

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20844

研究課題名（和文）胆道癌におけるATX/LPA受容体シグナルをターゲットとした新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of Novel Therapies Targeting ATX/LPA Receptor Signaling in Cholangiocarcinoma

研究代表者

近藤 啓 (Kondo, Hiromu)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・准教授

研究者番号：60750594

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：この研究を通じ、胆道癌におけるLPA受容体シグナルの新規治療ターゲットの可能性を解明することを目的とした。まず胆道癌進展におけるリゾホスファチジン酸（LPA）-LPA受容体シグナルの重要性を明らかにした。そのうえで、LPA産生酵素として知られるオートタキシン（ATX）の胆道癌における高発現を臨床検体・実験細胞株を用いて確認のうえ、ATX制御（形質導入・阻害剤）による癌抑制効果について証明した。本研究の派生として膵神経内分泌腫瘍細胞（pNEN）におけるATXの発現が明らかとなり、pNENにおけるATX発現制御の意義についての新たな研究立案にもつながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、胆道癌における新規治療ターゲットとしてLPA受容体シグナルの可能性を解明することを目的とした。胆道癌進展におけるLPA-LPA受容体シグナルの重要性を明らかにし、ATXの制御による癌抑制効果を証明することで、胆道癌治療法の新規開発と患者の予後改善に大きな影響を与える可能性があると考えられた。ATX阻害剤は炎症性疾患を中心とする他の疾患ですでに臨床試験が組まれている薬剤が複数あるため、胆道癌治療薬へのDrug repositioningが可能である。本研究から派生したpNENへの効果も今後期待され、この治療戦略は胆膵領域に広く貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the potential of LPA receptor signaling as a novel therapeutic target in cholangiocarcinoma. Initially, we clarified the significance of lysophosphatidic acid (LPA)-LPA receptor signaling in the progression of cholangiocarcinoma. Subsequently, we confirmed the high expression of autotaxin (ATX), known as the LPA-producing enzyme, in clinical specimens and experimental cell lines of cholangiocarcinoma. We demonstrated the cancer-suppressing effects through ATX regulation (via transduction and inhibitors). As an extension of this study, we will also conduct experiments using pancreatic neuroendocrine tumor cells (pNEN), elucidating the significance of ATX expression regulation in pNEN.

研究分野：消化器内科

キーワード：胆道癌 オートタキシン

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は罹患数に対し死亡数の多いのが特徴的な癌とされ、近年その罹患数も増加の一途をたどっている。癌出現時には胆管閉塞により胆汁の十二指腸への流出障害を受けるため閉塞性黄疸・胆管炎を発症し、発症後 ADL に大きく影響する。癌の局在や周囲への広がりにより手術切除が困難なことも多く、集学的治療として化学療法の役割・期待は大きい。化学療法において近年の分子標的治療の発展は目覚ましく、消化器癌でも上皮成長因子受容体(EGFR)をターゲットとした大腸癌治療を始まりとし、分子標的治療の標準化が進んでいる。一方、胆道癌では殺細胞性抗癌剤であるジェムザール、シスプラチンおよび TS-1 の組み合わせ治療のみが標準治療であり、その治療効果も奏効率 10-30%程度で他癌腫に大きく後れを取っている。胆道癌の病態に適した全く新しい分子標的の解明が重要課題である。

我々の研究チームでは癌細胞膜上に過剰に存在する G 蛋白質共役受容体の代表であるリゾホスファチジン酸(LPA)受容体に着目して国内外で消化器癌を横断的に研究してきた。脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸(LPA)はオートタキシン(ATX)と呼ばれるリゾホスホリパーゼDを介して体内で合成され、6つのサブタイプからなる受容体を介して増殖性・運動性の亢進、抗アポトーシス作用など多彩な作用を有し、癌増殖因子として位置づけられている。我々の膵癌に対する ATX をターゲットとした新規治療の研究成果から、「胆道癌における LPA 受容体シグナルの新規治療ターゲットの可能性」の解明を目指した。

ATX をターゲットとした研究は、癌だけでなく炎症性疾患にも注目が集まっている。間質性肺炎において ATX 阻害薬を用いた第三相臨床試験が海外を中心に進んでおり、炎症性腸疾患に注目した研究も多い。ATX を制御することで、胆道内環境をターゲットとした炎症の制御も期待され、胆道癌における ATX/LPA 受容体シグナルの解明から、癌進展とともに局所の炎症という胆道癌に特有な二つの問題への合理的な治療戦略となることを期待して本研究を立案した。

2. 研究の目的

胆道癌進展における LPA 受容体シグナルの重要性と、ATX 制御による癌抑制効果及び抗炎症効果について明らかとし、胆道癌における LPA 受容体シグナルの新規治療ターゲットの可能性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

