

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860552

研究課題名(和文) Amphiregulin核移行による抗癌剤耐性獲得メカニズムの解明と膵癌への応用

研究課題名(英文) The mechanisms of chemoresistance induced by amphiregulin nuclear translocation

研究代表者

吉田 道弘 (YOSHIDA, Michihiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20636328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：関与遺伝子の解析で、ARシグナルの上流に存在するLPA2と、その修飾因子のNHERF2を候補として抽出した。膵癌を用いた検討は当初の計画と逆の臨床結果が確認(AR発現群が予後良好)されたため、膵癌を用いた検討でなく大腸癌モデルでの検証を行った。この大腸癌研究において、AR核移行を制御するNHERF2・LPA2それぞれの癌遺伝子、抗癌剤耐性因子としての役割を研究し、それらを学会発表・論文として報告した。膵癌臨床検体を用いたサブ解析として、バイオマーカーとして知られるp53とMDM2についてIHCでの評価とSNP解析をおこない、論文として報告した。

研究成果の概要(英文)：We identified two promising factors, Lysophosphatidic acid receptor 2 (LPA) and Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor 2 (NHERF2) which have some functions to regulate AR and induce chemoresistance. However, the analysis with clinical samples showed that AR expression did not contribute poor prognosis and the additional laboratory investigation was not able to detect AR nuclear translocation in pancreatic cancer cell lines, which required the revision of our initial study design. We focused on LPA2 and NHERF2 as the oncogenic and chemoresistant factor in colon cancer, instead of pancreatic cancer. We kept experiments and got data which showed LPA2 and NHERF2 had specific functions in terms of carcinogenesis and chemoresistance. In addition, we performed SNPs and IHC analysis in pancreatic cancer patients and found p53 and MDM2 as specific biomarkers.

研究分野：消化器癌

キーワード：消化器癌 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

癌死亡率の多くを占める消化器進行癌において、これまでの化学療法に加え分子標的治療は新たな治療戦略をもたらした。なかでも EGFR の抑制は最も注目される分子標的の一つであるが、その効果は限定的で、さらなる新規分子標的への期待は大きい。申請者は過去に EGFR リガンドである amphiregulin の抗癌剤耐性誘導を報告してきた。これらをもとに、抗癌剤耐性のメカニズムの解明と、膵癌を中心とした消化器癌の新規分子標的・バイオマーカーの樹立を目指した。

2. 研究の目的

消化器癌モデルをもちいて、Amphiregulin および HB-EGF の核移行による抗癌剤耐性獲得メカニズムの解明とそれらによる新規分子標的の樹立を目的とした。さらに、消化器癌において特に予後不良であり、治療戦略の選択肢の限られている膵癌への応用を目指した。

3. 研究の方法

研究立案時、下記の方法での検証を予定した。

(1) 核移行に關与する遺伝子の解析と修飾因子の検索

で抽出された標的遺伝子の発現と現象との関連性の検証(in vitro)

ヌードマウス皮下移植モデルを用いたで抽出された遺伝子との関連性の検証(in vivo)

(2) 膵癌細胞を用いた核移行シグナルの機能解析

膵癌細胞の移植モデルを用いた in vivo 解析

外科手術標本・EUS-FNA 下採取した膵癌組織を用いた免疫組織化学染色での臨床病理解析

4. 研究成果

(1) 核移行に關与する遺伝子の解析と修飾因子の検索

關与遺伝子の解析で、AR シグナルの上流に存在する Lysophosphatidic acid receptor 2 (LPA2) が候補として抽出された。そこで、LPA2 を中心的に研究している Emory University の Chris Yun 研究室と共同で研究をすすめることとした。さらに、LPA2 の scaffold protein である Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor 2 (NHERF2) も修飾因子と候補に挙げられた。それらの結果より、LPA2、NHERF2 の二つを新規解析因子として以降の研究をすすめることとなった。

で抽出された標的遺伝子の発現と現象との関連性の検証 (in vitro)

LPA2 および NHERF2 それぞれが癌での発現を確認。さらに、knockdown した細胞では、蛍光免疫染色上 AR の核の局在が减弱していることを確認。そのうえで細胞増殖を検証したところ、LPA2 および NHERF2 のいずれにおいても knockdown 細胞において増殖能が抑制された。さらに、抗癌剤感受性試験 (IC50) において、それぞれの knockdown 細胞で抗癌剤感受性が亢進した結果を確認した。これにより、LPA2、NHERF2 いずれにおいても抗癌剤耐性を調整することが In vitro レベルで明らかとなった。

