

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月30日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591524

研究課題名（和文） Autophagy に注目した膵癌薬剤耐性の機序解明と治療への応用

研究課題名（英文） Role of autophagy in the chemoresistance in pancreatic cancer.

研究代表者

大塚 隆生（OHTSUKA TAKAO）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20372766

研究成果の概要（和文）：

オートファジー(Autophagy)という新たな蛋白分解機構が提唱され、知見が集まりつつある。本研究では難治性膵癌の生物学的悪性度および治療耐性のメカニズムをAutophagyに注目して解明するとともに、Autophagyを標的とする新たな治療法を開発することを目的とした。膵癌細胞株にsalinomycinを投与すると濃度依存性にcell viabilityが低下し、autophagyが誘導された。これはAktやmTORといった増殖調節因子の発現抑制を介しており、同時に膵癌細胞株にアポトーシスが誘導されることも判明した。以上の結果より、膵癌細胞株においてautophagyが薬剤感受性を増強する可能性があることが示唆され、治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Autophagy has been recently identified as a new mechanism to maintain protein degradation, and lots of efforts have been made to clarify this complicated mechanism. The mains of this study were to investigate the roles of autophagy in biological behavior and chemoresistance in pancreatic cancer, and to show the possibility of autophagy for the application of the treatment of pancreatic cancer. Salinomycin decrease cell viability in pancreatic cancer cell lines in dose- and time-dependent manner, and also induced autophagy. Salinomycin decreased expression levels of Akt and mTOR, regulators of tumor progression, and induced apoptosis. Taken together, autophagy would increase chemo-sensitivity and might be applicable for the treatment of pancreatic cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵癌、オートファジー、薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

様々な悪性腫瘍が近年増加傾向にあるが、早期診断法や治療法が改善・開発され、多くの腫瘍で治療率が改善してきている。その中

で膵癌（通常型膵管癌）は早期発見が難しく、多くが高度進行癌として発見される上に生物学的悪性度が極めて高く、例え切除術を行っても5年生存率は20%未満である。これを

克服するためには膵癌の早期診断法開発と手術以外の有効な治療法の確立が望まれるが、未だ打開策は見出されていない。

近年、細胞内の恒常性を維持するオートファジー (Autophagy) という新たな蛋白分解機構が提唱され、知見が集まりつつある。Autophagy は細胞内で不要になった蛋白質を分解し、飢餓状態や各種ストレスが加わった際にアミノ酸の供給源となる重要な働きを持つ。Autophagy は癌細胞が抗癌剤のストレスから逃れるための防御機構 (薬剤耐性) として働くとの報告がある一方で、腫瘍細胞死を促進する働き (抗腫瘍作用) を示す報告もなされている。つまり Autophagy は腫瘍細胞が置かれた状況によって細胞死の回避 (アポトーシス関連遺伝子などの細胞死促進因子の分解による細胞増殖促進) あるいは細胞死の促進 (細胞増殖因子の分解) のいずれも選択しようと考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究では難治性膵癌の生物学的悪性度および治療耐性のメカニズムを Autophagy に注目して解明するとともに、Autophagy を標的とする新たな治療法を開発することを目的としている。すなわち、癌悪性度のメカニズム解明と新たな治療法開発をそれぞれ分けて研究するのではなく、同時に解決できる可能性を持つ Autophagy に着目している点に本研究の学術的な特色がある。

## 3. 研究の方法

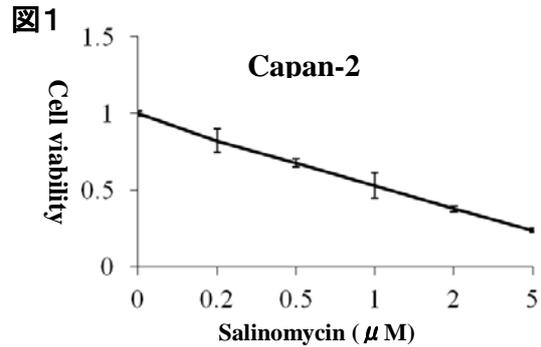
Autophagy 誘導薬剤である salinomycin を膵癌細胞株に投与し、autophagy が膵癌薬物療法において薬剤耐性を増強するものか、低下させるものかを明らかにすることを目的とした研究を行った。膵癌細胞株 SUIT-2, AsPC-1, Capan-2 に salinomycin を投与し、cell viability を PI アッセイ法で測定した。また salinomycin により autophagy が誘導されるかどうかを LC-3 の誘導を指標としてウエスタンブロット法で調べた。この際、actin を内因性コントロールとして用いた。さらに autophagy が誘導された際の特徴的な所見である autophagosome の形成を蛍光免疫組織化学染色法で確認した。さらに外因性にアデノウイルスによる LC-3 を遺伝子導入を行った状態での salinomycin 投与下の autophagosome 形成も確認した。

