

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591013

研究課題名(和文)膵癌に対するGemcitabineの作用発現におけるHSP27の役割

研究課題名(英文)The role of HSP27 in the anti-tumor action of gemcitabine for pancreatic cancer

研究代表者

安田 一郎 (YASUDA, Ichiro)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00377673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌由来細胞株におけるGemcitabine(GEM)によるアポトーシスの誘導には、HSP27のリン酸化が重要な役割を果たしており、リン酸化HSP27(P-HSP27)の発現がGEM感受性を決定する因子であることを明らかにした。さらに、超音波内視鏡下針生検(EUS-FNA)によって得られた臨床病理検体と患者背景因子の検討によって、P-HSP27は遠隔転移(+)群よりも(-)群で有意に発現レベルが高く、高発現群は低発現群よりも有意に生存期間が長く、P-HSP27発現と臨床的悪性度に逆相関がみられた。一方、HSP27/P-HSP27がGEM化学療法の効果を予測できるという結果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We here revealed that phosphorylated HSP27 (P-HSP27) played a key role in gemcitabine (GEM)-induced apoptosis in pancreatic cancer derived cell line. Furthermore, the level of P-HSP27 was a factor to determine the sensitivity to GEM from the results of siRNA and inhibitor experiments. In addition, we examine the clinical significance of investigating the expression levels of HSP27 or P-HSP27 in the biopsied specimen of the pancreatic cancer using endoscopic ultrasound -guided fine needle aspiration (EUS-FNA) technique. As a result, the expression level of P-HSP27 was associated with the absence of metastasis and longer survival. These results suggest that the evaluation of the P-HSP27 expression in the biopsy specimen can be a prognostic factor to predict the prognosis. On the other hand, it was failed to proven that the expression level of HSP27 or P-HSP27 was a factor to predict the response to GEM chemotherapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵癌 Gemcitabine HSP27 EUS-FNA

1. 研究開始当初の背景

膵癌はわが国の癌死亡原因の第5位を占め、2006年には年間死亡者数が23,000人を超え、さらに年々増え続けている。膵癌は発見時にはすでに進行した状態であることが多く、その切除率は30%に満たない。現在、治療の中心は、局所進行例であれば全身化学療法あるいは放射線・化学療法であり、全身進行例であれば全身化学療法となる。化学療法については、現在 Gemcitabine (GEM) が第一選択の薬剤として世界中で広く使用されているが、実際にはその奏効率は20%程度であり、その恩恵を受けることができる患者は限られている。したがって、GEM の治療効果を前もって予測できれば、効果が期待できない症例に対して、当初から他の薬剤を選択することができ、より効率的な治療方針を立てることができる。

これまでに、GEM 感受性 (耐性) の視点から Human equilibrative nucleoside transporter, Ribonucleotide reductase M1 subunit, Drug transporter ABCG23)などが予測因子として報告されているが、未だ充分とは言えず、膵癌の病態・治療効果・予後を推測する良い指標の確立が求められている。治療効果を予測するためには、血清あるいは採取組織中に指標となるマーカーを見出さなくてはならないが、特に膵の組織採取はその解剖学的位置から体表からのアプローチでは困難であり、確定診断目的も含めてこれまで一般的には行われてこなかった。

超音波内視鏡 (EUS) は内視鏡の先端に超音波観測装置を装着した機器であり、これを用いてリアルタイム画像誘導下に針生検を行う手技である EUS ガイド下吸引針生検 (EUS-FNA) は、1992年にデンマークで開発されて以来、主に欧米において開発・普及が進められてきた。この手技を利用すれば、体表からのアプローチでは難しいとされてきた膵の組織採取を比較的容易に行うことができ、膵腫瘍の鑑別診断や膵癌の確定診断を行うことができる。

