

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462107

研究課題名(和文) 膵癌放射線治療における線維化ならびに抗癌治療誘発EMT抑制に関する研究

研究課題名(英文) Study of suppression of fibrosis and EMT in pancreatic cancer radiation therapy

研究代表者

中川原 寿俊 (Nakagawara, Hisatoshi)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：30401904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、EMT抑制効果があることが報告されているHDAC阻害薬とタキサン系抗癌剤が癌細胞の放射線感受性にどのような影響を与えるか検討するとともに、同薬剤による膵星細胞におけるEMT誘導抑制効果について検討した。さらに膵癌細胞の微小環境を明らかにするために、血小板とEMTとの関係についても検討し明らかにすることを目的とした。今回の研究では、HDAC阻害薬とタキサン系抗癌剤が放射線感受性を増強することが明らかとなり、これらの薬剤が星細胞株のEMTを抑制することを実験的に示した。一方で、膵癌においてEMT抑制のためには、血小板凝集を抑制することが重要であることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effect of valproic acid (VPA) and taxan for radiosensitivity in esophageal cancer, and investigated inhibitory effect of Epithelial-mesenchymal transition (EMT) using VPA and taxan for pancreatic stellate. Correlation EMT and platelet aggregation in the microenvironment of pancreatic cancer was clarified. VPA enhances cancer cells radiosensitivity by chromatin decondensation and down regulation of DNA double strand break repair proteins. Docetaxel (DTX) induced G1 and G2-M accumulation in esophageal cancer cell, respectively. Low dose DTX could yield radiosensitivity with induction of G1 arrest, although low dose DTX had limited cytotoxic effect. It has been shown that taxan (paclitaxel) and histone deacetylase (HDAC) inhibitor (sodium valproate) suppress the induction of EMT in pancreatic stem cell line in current study. But it has also been shown that the suppression of platelet aggregation has an important role of inhibition of the EMT in pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：EMT 血小板凝集抑制 HDAC阻害薬 タキサン系抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

外科手術や内科的治療の進歩により膵癌患者の予後は改善されてきたにも関わらず、切除率は約30%と低く、切除された症例でも5年生存率は10~20%程度と治療成績は依然として不良である。放射線療法は、以前は非切除膵癌症例にのみ適応とされ、姑息的な治療法であったが、近年、術前加療として行われることも多く、膵癌根治術の有効な手段として確立されてきている。

しかし、術前放射線化学療法中に肝転移などの遠隔転移をきたして非切除となったり、胆管ステントを挿入して減黄を行っていたにも関わらず、ステント周囲に線維化がおり胆管狭窄や、胆管炎を生じて、癌治療の中断を余儀なくされる症例に遭遇することがある。近年、これらの病態には癌細胞の上皮間葉転換(EMT: Epithelial mesenchymal transition) や cancer associated fibroblast(CAF)などの間質細胞と癌細胞との相互作用が深く関与していることが明らかになってきており、抗がん剤、放射線照射などの抗癌治療そのものが癌細胞にEMTを誘導する可能性があることが種々の実験で検証され話題となっている。また種々の抗癌治療に対して耐性を獲得した癌組織が高率に癌幹細胞を多く含んでいることが実験的に証明されており、我々も術前化学療法後の膵癌切除標本を用いて報告した。これらをあわせて考えると癌組織中に存在する癌幹細胞のEMTを抑制することが癌治療の鍵となる可能性がある。また、癌間質に富む膵癌組織においては、癌細胞と間質の線維芽細胞との相互作用が重要であり、膵においては膵星細胞が重要な役割を担っている。近年、バルプロ酸ナトリウムなどのHDAC阻害薬やタキサン系抗癌剤の低用量投与によりEMTが抑制されることが注目されている。これらの薬剤は、細胞のEMTを抑制するとともに、組織の線維化も抑制することが知られており、狭心症治療に用いる薬剤溶出性ステントでは既に臨床応用されている。すなわち、これらの薬剤により、膵癌組織の線維化を抑制できれば、閉塞性黄疸の予防やステントの再狭窄を抑制できる可能性があるだけでなく、化学療法や放射線療法などの抗癌治療により誘発される腫瘍のEMTも抑制し、転移や再発制御の期待がもてるため、膵癌患者に対する放射線化学療法などの抗癌治療効果を最大限に引きだし、予後を改善する可能性がある。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、HDAC阻害薬とタキサン系抗癌剤を用いて、癌細胞の放射線感受性にどのような影響を与えるか癌細胞株を用いて検討するとともに、CAFとの関連が示唆される星細胞株の活性化誘導抑制が可能

であるかについて確認した。また、最近注目されている膵癌細胞の微小環境との関係も検討した。すなわち、膵癌細胞自身が上皮間葉転換(EMT)をきたしたり、腫瘍周囲に免疫抑制性の微小環境を構築する際に大きく影響する因子としてTGF- β 、VEGF-A、PAI-1が報告されているが、これらを含め、放出するとされている血小板とEMTとの関係についても検討し明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)HDAC阻害薬とタキサン系抗癌剤が癌細胞の放射線感受性にどのような影響を与えるかを解明する実験

