

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890172

研究課題名(和文) 通常型膵癌におけるオートファジーの機能解析と新しい膵癌治療法への応用

研究課題名(英文) The role and new therapeutic strategy of autophagy in pancreatic cancer.

研究代表者

橋本 大輔 (HASHIMOTO, Daisuke)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80508507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つである。全ての体細胞内に存在し、ストレス下や低栄養環境、低酸素環境で細胞内コンポーネントのリサイクルを行う。我々はこれまでの研究で、オートファジーは膵癌で細胞保護的に働いていることを明らかにした。つまりオートファジーを抑制することが、新しい膵癌治療法となる可能性を示した。今後予後との関連を解析する。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a regulated process of degradation and recycling of cellular constituents. We showed that autophagy is up-regulated in human pancreatic cancer and contributes to pancreatic cancer cell growth, and has a cytoprotective effect against anti-cancer drug in pancreatic cancer cells. Combination therapy of these anticancer drugs and chloroquine should be investigated.

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

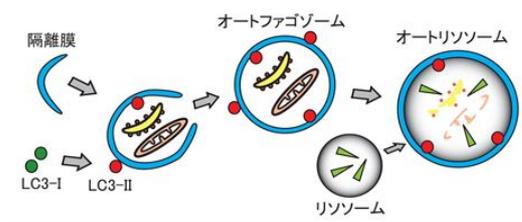
キーワード：オートファジー 膵癌 5-FU ゲムシタピン クロロキン

1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーについて

オートファジーとは自食 (self-eating) のことであり、細胞が自身をリソソームで分解する系の総称である。酵母から哺乳類にいたるまで幅広く全身の細胞で保存されているシステムである。オートファジーは細胞内の異常なタンパク質の蓄積を防いだり、栄養飢餓時に細胞内コンポーネントのリサイクルを行なうことで生体の恒常性維持に関与している(図1) (Mizushima N et al. Mol Biol Cell 2004, 15, 1101-1111)。

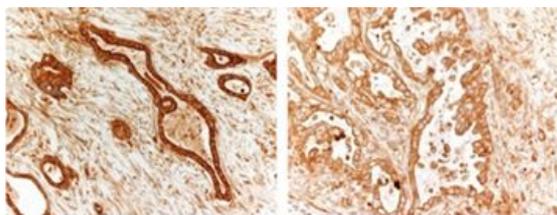
図1



(2) 膵癌とオートファジー

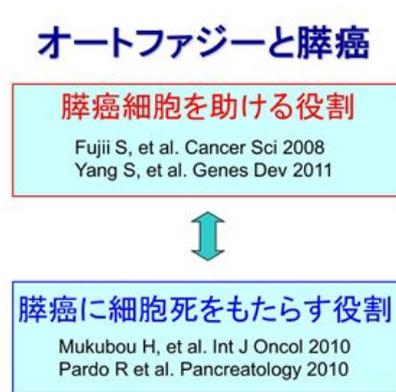
オートファジーは発癌や癌の発育において、重要な役割を担うと考えられている (Kimmelman A. Genes Dev 2011, 25, 1999-2010)。膵癌におけるオートファジーの役割についても、興味ある報告がなされつつある。Fujii らはヒト膵癌標本を、オートファゴソーム関連タンパクである LC3(図1)に対する免疫染色で解析し、膵癌組織でオートファジーが誘導されていることを示した(Fujii S et al. Cancer Sci 2008, 99, 1813-1819)。Yang らも同じくヒト膵癌組織でオートファジーが誘導されていることを示した(Yang S et al. Genes Dev 2011, 25, 717-729)(図2)。

図2



一方 Mukubou らと Pardo らは抗癌剤ゲムシタピン(Gemcitabine, GEM)を投与すると膵癌細胞株にオートファジーが誘導され、オートファジー阻害薬を膵癌細胞株に投与すると、GEM の細胞毒性を減弱したと示した。つまり、オートファジーは積極的に膵癌細胞死に貢献していると考えている(Mukubou H et al. Int J Oncol 2010, 37, 821-828, Pardo R et al. Pancreatolgy 2010, 10, 19-26)。つまり膵癌におけるオートファジーの役割については、二つの相反する考えが示されている。膵癌細胞を助け、成長に貢献しているという考えと、抗癌剤投与などがオートファジーを引き起こし、積極的に膵癌細胞を死に到らせるという考えである(図3)。