一方、ストレス蛋白質 (heat shock protein; HSP) は、熱や化学物質などのストレスにより誘導される一群の蛋白質の総称であり、分子量によって高分子量 HSP (HSP70、HSP90 など) と低分子量 HSP (HSP27、 α B クリスタリン、HSP20 など) に大別されている。高分子量 HSP については、ストレス応答に際して多種多様なタンパクの安定化に寄与する分子シャペロン作用を持つことが明らかとなってきたが、近年、種々のがん細胞における HSP90 の発現量と予後の関連性が報告され、HSP90 が腫瘍の増殖および転移に深く関与していることが推察され、新たな分子標的として期待されている。また、膵癌に対する HSP90 阻害剤の効果とその分子メカニズムの解析も最近報告されるようになってきている。これに対し低分子量 HSP は、リン酸化による修飾を受

けて重合体から単量体に解離し、核内へ移行することが知られているが、その具体的な機能については多くが明らかとされていない

2. 研究の目的

膵癌に対する化学療法の第一選択薬は現在 GEM であるが、治療前の効果予測が可能となれば、より効率的な治療法を選択できる。

そこで我々は、効果を予測するバイオマーカーとして低分子量ストレスタンパク質 HSP27に着目し、EUS-FNAにより得られた膵癌組織を用いてHSP27およびリン酸化型HSP27の発現量と臨床効果・予後との関係を検討する。具体的には、まず膵癌組織におけるHSP27の総蛋白量およびリン酸化型の発現量と、GEMの臨床効果・予後との関係を明らかにする。次いで、膵癌細胞において、HSP27がどのような機序で感受性に関与するかを細胞レベルで明らかにするため、変異型HSP27の作成およびそれらのstable transformant cell lineの樹立し、それらを用いたHSP27の機能解析および、GEM感受性に対する影響を明らかにする。さらに、変異HSP27のトランスジェニックマウスを作製し、膵化学発癌モデルでのGEM投与による腫瘍抑制効果を比較検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(平成23年度)

【病理組織における総 HSP27 およびリン酸化型 HSP27 の発現の解析】

当施設において化学療法前確定診断を目的に EUS-FNA による病理組織採取を行った膵癌症例のうち、GEM による化学療法を施行し、かつ投与後 6 ヶ月以上の予後が明らかで症例 150 例を対象とし、GEM 奏効群と無効群について、病理組織における総 HSP27 およびリン酸化型 HSP27 の発現様式を免疫組織染色にて比較検討する。

【変異 HSP27 プラスミドの作成とその機能解析】

HSP27 の 15、78、82 番目のセリン残基をアラニンに置換した恒常的非リン酸化型 HSP27 (3A) およびアスパラギンに置換した恒常的リン酸化型の変異 HSP27 プラスミド (3D) を site-directed mutagenesis 法にて作成する。次いで、膵癌細胞に遺伝子導入し、細胞の増殖能・転移能の違いや細胞内情報伝達に関わる因子 (MAP キナーゼ系、PI-3 キナーゼ/Akt 系など) への影響について control (empty) あるいは wild type (WT) と比較検討する。

【膵癌由来細胞における GEM 投与による HSP27 およびリン酸化型 HSP27 の変化の検討】

膵癌の GEM 感受性と低分子量ストレス蛋白質 HSP27 との関連についての細胞レ

ベルでの検討を行うため、in vitro において膵癌由来細胞株における HSP27 の機能解析を行う。各種膵がん細胞において GEM を添加することによる細胞内情報伝達経路への影響などを、ウェスタンブロット法で確認する。さらに GEM による HSP27 のリン酸化の変化を比較検討し、さらに short interfering RNA (siRNA) を用いて HSP27 あるいは p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) をノックダウンし、GEM の殺細胞効果への影響を MTT assay、immunoblot 法あるいは RT/PCR 法で検討する。

(平成 24 年度)