ヒト膵癌細胞株が入手困難であったことから食道癌細胞株(TE9, TE10, TE11, TE14)を用いて、HDAC阻害薬であるバルプロ酸(VPA)及びタキサン系抗癌剤であるドセタキセル(DOC)の増殖抑制実験をMTT法により行い、IC50を算出した。

次に低濃度のVPA,DOCによる食道癌細胞の放射線感受性の増強効果をClonogenic assayにより検討した。Annexin Vの表出をFlow cytometryで観察しアポトーシスの誘導を確認した。放射線照射に伴うDNA二重鎖切断時に発現誘導されるH2AXの発現性の変化はWestern blotならびに蛍光免疫染色により検討した。さらに細胞周期への影響をFlow cytometryを用いて検討し、DNA二重鎖切断修復酵素の発現性の変化をWestern blot法を用いて検討した。さらにDNA二重鎖切断修復酵素のうちHDAC阻害薬によりアセチル化をうけることが予測されるKu70に関して免疫沈降法を用いてアセチル化の検討を行った。

(2)HDAC阻害薬(VPA)が星細胞株のEMTを抑制することを示す実験

ヒト膵星細胞株(hPSC)が入手困難であったことからヒト肝星細胞株(Li-90)を用いてTGF- β による活性化誘導を行い、培養上清中にHDAC阻害薬(VPA)を加えることで活性化の抑制が得られるか否かを検討した。VPAの細胞毒性をMTS assayにて検討し、細胞毒性を示さない濃度でVPAを作用させて星細胞におけるcollagen I合成抑制効果をWestern blot法にて検討した。また、VPAの作用機序検索目的としてSmad蛋白の発現およびリン酸化をWestern blot法にて検討した。

(3)星細胞におけるPaclitaxelを用いた活性化抑制効果およびその機序についての検討

ヒト肝星細胞株(Li-90)を用いてTGF- β による活性化誘導を行い、培養上清中にタキサン系抗癌剤であるPaclitaxel(PTX)を加えることで活性化の抑制が得られるか否かを検討した。PTXの細胞毒性をMTS assayおよびflow cytometryにて検討し、細胞毒性を示さない濃度でPTXを作用させて星細胞における

collagen I 合成抑制効果を Western blot 法および real time RT-PCR にて検討した。また、PTX の作用機序検索を目的として Smad 蛋白の発現およびリン酸化を Western blot 法にて検討した。

(4) 膵癌組織における EMT と血小板の関係に関する検討

当科で手術を施行した浸潤性膵管癌症例 32 例のうち gemcitabine (GEM) を中心とした術前化学療法を行った NAC 群 12 例を対象として術前化学療法を施行しなかったコントロール群 20 例と apoptosis marker (M30)、cancer stem cell marker (CD44)、EMT marker (Snail) の発現について検討した。また、40 例の膵癌切除症例の標本を用いて腫瘍の EMT マーカー発現部、間質、脈管内、リンパ節での血小板の発現を CD42b の免疫組織学的に検討した。免疫担当細胞としては CD16 (NK 細胞等) の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) HDAC 阻害薬とタキサン系抗癌剤が癌細胞の放射線感受性にどのような影響を与えるかを解明する実験

食道癌細胞株 (TE9, TE10, TE11, TE14) を用いて VPA の抗腫瘍効果を MTT アッセイで検討した。VPA はすべての細胞株において用量依存性に増殖を抑制した。VPA の IC50 は 1.02-2.15 mM であり、これは臨床的に抗癌薬として投与された時の安全血中濃度よりも高値であった。次に VPA のヒストンアセチル化効果をウェスタンブロッティング法で評価した。VPA は抗癌薬として使用した際の臨床的投与量で得られる血中濃度と同等の 0.5 mM の濃度でヒストン H3, H4 のアセチル化を増強した。クロノジェニックアッセイでは 0.5 mM の VPA がすべての細胞株の放射線感受性を増強することを確認した。フローサイトメトリーによる検索では VPA が放射線照射後のアポトーシスを増強することが確認されたが、VPA 細胞周期には影響しなかった。また VPA が放射線照射後 DNA 二本鎖切断に伴い算出する H2AX の発現を増加させることがウェスタンブロッティング法ならびに蛍光免疫抗体染色法により確認された。更に DNA 二本鎖切断修復酵素の発現性をウェスタンブロッティング法で検討したところ、VPA は相同組換えに不可欠なたんぱく質である Rad51 の発現を低下させた。一方非同相末端結合に関与する Ku70, Ku80, DNA-PKcs の発現性に变化は認められなかった。しかし免疫沈降法を用いた検討では、VPA は非同相末端結合に関与する修復酵素である Ku70 をアセチル化することにより機能阻害することが判明した。