研究過程で得られた結果をもとに、当初予定していた研究の方法を適宜軌道修正し下記の実験を遂行した。

基礎実験

- (1) LPA シグナルの癌細胞へ影響：LPA 投与による胆道癌細胞株の増殖・浸潤への影響を評価し、ATX 阻害によるその抑制効果を検証する。
- (2) 胆汁中 ATX による胆道癌細胞への効果の検証：胆道癌細胞株に胆汁を投与し、増殖および浸潤能の変化を評価し、同条件下の ATX 阻害剤投与での変化を評価する。
- (3) 正常胆管との共培養による微小環境下での ATX の作用：ATX の高発現が確認できている正常胆管と胆管細胞株を共培養し、増殖・浸潤能の変化を評価。さらに ATX 阻害剤投与下での増殖・浸潤能に与える変化を測定。
- (4) 炎症性サイトカインと ATX の関連性の検証：胆管癌・正常胆管細胞への ATX 阻害剤投与による炎症性サイトカインの変化を評価する。
- (5) マウス皮下移植モデルを用いた in vivo 実験：ATX 阻害剤効果の評価を検証する。

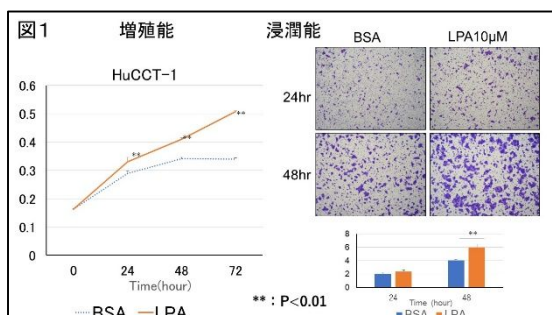
臨床検体(胆汁・血液・病変組織)を用いた実験

- (1) 胆汁中 ATX 濃度・活性値測定：胆道癌患者の胆汁中 ATX 濃度を同一患者の血清中および非癌患者(総胆管結石例)の胆汁中 ATX 濃度を ELISA で比較評価。
- (2) 胆道癌組織中の ATX および LPA 受容体発現レベル解析：免疫染色および PCR で評価。

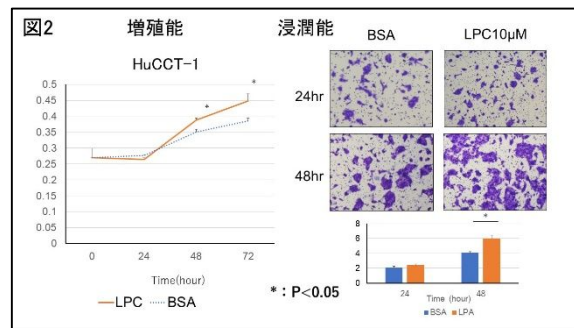
4. 研究成果

基礎実験

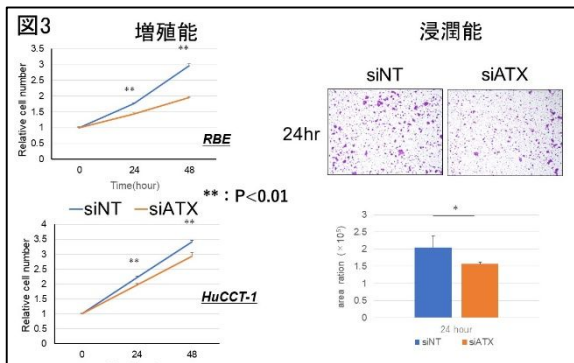
- (1) HuCCT-1 および RBE の胆道癌細胞株を用いて LPA の投与による増殖・浸潤能を評価したところ、LPA 投与によりそれぞれの癌細胞株の増殖能・浸潤能が亢進されることが確認された(図1)。一方、LPA 受容体 1/2/3 の発現量をj確認のうえ、それぞれを形質導入により Knockdown して増殖能・浸潤能を検証したが細胞増殖能・浸潤能に影



響を与えなかった。これらから、LPA 受容体単体ではなく、すべての受容体に共通するリガンドの制御が重要であることが示唆された。それを踏まえ、今度は LPA の前駆体である LPC を投与して同様の実験を行ったところ、LPC 投与でも癌細胞株の増殖能・浸潤能が亢進することが確認された(図2)。LPC から LPA の産生には ATX 活性が重要であることから、ATX を Knockdown して実験を行ったところ、細胞増殖・浸潤能の抑制が確認された(図3)。ATX 阻害剤 (PF-8380) を用いた実験においても、細胞増殖・浸潤能の抑制が確認され(図4)、ATX 制御が胆道癌進展に関わっていることを明らかとした。