【変異 HSP27 の stable transformant cell line を用いたリン酸化型 HSP27 の機能解析】

平成 23 年度に作成した変異 HSP27 プラスミドを用いて、以下のような検討を行う。

Panc1 細胞に変異型 HSP27 の遺伝子を恒常的に導入し stable transformant cell line を樹立後、細胞増殖やアポトーシスなどの細胞機能の変化を MTT assay・immunoblot 法・ウェスタンブロット法で検討し、変異 HSP27 による VEGF 産生、その他転移能マーカー(MMP, t-PA など)の変化についても検討する。さらに、各種抗がん剤の殺細胞効果における変異 HSP27 の影響を MTT assay, immunoblot 法あるいは RT/PCR 法で検討、リン酸化型および非リン酸化型 HSP27 の免疫蛍光染色を行い、GEM 投与によるそれぞれの局在の変化を Wild type(WT)と比較検討する。

(平成 25 年度)

【変異 HSP27 のトランスジェニックマウスの作成】

変異 HSP27 プラスミドを用いて、トランスジェニックマウスの作成を行い、in vivo での解析を進める。

4. 研究成果

膵癌由来細胞株 (Panc1, KP3) において GEM 感受性と HSP27 リン酸化の関係について検討したところ、GEM は p38 MAPK, MAPK-activated protein kinase 2 (MAPKAPK-2) の活性化に続いて、HSP27 の全体量に影響を与えることなく 15、78、82 番目のセリン残基のリン酸化を起こし、細胞増殖を抑制してアポトーシスを誘導した。さらに変異 HSP27 プラスミドの作成とその機能解析については、HSP27 の 15、78、82 番目のセリン残基をアラニンに置換した恒常的非リン酸化型 HSP27 (3A) およびアスパラギンに置換した恒常的リン酸化型の変異 HSP27 (3D) を作成し、膵癌細胞に遺伝子導入し細胞の増殖能・転移能の違いや細胞内情報伝達に

関わる因子への影響について検討した結果、control (empty) と wild type (WT) の間に細胞増殖能に有意な差を認めなかったものの、3D は 3A に対し細胞増殖能の遅延を認めた。また GEM に対する反応については empty と WT の間に有意な差は認めなかった。これらの結果から、GEM によるアポトーシスの誘導には HSP27 のリン酸化が重要な役割を果たしており、総 HSP27 ではなく、リン酸化 HSP27 の発現レベルが GEM 感受性を決定する因子であると考えられた。

膵癌診断時に EUS-FNA によって得られた病理検体を用いて、HSP27 および P-HSP 発現と病理組織学的悪性度、臨床的悪性度、化学療法 (GEM) に対する反応性との相関について検討したところ、HSP27 発現と組織学的悪性度 (分化度)、臨床病期 (遠隔転移の有無)、化学療法 (GEM) に対する反応性、予後 (生存期間) との間に関連性はみられなかったが、P-HSP については遠隔転移のない群では有る群よりも有意に P-HSP27 の発現レベルが高く、また、P-HSP27 高発現群では低発現群よりも有意に生存期間が長かった。すなわち、P-HSP27 の発現と膵癌の臨床的悪性度には逆相関がみられ、EUS-FNA によって得られた生検検体中の P-HSP27 発現を評価することにより、膵癌の予後が予測できる可能性が示唆された。なお、今回の検討では、HSP27 あるいは P-HSP27 が化学療法 (GEM) の効果を予測する因子になりうるという結果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 51 件)

(以下の論文、全て査読有り)

1. Impact of anticancer treatment on recurrent obstruction in covered metallic stents for malignant biliary obstruction. Nakai Y, Yasuda I, et al. J Gastroenterol. 2013;48:1293-9.
2. Two rare cases of a solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas. Saigo C, Yasuda I, et al. Oncol Lett. 2013;6:871-874.
3. Serum level of soluble tumor necrosis factor receptor 2 is associated with the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with the R-CHOP regimen. Nakamura N, Yasuda I, et al. Eur J Haematol. 2013;91:322-31.
4. Comparison of long-term outcomes after endoscopic sphincterotomy versus endoscopic papillary balloon dilation: A propensity score-based cohort analysis. Doi S, Yasuda I, Adachi S, et al. J Gastroenterol. 2013; 48: 1090-6.