一方 DOC も濃度依存性に食道扁平上皮癌細胞である KES 細胞の増殖を抑制したが、比較的低濃度でも放射線感受性を増強することが判った。フローサイトメトリーを用いて DOC

の濃度と細胞周期の関係を検討すると、DOC は低濃度では細胞周期を G0G1 期で停止させ、さらに高濃度では G2M1 期で停止させることにより放射線感受性を増強させることがわかった。また DOC は低濃度では単独では KES 細胞のアポトーシスを誘導しないが、放射線と併用することによって強いアポトーシスを誘導するとともに、DNA の二重鎖切断を引き起こして H2AX の発現が誘導されることが明らかとなった。本研究により、VPA と DOC が食道癌の放射線感受性を増強することが明らかとなった。

(2) HDAC 阻害薬 (VPA) が星細胞株の EMT を抑制することを示す実験

ヒト肝星細胞株 (Li-90) に TGF- β を作用させると形態が紡錘形となり、collagen I 産生能の亢進を認めるが、これに VPA を有意な毒性を示さない 1mM で作用させると、形態変化が抑制され、collagen I 産生も有意に抑制された。VPA を作用させた Li-90 においては Smad 2,3 のリン酸化が有意に抑制されており、VPA は Smad 2,3 蛋白のリン酸化を抑制することで Li-90 の活性化を抑制していると考えられた。

(3) 星細胞における Paclitaxel を用いた活性化抑制効果およびその機序についての検討

ヒト肝星細胞株 (Li-90) に TGF- β を作用させると SMA および collagen I 産生能の亢進を認めるが、これに PTX を有意な毒性を示さない 5nM で作用させると、SMA および collagen I 産生が有意に抑制された。また、PTX を作用させた Li-90 においては Smad 2,3 のリン酸化が有意に抑制されており、VPA は Smad 2,3 蛋白のリン酸化を抑制することで Li-90 の活性化を抑制していると考えられた。

(4) 膵癌組織における EMT と血小板の関係に関する検討

Apoptosis marker である M30 は NAC 群 12 例中 7 例 (58.3%) に陽性であり、コントロール群が 20 例中 2 例 (10.0%) にしか認めなかったのに比して有意に発現が増強していた ($p=0.006$)。また cancer stem cell marker の一つである CD44 の発現は NAC 群では 12 例中 6 例 (50.0%) に陽性であったが、コントロール群で陽性は 20 例中 3 例 (15.0%) のみで有意に NAC 群で発現が増強していた ($p=0.05$)。特に化学療法が奏功した症例では、線維化した間質に島状に取り残されるように残存している癌細胞の表面に CD44 の発現が強く認められた。

一方、EMT 関連因子 Snail の発現は NAC 群 12 例中 6 例 (50.0%)、コントロール群 20 例中 8 例 (40.0%) と両群間に差を認めなかった。このことから Gemcitabine による術前化学療法で腫瘍に apoptosis が誘導されていることが臨床病理学的に確認されたが、残存腫瘍には cancer stem cell 様の細胞が多く存在している可能性が示唆され、膵癌組織では化学

療法の有無に関わらず癌細胞に EMT を生じている可能性があり、これが治療に対する抵抗性が高く、予後が不良な一因である可能性があると考えられた。また、腫瘍部での CD42b の発現は 63% (25/40) に認められた。CD42b 発現例では 92% (23/25) に Snail の発現が認められた。CD16 の発現は 58% (23/40) に認められ、CD42b 発現部位では CD16 陽性細胞の浸潤が減少していた。血小板は癌細胞を被覆し、EMT 様の変化や脈管浸潤を誘導し、浸潤・転移に有利な環境を形成している可能性が示唆された。また血小板の被覆部位では免疫寛容が誘導されている可能性も示唆された。このようなことから抗血小板療法を加えた EMT 抑制治療が、これからの癌治療に対する新たな治療戦略になる可能性が示唆された。

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 1 件)

Miyashita T, Miki K, Kamigaki T, Makino I, Nakagawara H, Tajima H, Takamura H, Kitagawa H, Fushida S, Ahmed AK, Duncan MD, Harmon JW, Ohta T. Low-dose gemcitabine induces major histocompatibility complex class I-related chain A/B expression and enhances an antitumor innate immune response in pancreatic cancer. Clin Exp Med.8, 2016, 1-13. (査読あり)

[学会発表](計 1 件)

田島秀浩: Low dose Paclitaxel 療法による胆道癌に対する EMT 抑制と肝星細胞の活性化抑制に関する実験的研究. 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会 2014 年 7 月 10 日(金), 金沢市民文化ホール(石川県・金沢市)

[図書](計 1 件)

田島秀浩 他, 医学図書出版. 膵癌治療 up-to-date 2015, 2015, 141

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川原 寿俊 (HISATOSHI NAKAGAWARA)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号: 30401904

(2)研究分担者

田島 秀浩 (TAJIMA HIDEHIRO)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号: 00436825

(3)連携研究者

太田 哲生 (OHTA TETSUO)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 40194170