図3



2. 研究の目的

本研究は以下の検証を目的とした。

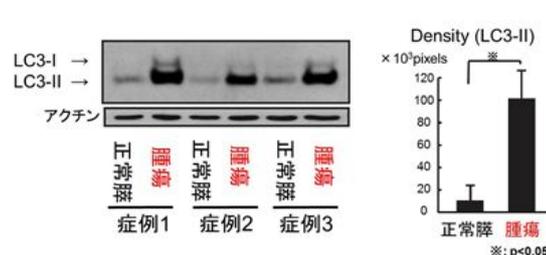
- (1) オートファジーが膵癌において活性化されているか、予後との関わりがあるかを prospective に解析し明らかにする。
- (2) 複数の膵癌細胞株を用いて、抗癌剤治療に際してオートファジーが膵癌に誘導される仕組みと、具体的な機能を明らかにする。
- (3) 膵癌細胞株を用いて、癌細胞のオートファジーを効率よく抑制する手法を開発する。
- (4) 担癌マウス(膵癌細胞の xenograft)において、オートファジーを抑制することでの抗腫瘍効果を検証する。さらに既存の抗癌剤との併用治療を検証する。

3. 研究の方法

(1) 膵癌患者における、オートファジーの誘導と予後との関連

我々は3症例の通常型膵癌患者の手術に際し、腫瘍と正常膵からそれぞれ生検を行なった。タンパクサンプルを生成し、LC3 に対するウェスタンブロッティングを行なった(図4)。全ての症例の癌組織で、正常膵組織に比べて明らかに強く LC3-II が発現しており、つまりオートファジーが強く誘導されていた。更に症例を重ね、オートファジーの誘導の程度と予後との関連を prospective に解析する。