次にどのような機序で cell viability が低下するかを、特に細胞増殖能を司る中心的な役割を果たす Akt/mTOR 経路活性に注目してウエスタンブロット法で調べた。さらにアポトーシスが関与するかを caspase-3/7 活性測定と Annexin-V 法 (FACS) を用いて解析した。

## 4. 研究成果

SUIT-2, AsPC-1, Capan-2 に salinomycin を投与したところ、濃度依存性に cell

viability が低下した。Capan-2 を用いた PI アッセイの結果を図 1 に示す。



またこの際、Capan-2 細胞に autophagy が誘導されていることが、免疫組織化学染色法で確認できた。図 2 は Capan-2 に 1 μM の salinomycin を投与し、抗 LC-3 抗体で免疫染色を行ったところである。LC-3 (green) が凝結し、autophagosome を形成しているのがわかる。

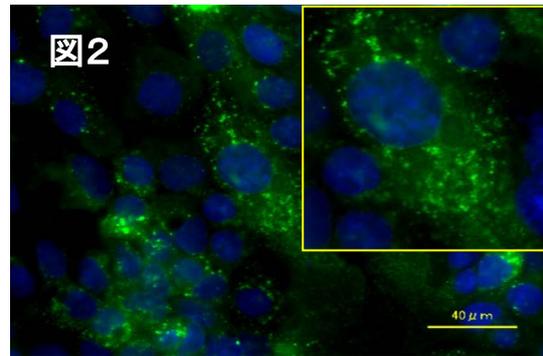


図 3 では Capan-2 細胞株に salinomycin を投与すると、LC-3 発現量が濃度依存性に増加することをウエスタンブロット法で示している。これは SUIT-2 や AsPC-1 でも同様の結果であった。

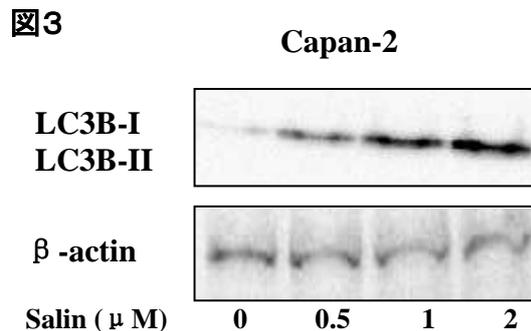


図 4 では膵癌細胞株の cell viability の抑制効果の機序を明らかにするために AsPC-1 と Capan-2 に salinomycin を投与し、Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR の発現量をウエスタンブロット法で確認したところ、salinomycin の濃度依存性、時間依存性にこ

これらの細胞増殖の調節因子の発現を抑制した。

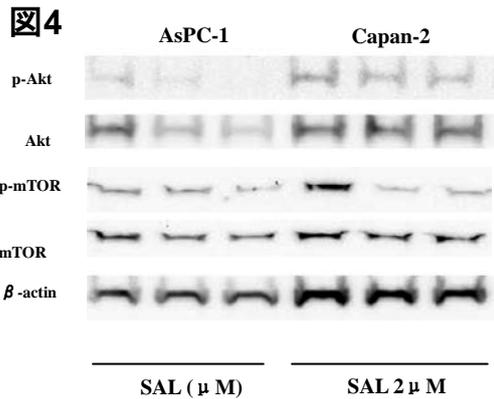
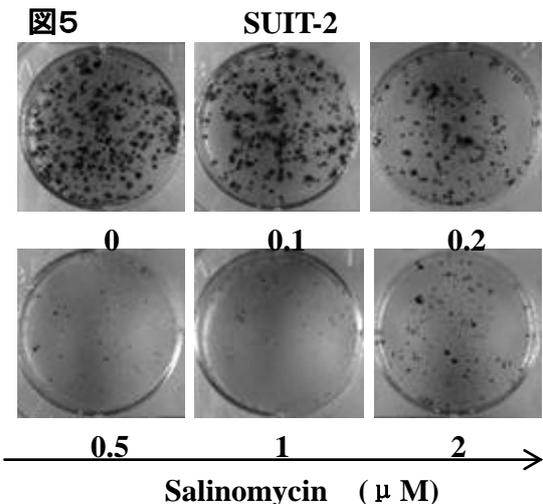
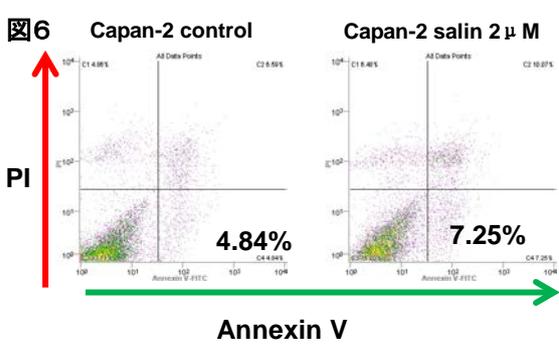