5. Endoscopic ultrasound-guided antegrade treatments for biliary disorders in patients with surgically altered anatomy. Iwashita T, Yasuda I, et al. *Dig Dis Sci*. 2013;58:2417-22.
6. Percutaneous transgallbladder rendezvous for enteroscopic management of choledocholithiasis in patients with surgically altered anatomy. Okuno M, Yasuda I, et al. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48:974-8.
7. Japanese multicenter experience of endoscopic necrosectomy for infected walled-off pancreatic necrosis: The JENIPaN study. Yasuda I, et al. *Endoscopy*. 2013;45:627-34.
8. Tumor necrosis factor- α promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells. Osawa Y, Yasuda I, Kozawa O, et al. *PLoS One*. 2013;8:e65251.
9. Recent advances in endoscopic management of difficult bile duct stones. Yasuda I, Itoi T. *Dig Endosc*. 2013;25:376-85.
10. Endoscopic biliary stenting and pancreatitis. Yasuda I. *Clin J Gastroenterol*. 2013; 6: 193-7.
11. Unilateral versus bilateral endoscopic biliary stenting for malignant hilar biliary strictures. Yasuda I, et al. *Dig Endosc*. 2013;25 Suppl 2:81-5.
12. Endoscopic ultrasonography-guided pancreatic duct access: techniques and literature review of pancreatography, transmural drainage and rendezvous techniques. Itoi T, Yasuda I, et al. *Dig Endosc*. 2013;25:241-52.
13. Endoscopic ultrasound-guided celiac ganglia neurolysis vs. celiac plexus neurolysis: a randomized multicenter trial. Doi S, Yasuda I, et al. *Endoscopy*. 2013;45:362-9.
14. Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of metastatic colon cancer. Osawa Y, Yasuda I, Kozawa O, et al. *J Clin Invest*. 2013;123:834-43.
15. The role of peroral video cholangioscopy in patients with IgG4-related sclerosing cholangitis. Itoi T, Yasuda I, et al. *J Gastroenterol*. 2013;48:504-14.
16. New fully-covered self-expandable metal stent for endoscopic ultrasonography-guided intervention in infectious walled-off pancreatic necrosis (with video). Itoi T, Yasuda I, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013;20:403-6.
17. Preoperative routine evaluation of bilateral adrenal glands by endoscopic ultrasound and fine-needle aspiration in patients with potentially resectable lung cancer. Uemura S, Yasuda I, et al. *Endoscopy*. 2013;45:195-201.
18. Metallic stents are more efficacious than plastic stents in unresectable malignant hilar biliary strictures: a randomized controlled trial. Mukai T, Yasuda I, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013;20:214-222.
19. Endoscopic ultrasound-guided antegrade papillary balloon dilation for treating a common bile duct stone. Iwashita T, Yasuda I, et al. *Dig Endosc*. 2013;25:89-90.
20. A randomized phase II study of gemcitabine and S-1 combination therapy versus gemcitabine monotherapy for advanced biliary tract cancer. Sasaki T, Yasuda I, et al. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71:973-9.
21. A multicenter, prospective, randomized study of selective bile duct cannulation performed by multiple endoscopists: the BIDMEN study. Kawakami H, Yasuda I, et al; Japan Bile Duct Cannulation Study Group. *Gastrointest Endosc*. 2012;75:362-372.
22. UVC irradiation suppresses platelet-derived growth factor-BB-induced migration in human pancreatic cancer cells. Kawaguchi J, Adachi S, Yasuda I, Kozawa O, et al. *Oncol Rep*. 2012;27:935-9.
23. Temporary placement of covered self-expandable metallic stents in the management of benign biliary strictures. Yasuda I, et al. *Dig Endosc*. 2012;24(Suppl 1): 28-33.
24. Infected mediastinal cyst following EUS-FNA with rupture into the esophagus. Iwashita T, Yasuda I, et al. *Dig Endosc*. 2012;24: 386.
25. Serum soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) level is associated with the outcome of patients with diffuse large B cell lymphoma treated with R-CHOP regimens. Goto N, Yasuda I, et al. *Ann Hematol*.