ヌードマウス皮下移植モデルを用いた 1) で抽出された遺伝子との関連性の検証 (in vivo)

LPA2 および NHERF2 ノックダウン細胞をヌードマウスの皮下に移植したモデルを用いて腫瘍増殖能を検証すると、いずれのノックダウン細胞においても、腫瘍増大が抑制された。しかし、腫瘍の自然増殖能がコントロールとノックダウン腫瘍間で差が大きいため、3 週間にわたる抗癌剤投与下の効果比較では、2 群間の自然増殖能の差が影響し有意な結果が得られなかった。

(2) 膵癌細胞を用いた核移行シグナルの機能解析

膵癌細胞株を用いて HB-EGF・AR の発現を PCR 解析したところ、複数の細胞株で発現確認が可能であった。しかし、AR の核移行が蛍光免疫染色・核抽出による WB のいずれにおいても確認できず、AR の核移行自体が同定できなかった。HB-EGF はシグナル自体が微弱で評価困難であった。

膵癌細胞の移植モデルを用いた in vivo 解析

上記・後述する下記理由のため、膵癌細胞を用いた in vitro/in vivo 検証はこれ以上行わず、後述する追加検討を行った。

外科手術標本・EUS-FNA 下採取した膵癌組織を用いた免疫組織化学染色での臨床病理解析

膵癌 61 例を抽出し、その病理組織検体を用いて抗 AR 抗体、抗 HB-EGF 抗体で芽根喜組織化学染色 (IHC) を施行。HB-EGF は非特異的染色が強く、陽性・陰性染色の判定が困難であったため、染色状態が良好な AR を用いた解析を行った。我々の大腸癌の検討によると、AR の染色は細胞質が陽性のものは核内も同様に陽性であったが、膵癌においては核内の染色率は 2 例 (3%) のみと極めて少なく、AR 核移行の存在が十分に明らかにされなかった。また、細胞質における AR 発現と予後の相関をみてみると、大腸癌と異なり、AR 発

現群が非発現群よりも予後が良いという逆転した結果であった。さらに、膵癌細胞株 (MiaPaCa-2, PANC1) を用い、蛍光免疫染色法 (IF) で AR の核内シグナル確認と、キットを用いて核抽出し WB で核内発現の確認をしたが、いずれにおいても AR の核移行の存在が確認できなかった。以上より、AR の核移行は膵癌においては確認されず、抗癌剤耐性モデルの解析には意義が乏しいと考えた。

【本研究における追加検討】

上記より、膵癌を用いた検討は継続困難と判断し、計画当初に万が一計画通りにいかなかった場合に備えて検討していた通り、すでに AR 核移行が確認でき、臨床検体においてもその発現意義を確認報告している大腸癌モデルでの検証を行うこととした。この大腸癌研究において、NHERF2 をノックダウンした細胞株を用いた腫瘍増殖能にくわえ、ノックアウトマウスを用いた発癌モデルにおいても、NHERF2 のノックアウトが腫瘍増殖に抑制的に働くことを見出し、NHERF2 自体が大腸癌の癌遺伝子として働く事に着目した論文を作成し、2016 年 2 月に American Journal of physiology Gastrointestinal and Liver Physiology に accept された。さらに、LPA2 に関する解析として、LPA2 自体の発現が癌の発現を制御することを、トランスジェニックマウスを用いて明らかにし、PLoS One に 2016 年 2 月に投稿、accept された。

膵癌臨床検体を用いたサブ解析として、バイオマーカーとして知られる p53 と MDM2 について IHC での評価と、SNP 解析をおこなったところ、p53 の SNP 変異は膵癌のリスクファクターとして、MDM2 の SNP 変異は予後予測因子として有用であることを明らかにし、論文として報告した。(PLoS One 2015 Mar 3;10(3))

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 19 件)

