読の有無 無
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 Tomohiko, Haruki Koichiro, Yanagaki Mitsuru, Igarashi Yosuke, Furukawa Kenei, Onda Shinji, Yasuda Jungo, Matsumoto Michinori, Tsunematsu Masashi, Ikegami Toru	4. 巻 53
2. 論文標題 Osteosarcopenia predicts poor prognosis for patients with intrahepatic cholangiocarcinoma after hepatic resection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 82 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-022-02550-3	査読の有無 無
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 Shiozaki Hironori, Shirai Yoshihiro, Horiuchi Takashi, Yasuda Jungo, Furukawa Kenei, Onda Shinji, Gocho Takeshi, Shiba Hiroaki, Ikegami Toru	4. 巻 14
2. 論文標題 Feasible laparoscopic distal pancreatectomy for pancreatic neuroendocrine tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	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) 10.3892/mco.2021.2273	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 Yasuda Jungo, Haruki Koichiro, Furukawa Kenei, Onda Shinji, Shirai Yoshihiro, Gocho Takeshi, Ikegami Toru	4. 巻 51
2. 論文標題 Double cone-unit laparoscopic hepatic resection using indocyanine green negative counterstaining (with video)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1881 ~ 1885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-021-02299-1	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 Yasuda Jungo, Onda Shinji, Yanagaki Mitsuru, Ikegami Toru	4. 巻 39
2. 論文標題 Laparoscopic extended right anterior sectionectomy including the paracaval caudate portion using the Arantius' approach (with video)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 101669 ~ 101669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.suronc.2021.101669	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 Taniai Tomohiko, Haruki Koichiro, Furukawa Kenei, Onda Shinji, Yasuda Jungo, Shirai Yoshihiro, Gocho Takeshi, Yanagaki Mitsuru, Hamura Ryoga, Shiba Hiroaki, Ikegami Toru	4. 巻 26
2. 論文標題 The novel index using preoperative C-reactive protein and neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts poor prognosis in patients with pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1922 ~ 1928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-01964-2	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 Furukawa Kenei, Gocho Takeshi, Sakamoto Taro, Tsunematsu Masashi, Haruki Koichiro, Horiuchi Takashi, Shirai Yoshihiro, Yasuda Jungo, Shiozaki Hironori, Onda Shinji, Shiba Hiroaki, Sato Shun, Takahashi Hiroyuki, Ikegami Toru	4. 巻 21
2. 論文標題 Intraoperative amylase level of pancreatic juice as a simple predictor of pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 299 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2020.10.048	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 -

[学会発表] 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 安田淳吾、丹治芳明、谷合智彦、柳垣 充、羽村凌雅、堀内堯、白井祥睦、春木孝一郎、奥井紀光、古川賢英、恩田真二、坂本太郎、柴浩明、後町武志、池上徹
2. 発表標題 腹腔鏡下肝切除における、胆汁漏のリスクと胆汁漏修復法
3. 学会等名 JDDW
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田淳吾、春木孝一郎、古川賢英、恒松 雅、奥井紀光、松本倫典、坂本太郎、後町武志、池上 徹
2. 発表標題 真のminimally invasive surgeryを目指した腹腔鏡下肝切除の限界点の見極め
3. 学会等名 第16回 肝臓内視鏡外科研究会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Jungo Yasuda,, Kouichirou Haruki, Kenei Furukawa, Shinji Onda, Toru Ikegami
2. 発表標題 Parenchymal resection with CUSA in Laparoscopic hepatectomy, Handling of Gleason and Prevention of Bile Leakage
3. 学会等名 第34回肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田淳吾、春木孝一郎、奥井紀光、古川賢英、恩田真二、恒松雅、坂本太郎、後町武志、池上 徹
2. 発表標題 Standardization of hilar approach in laparoscopic hepatic extensive left lobectomy with caudate lobectomy
3. 学会等名 第77回消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田淳吾、古川賢英、春木孝一郎、恒松 雅、松本典倫、坂本太郎、後町武志、池上徹
2. 発表標題 腹腔鏡下系統的Double Cone-Unit肝切除例の適応と実際
3. 学会等名 第5回日本蛍光ガイド手術研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田淳吾、丹治芳朗、恒松雅、春木孝一郎、奥井紀光、古川賢英、恩田真二、坂本太郎、後町武志、池上徹
2. 発表標題 肝門部胆管癌における拡大左葉切除術、胆管空腸吻合術の定型化への挑戦
3. 学会等名 日本胆道学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jungo Yasuda, Mitsuru Yanagaki, Kenei Furukawa, Shinji Onda, Toru Ikegami
2. 発表標題 The new era in laparoscopic repeat hepatectomy
3. 学会等名 IASGO-CME (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田淳吾、谷合智彦、柳垣 充、河合裕成、羽村凌雅、堀内堯、白井祥睦、春木孝一郎、古川賢英、恩田真二、飯田智慧、坂本太郎、後町武志、池上徹
2. 発表標題 再肝切除症例における新たなインフローコントロール
3. 学会等名 JDDW 第19回 日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jungo Yasuda, Kouichirou Haruki, Kenei Furukawa, Shinji Onda, Toru Ikegami
2. 発表標題 The novel technique for inflow control in repeat laparoscopic hepatectomy
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田淳吾、恩田真二、羽村凌雅、春木孝一郎、古川賢英、飯田智慧、白井祥睦、坂本太郎、後町武志、池上 徹
2. 発表標題 Standardization of laparoscopic S8 hepatectomy in case with history of hepatectomy
3. 学会等名 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田淳吾、古川賢英、恩田真二、春木孝一郎、五十嵐陽介、羽村凌雅、谷合智彦、恒松雅、河合裕成、柳垣充、白井祥睦、坂本太郎、後町武志、柴 浩明、池上徹
2. 発表標題 腹腔鏡下右葉系系統切除におけるCone unit切除および主肝静脈アプローチの定型化
3. 学会等名 日本内視鏡外科学会
4. 発表年 2021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