- 2012;91:705-714.
26. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy for diagnosis of lymphoproliferative disorders: Feasibility of immunohistological, flow cytometric, and cytogenetic assessments. Yasuda I, Adachi S, et al. *Am J Gastroenterol*. 2012;107:397-404.
 27. The Yield of EUS-guided Fine Needle Aspiration Using a Conventional 19-gauge Needle for Histological Diagnosis of Autoimmune Pancreatitis. Iwashita T, Yasuda I, et al. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10:316-322.
 28. Serum soluble CD27 level is associated with outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. Goto N, Yasuda I, et al. *Leuk Lymphoma*. 2012;53:1494-1500.
 29. Comparison of partially covered nitinol stents with partially covered stainless stents as a historical control in a multicenter study of distal malignant biliary obstruction: the WATCH study. Isayama H, Yasuda I, et al. *Gastrointest Endosc*. 2012;76:84-92.
 30. Cisplatin and ultra-violet-C synergistically down-regulate receptor tyrosine kinases in human colorectal cancer cells. Kawaguchi J, Adachi S, Yasuda I, Kozawa O, et al. *Mol Cancer*. 2012;12:11:45.
 31. Endoscopic necrosectomy for infected pancreatic necrosis. Yasuda I. *Gastrointest Interv*. 2012;1:36-39.
 32. Cholangioscopic view of IgG4-related sclerosing cholangitis. Yasuda I, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2011;18:122-124.
 33. Predictive factors for pain relief after endoscopic ultrasound-guided celiac plexus neurolysis. Iwata K, Yasuda I, et al. *Dig Endosc*. 2011;23:140-145.
 34. Results of a Japanese multicenter randomized trial of endoscopic stenting for non-resectable pancreatic head cancer (JM-TEST): Covered Wallstent versus Double layer stent. Isayama H, Yasuda I, et al. *Dig Endosc*. 2011;23:310-315.
 35. Endoscopic hemostasis using covered metallic stent placement for uncontrolled post-endoscopic sphincterotomy bleeding. Itoi T, Yasuda I, et al. *Endoscopy*. 2011;43:369-372.
 36. Rho-kinase inhibitor upregulates migration by altering focal adhesion formation via the Akt pathway in colon cancer cells. Adachi S, Yasuda I, Kozawa O, et al. *Eur J Pharmacol*. 2011;650:145-150.
 37. Role of EUS in early detection of small pancreatic cancer. Yasuda I, et al. *Dig Endosc*. 2011;23 (Suppl 1): 22-25.
 38. Comparison of axial force and cell width of self-expandable metallic stents: which type of stent is better suited for hilar biliary strictures? Mukai T, Yasuda I, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2011;18:646-652.
 39. Serum interleukin-18 level is associated with the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP or R-CHOP regimens. Goto N, Yasuda I, et al. *Eur J Haematol*. 2011;87:217-227.
 40. EUS-FNA for suspected malignant biliary strictures after negative endoscopic transpapillary brush cytology and forceps biopsy. Ohshima Y, Yasuda I, et al. *J Gastroenterol*. 2011;46:921-928.
 41. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of lesions near the aortoiliac bifurcation via an upper gastrointestinal approach. Doi S, Yasuda I, Adachi S, et al. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26:1717-20.
 42. Ultraviolet irradiation can induce evasion of colon cancer cells from stimulation of epidermal growth factor. Adachi S, Yasuda I, Kozawa O, et al. *J Biol Chem*. 2011;286:26178-26187.
 43. UV-C irradiation induces downregulation of EGF receptor via phosphorylation at Serine 1046/1047 in human pancreatic cancer cells. Yamauchi T, Adachi S, Yasuda I, Kozawa O, et al. *Radiat Res*. 2011;176:565-574.
 44. Inhibition of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase enhances the activation of epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer cells. Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Kozawa O, et al. *Molecular Cancer*. 2011;10:79.
 45. Ultra-violet irradiation induces apoptosis via mitochondrial pathway