図4

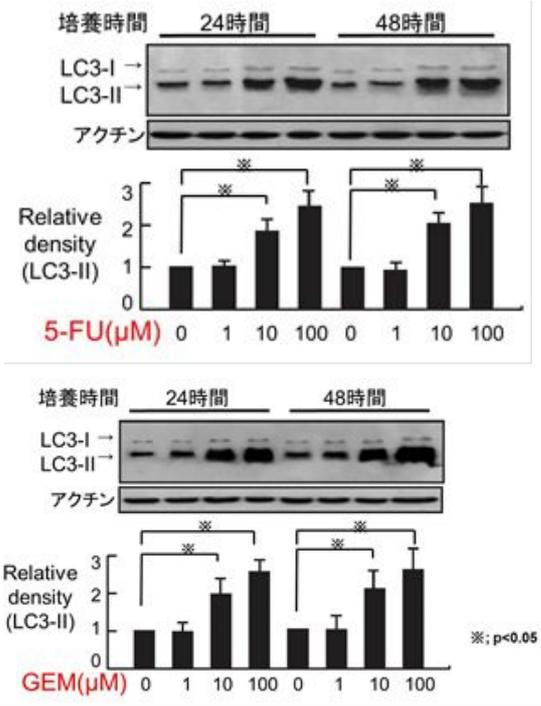


(2) 膵癌細胞にオートファジーに誘導される仕組みと、具体的な機能の解明

我々は膵癌細胞株 PANC-1 に抗癌剤 5-fluorurcil (5-FU) または GEM を投与すると、

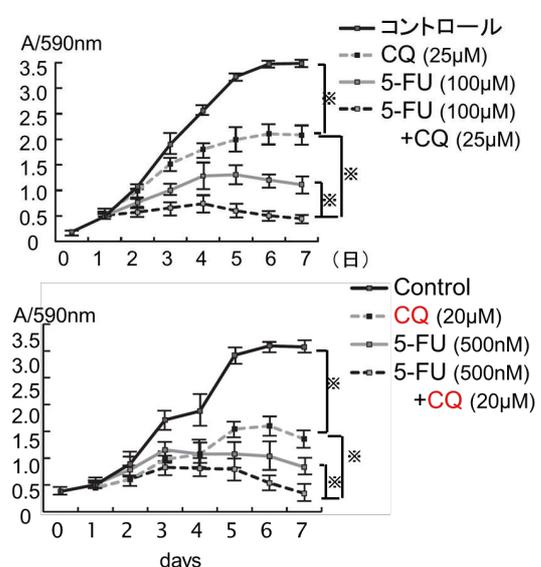
強いオートファジーが誘導されることを明らかにした(図5)。

図5



クロロキン(chloroquine; CQ)は、オートリソソームにおける分解を阻害する(Yang S et al. Genes Dev 2011, 25, 717-729)。PANC-1 に抗癌剤 5-FU または GEM と CQ を同時に投与すると、抗癌剤を単独投与した場合に比べて有意に強く細胞増殖を抑制した(図6)。また CQ は単独でも PANC-1 の細胞増殖を抑制した。つまり、オートファジーは膵癌の成長に積極的に貢献しており、抗癌剤に対して細胞保護的に働いていることがわかった。本研究では更に複数の膵癌細胞株を用いて、膵癌細胞にオートファジーが誘導される仕組みと、癌細胞内における具体的な機能の詳細を明らかにしていくことを目的とした。

図6



### (3) 膵癌治療への臨床応用を前提としたオートファジー阻害薬の開発

我々はオートファジー阻害薬として、クロロキンを生じた。これは慢性関節リウマチなどに対して適応があり、膵癌患者にも使用しうると思われる。一方、CQには網膜症など無視できない副作用を生じることもある。また免疫抑制作用もあり、抗癌剤と併用した場合の安全性も未知である。よって、臨床応用を前提として、より安全にオートファジーを抑制する手法を開発することを目的とした。

### (4) 膵癌マウスを用いたオートファジー阻害薬の抗腫瘍効果の検証

膵癌マウスを用いてオートファジー阻害薬の抗腫瘍効果を検証する。我々はこれまで、急性膵炎の発症においてオートファジーが重要な役割を担っていることを、遺伝子ノックアウトマウスを用いて明らかにするなど、オートファジーの動物実験および組織学的、生化学的解析に関して十分な技術と経験がある(Hashimoto D et al. J Cell Biol 2008, 181, 1065-1072)。

オートファジー阻害薬 CQ の単独投与の他、抗癌剤 5-FU や GEM との併用投与の効果と安全性を検証し、また新たなオートファジー阻害薬の、クロロキンに比べた場合の抗腫瘍効果や安全性を検討することを目的とした。

## 4. 研究成果

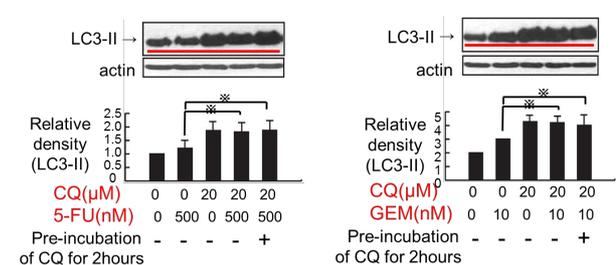
### (1) 膵癌患者における、オートファジーの誘導と予後との関連

2012年4月から2014年3月まで32例の通常型膵癌に対して切除手術を行った。この症例の切除検体(癌部および通常膵実質部)を用いて、オートファゴソームのマーカーであるLC3に対するウェスタンブロッティングを行っている。通常膵実質部に比べて癌部でLC3の発現が亢進している傾向があるが、条件設定にやや難渋している。今後予後との関連を解析する。

### (2) 膵癌細胞にオートファジーに誘導される仕組みと、具体的な機能の解明

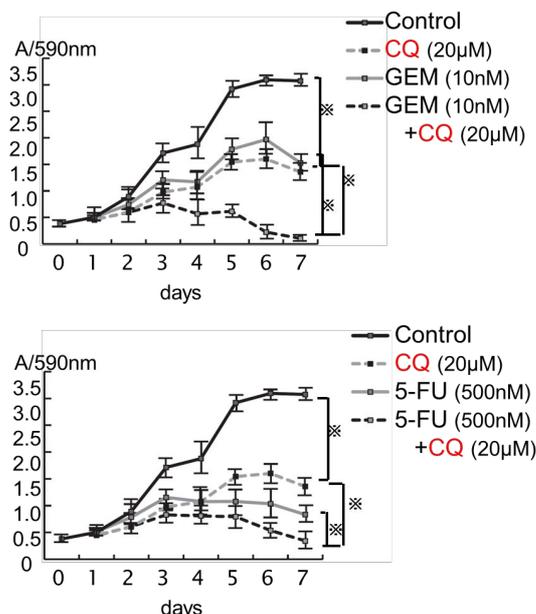
膵癌細胞株 BxPC-3 に抗癌剤 5-FU または GEM を投与すると、PANC-1 同様強いオートファジーが誘導された(図7)