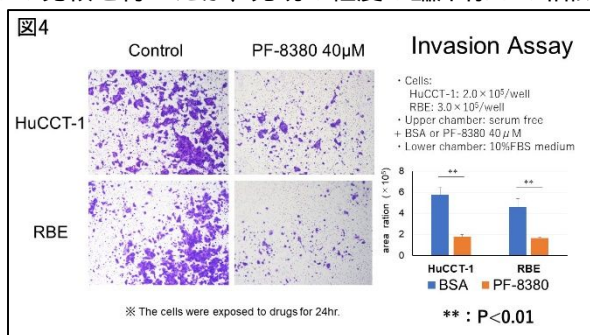


- (2) 臨床検体として採取した胆汁をフィルター処理したのちに胆道癌細胞株に投与し、増殖能・浸潤能を評価したが、胆汁の有無で変化が得られなかった。さらにこの条件下で ATX 阻害剤を添付して再評価したが、投与前後での変化も十分には得られなかった。胆汁自体貴重な臨床検体であったため、追加実験は行わなかった。
- (3) 正常胆管細胞株 (MMNK-1) の培養上澄液を用いて胆道癌細胞株の培養を行ったところ、細胞増殖能に影響を与えるも、有意な結果には至らなかった。上澄に対するコントロールの設定が難しかったのも要因であると考え、いろいろな条件で行ったが、有意な差が出る結果には至らなかった。
- (4) 炎症性サイトカインについて、IL-6, TNF- α , IL-1 β , CXCL2 を qt-PCR で評価したところ、ATX 阻害剤を用いることでこれらの発現が抑制されることが確認された。
- (5) マウスの皮下移植モデルにおいて、当初 RBE を用いて行ったがマウス皮下への生着に難渋。条件を変えながら行ったが、生着率が悪い事と、腫瘍自体の増大が緩慢なため、思うような結果が得られなかったため、HuCCT-1 を用いて実験を再度やり直すこととなった。この結果は本研究活動スタート支援期間中に完了しなかったが、現在遂行中であり、今後結果を確認していく。



臨床実験

- (1) 胆道癌患者と非胆道癌患者の胆汁中 ATX 活性および濃度を ELISA で測定したところ、胆道癌患者において活性高値が多いことを確認し、濃度においては、有意差はつかなかったが、胆道癌において高い傾向にあることが明らかとなった(胆道癌 vs 非胆道癌: 208 \pm 62.5ng/ml vs 149 \pm 42.7ng/ml; p=0.10)。血中とも比較したところ、有意差はつかないものの、胆汁中の方が ATX 活性・濃度が高い傾向にあることも確認できた。
- (2) ATX/LPA 受容体の発現について、臨床検体を用いて免疫染色で評価し、胆道癌における発現を確認した。臨床背景との比較を行ったが、発現の程度と臨床像との相関は得られなかった。一方、本研究の派生として、同時に膵神経内分泌腫瘍 (pNEN) に対して ATX 発現評価を行ったところ、pNEN では腫瘍において ATX の強発現が確認された(図5)。



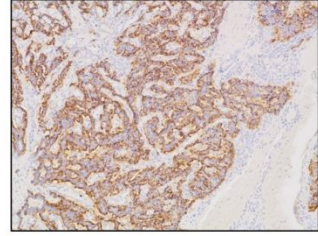
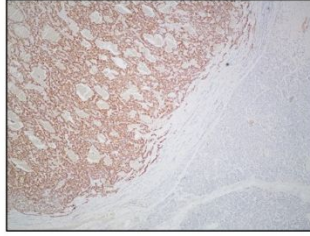
(まとめ)

研究活動スタート支援としての本研究で、胆道癌における ATX 制御の有用性を順に明らかとすることができた。研究を継続し、動物実験結果を踏まえ論文化していく。

また、臨床実験(2)に記載したとおり、本活動スタート支援での研究機関中に pNEN における ATX の発現が明らかとなった。胆道癌細胞株に計画していた実験について pNEN 細胞株 (BON-1・QGP-1) を用いた実験を立案し、本活動支援により、新たな別のプロジェクト擁立にも成功した。

図5

pNENにおけるATX染色



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Matoya Sho, Matsuura Kentaro, Kondo Hiromu, et.al	4. 巻 未掲載
2. 論文標題 The neutrophil to lymphocyte ratio at the start of the second course during atezolizumab plus bevacizumab therapy predicts therapeutic efficacy in patients with advanced hepatocellular carcinoma: A multicenter analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 未掲載
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13886	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 Yoshida Michihiro, Kondo Hiromu, Tanaka Yasuhito, et.al	4. 巻 114
2. 論文標題 Clinical impact of bile derived exosomal microRNAs as novel diagnostic and prognostic biomarkers for biliary tract cancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 295 ~ 305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15597	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
---------------------------	-----------------------	----

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