- in pancreatic cancer cells. Yamauchi T, Adachi S, Yasuda I, Kozawa O, et al. Int J Oncol. 2011;39:1375-1380.
46. Ultraviolet enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine by activation of 5' AMP-activated protein kinase. Adachi S, Yasuda I, Kozawa O, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2011;414:53-59.
47. Phosphorylation status of heat shock protein 27 plays a key role in gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Kozawa O, et al. Cancer Lett. 2011;313:218-225.
48. Carbon dioxide insufflation vs. conventional saline irrigation for peroral video cholangioscopy. Doi S, Yasuda I, et al. Endoscopy. 2011;43:1070-5.
49. Combined endobronchial and endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for mediastinal nodal staging of lung cancer. Ohnishi R, Yasuda I, et al. Endoscopy. 2011;43:1082-9.
50. Combined adenomatoid tumor and well differentiated papillary mesothelioma of the omentum. Hatano Y, Yasuda I, et al. Pathology International. 2011;61:681-685.

〔学会発表〕(計 47 件)

1. UEGW2013
2013年10月15日 Berlin
Long-term outcomes following endoscopic ultrasound-guided celiac plexus neurolysis. Doi S, Yasuda I, et al.
2. 第44回日本膵臓学会大会
2013年7月25日 仙台
局所進行膵癌に対する術前化学放射線療法(TS-1+Radiation)の成績. 土井晋平、安田一朗ら
3. 第85回日本消化器内視鏡学会総会
2013年5月10日 京都
The 4th ESGE-JGES Joint Symposium. International Symposium“ Endoscopic therapy of pancreatic and biliary diseases ” Interventional EUS for pancreatic diseases. Yasuda I.
4. JDDW2012 2012年10月12日 神戸.
シンポジウム17「Role of oncologists and endoscopists in the management of biliary tract and pancreatic diseases」Chemotherapy and endoscopic management for patients with unresectable advanced

- pancreatic cancer. Mukai T, Yasuda I, Tomita E.
5. JDDW2012 2012年10月10日 神戸
膵がん治療における gemcitabine と紫外線(UV-C)の併用効果について. 足立政治、安田一朗ら
6. 18th International Symposium on Endoscopic Ultrasonography (EUS 2012) 2012年9月6日 St. Petersburg
Endoscopic ultrasound-guided direct celiac ganglia versus celiac plexus neurolysis: a randomized multi-center trial. Doi S, Yasuda I, et al.
7. 第98回日本消化器病学会総会
2012年4月21日 東京
ゲムシタピン作用機序における HSP27リン酸化の役割. 中島賢憲、足立政治、安田一朗、小澤 修ら
8. 第98回日本消化器病学会総会
2012年4月19日 東京
膵がん細胞に対する短波長紫外線(UV-C)とゲムシタピン併用による腫瘍増殖抑制およびアポトーシス誘導効果. 山内貴裕、足立政治、安田一朗、小澤 修ら
9. 第42回日本膵臓学会大会
2011年7月30日 弘前
膵がんの細胞増殖能における Rho-kinase の役割. 足立政治、安田一朗、小澤 修ら

6. 研究組織

(1)研究代表者

安田 一朗 (YASUDA, Ichiro)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00377673

(2)研究分担者

小澤 修 (KOZAWA, Osamu)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90225417

(3)研究分担者

足立 政治 (ADACHI, Seiji)
岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：50467205