図7



また BxPC-3 に抗癌剤 5-FU または GEM と CQ を同時に投与すると、抗癌剤を単独投与した場合に比べて有意に強く細胞増殖を抑制した(図 8)。また CQ は単独でも PANC-1 の細胞増殖を抑制した。

図 8



### (3) 膵癌治療への臨床応用を前提としたオートファジー阻害薬の開発

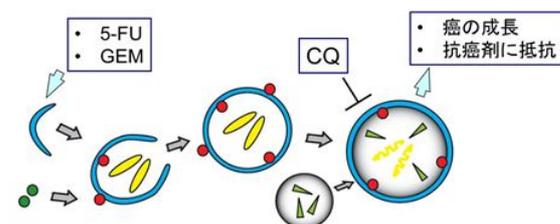
既知の他のオートファジー阻害薬の抗腫瘍効果の検証や、膵癌への drug delivery system の開発を進めている。

### (4) 膵癌マウスを用いたオートファジー阻害薬の抗腫瘍効果の検証

膵特異的変異型 KRAS 発現マウスをベースとした、膵癌モデルマウスの樹立を行っている。モデルが確立され次第、オートファジー阻害薬の有効性、安全性を検証していく。

以上のように我々は、オートファジーは膵癌の成長に積極的に貢献しており、抗癌剤に対して細胞保護的に働いていることを示した(図 9)。今後も前述の研究を継続していく。

図 9



## 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 6 件)

Hashimoto D, Chikamoto A, Ohmura M, Abe S, Nakagawa S, Beppu T, Takamori H, Hirota M, Baba H. Impact of Postoperative Weight Loss on Survival After Resection for Pancreatic Cancer. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2014 Jan 31. [Epub ahead of print] 査読有  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486859>

Hashimoto D, Bläuer M, Hirota M, Ikonen NH, Sand J, Laukkarinen J. Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. Eur J Cancer. 2014 May;50(7):1382-90. 査読有  
DOI: 10.1016/j.ejca.2014.01.011.

Hashimoto D, Hirota M, Yagi Y, Baba H. End-to-side pancreaticojejunostomy without stitches in the pancreatic stump. Surg Today. 2013 Jul;43(7):821-4. 査読有  
DOI: 10.1007/s00595-012-0371-x.

Hashimoto D, Hirota M, Yagi Y, Baba H. Hyaluronate carboxymethylcellulose-based bioresorbable membrane (Seprafilm) reduces adhesion under the incision to make unplanned re-laparotomy safer. Surg Today. 2012 Sep;42(9):863-7. 査読有  
DOI: 10.1007/s00595-012-0191-z.

Hashimoto D, Hirota M, Matsukawa T, Yagi Y, Baba H. Clinical features of strangulated small bowel obstruction. Surg Today. 2012 Nov;42(11):1061-5. 査読有  
DOI: 10.1007/s00595-012-0207-8.

Hirota M, Hashimoto D, Ishiko T, Satoh N, Takamori H, Chikamoto A, Tanaka H, Sugita H, Sand J, Nordback I, Baba H. Distal pancreatectomy using a no-touch isolation technique. Scand J Surg. 2012;101(3):156-9. 査読有  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Distal+pancreatectomy+using+a+no-touch+isolation+technique>.

〔学会発表〕(計 2 件)

Hashimoto D, Merja Bläuer, Juhani Sand, Masahiko Hirota, Johanna Laukkarinen. Autophagy in BxPC-3 human pancreatic cancer cells is similar to PANC-1 when treated with anticancer drugs and inhibitors of autophagy. The 45th Annual Meeting of the European Pancreatic Club, 2013.6.27. Zurich, Switzerland.

橋本 大輔、「膵癌におけるオートファジー

の役割と癌治療への応用」、第 50 回日本癌治療学会学術集会、2012 年 10 月 25 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

〔図書〕（計 1 件）

Hashimoto D, Nova Science Publishers, Inc. (USA), Autophagy in Pancreatic Diseases. Pancreas: Anatomy, Diseases and Health Implications. 19page, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権 Daisuke  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 大輔 (HASHIMOTO, Daisuke)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80508507