図5はSUIT-2細胞株では salinomyacin 濃度依存性に colony 数が減少していることを示している。図6では Capan-2 細胞株に salinomyacin を投与すると Annexin-V 陽性細胞が増加していることをしめしており、これは salinomyacin が膵癌細胞株にアポトーシスを誘導していることをしめしている。データは示さないが capping-3/7 活性上昇も認め、アポトーシス誘導を同様に示している。

以上の結果より、膵癌細胞株において autophagy が薬剤感受性を増強する可能性が



あることが示唆された。従って autophagy を



誘導する遺伝子をアデノウイルスにより強

制導入することにより薬剤感受性を増強することができる可能性があり、治療への応用が期待される。

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9件)

- (1) Fujita H, Ohtsuka T, et al. High EGFR expression is a prognostic factor for reduced survival in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. *Int J Oncol.* 査読有;38(3); 629-641, 2011.
- (2) Yasui T, Ohtsuka T, et al. Adenoviral therapy is more effective in gemcitabine-resistant pancreatic cancer than gemcitabine-sensitive cells. *Anticancer Res.* 査読有;31(4); 1279-1287, 2011.
- (3) Kurata N, Ohtsuka T, et al. Predicting the chemosensitivity of pancreatic cancer cells by quantifying the expression levels of genes associated with the metabolism of gemcitabine and 5-fluorouracil. *Int J Oncol.* 査読有;39(2); 473-482, 2011.
- (4) Ohuchida K, Ohtsuka T et al. MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol.* 査読有; 18(8); 2381-2387, 2011.
- (5) Nakamura M, Ohtsuka T, et al. Targeting the hedgehog signaling pathway with complementary peptides to Patched-1. *J Gastroenterol.* 査読有; 47(4); 452-460, 2012.
- (6) Ohuchida K, Ohtsuka T, et al. MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the HOXA1 gene. *Ann Surg Oncol.* 査読有; 19(7); 2394-2402, 2012.
- (7) Ikenaga N, Ohtsuka T, e al. Pancreatic cancer cells enhance the ability of collagen internalization via epithelial-mesenchymal transition. *Plos One.* 査読有; 7(7); e40434, 2012.
- (8) Tsutsumi K, Ohtsuka T, e al. Claudin-4 expression predicts survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 査読有; 19(sppul 3); 491-499, 2012.
- (9) Fujiwara K, Ohtsuka T, e al. CD271+ subpopulation of pancreatic stellate cells correlates with prognosis of

pancreatic cancer and is regulated by interaction with cancer cells. Plos One. 査読有; 7(12); e52682, 2012.

〔学会発表〕(計2件)

- (1). 安井隆晴、大塚隆生、ほか. ゲムシタビン耐性がアデノウイルスベクターを用いた治療に与える影響. 第111回日本外科学会定期学術集会、2011.5(紙上開催)、東京.
- (2). 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、ほか. 膵癌に対する放射線治療と gemcitabine 治療の交叉耐性についての検討. 第112回日本外科学会定期学術集会、2012年4月12日、千葉.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 隆生 (OHTSUKA TAKAO)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：20372766

### (2) 研究分担者

宮坂 義浩 (MIYASAKA YOSHIHIRO)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：40507795

水元 一博 (MIZUMOTO KAZUHIRO)  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号：90253418  
(2010年)

堤 宏介 (TSUTSUMI KOHSUKE)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：00467937  
(2010～2011年)

### (3) 連携研究者

なし