1. Kato A, Kataoka H, Yano S, Hayashi K, Hayashi N, Tanaka M, Naitoh I, Ban T, Miyabe K, Kondo H, Yoshida M, Fujita Y, Hori Y, Natsume M, Murakami T, Narumi A, Nomoto A, Naiki-Ito A, Takahashi S, Joh T. Maltotriose conjugation to a chlorin derivative enhances the antitumor effects of photodynamic therapy in peritoneal dissemination of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017 Mar 14. 査読有 doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0670.
2. Hori Y, Hayashi K, Yoshida M, Naitoh I, Ban T, Miyabe K, Kondo H, Nishi Y, Umemura S, Fujita Y, Natsume M, Kato A, Ohara H, Joh T. Novel characteristics of traction force in biliary self-expandable metallic stents. *Dig Endosc.* 2016 Dec 29. 査読有 doi: 10.1111/den.12796.
3. Yoshida M, He P, Yun CC. Transgenic Expression of Human Lysophosphatidic Acid Receptor LPA2 in Mouse Intestinal Epithelial Cells Induces Intestinal Dysplasia. *PLoS One.* 2016 Apr 28;11(4):e0154527. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0154527.
4. Yoshida M, Zhao L, Grigoryan G, Shim H, He P, Yun CC. Deletion of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2 represses colon cancer progress by suppression of Stat3 and CD24. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016 Apr 15;310(8):G586-98. 査読有 doi: 10.1152/ajpgi.00419.2015.
5. Hori Y, Hayashi K, Yoshida M, Naitoh I, Nakazawa T, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Umemura S, Kato A, Ohara H, Joh T. New concept of traction force applied to biliary self-expandable metallic stents. *Endoscopy.* 2016 May;48(5):472-6. 査読有 doi: 10.1055/s-0041-111566.
6. Kondo H, Naitoh I, Okumura F, Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K, Shimizu S, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Kato A, Ohara H, Joh T. Clinical features of acute obstructive suppurative pancreatic ductitis: A retrospective review of 20 cases. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016 Jul;31(7):1366-73. 査読有 doi: 10.1111/jgh.13304.
7. Naitoh I, Nakazawa T, Kato A, Hayashi K, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Kuno T, Takahashi S, Ohara H, Joh T. Predictive factors for positive diagnosis of malignant biliary strictures by transpapillary brush cytology and forceps biopsy. *J Dig Dis.* 2016 Jan;17(1):44-51. 査読有 doi: 10.1111/1751-2980.12311.
8. Naitoh I, Nakazawa T, Okumura F, Takada H, Hirano A, Hayashi K, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Kato A, Yamashita H, Sano H, Ohara H, Joh T. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography-related adverse events in patients with type 1 autoimmune pancreatitis. *Pancreatology.* 2016 Jan-Feb;16(1):78-82. 査読有 doi: 10.1016/j.pan.2015.10.011.

9. Kato A, Naiki-Ito A, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Mori T, Tsutsumi M, Kuno T, Suzuki S, Kato H, Ohara H, Joh T, Takahashi S. Chemopreventive effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3 and ERK1/2. *Oncotarget*. 2015 Dec 15;6(40):42963-75. 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.5981.
10. Shimizu S, Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Kato A, Okumura F, Sano H, Hirata Y, Takada H, Ohara H, Joh T. Correlation between long-term outcome and steroid therapy in type 1 autoimmune pancreatitis: relapse, malignancy and side effect of steroid. *Scand J Gastroenterol*. 2015;50(11):1411-8. 査読有 doi: 10.3109/00365521.2015.1054424.
11. Hori Y, Miyabe K, Yoshida M, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Umemura S, Kato A, Ohara H, Inagaki H, Joh T. Impact of TP53 codon 72 and MDM2 SNP 309 polymorphisms in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*. 2015 Mar 3;10(3):e0118829. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0118829.
12. Hori Y, Naitoh I, Ban T, Narita K, Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Kato A, Yamada T, Ando T, Joh T. Stent under-expansion on the procedure day, a predictive factor for poor oral intake after metallic stenting for gastric outlet obstruction. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Aug;30(8):1246-51. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0118829.
13. Naitoh I, Nakazawa T, Ban T, Okumura F, Hirano A, Takada H, Togawa S, Hayashi K, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Yamashita H, Umemura S, Hori Y, Kato A, Sano H, Joh T. 8-mm versus 10-mm diameter self-expandable metallic stent in bilateral endoscopic stent-in-stent deployment for malignant hilar biliary obstruction. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2015 May;22(5):396-401. 査読有 doi: 10.1002/jhbp.219.
14. Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Kato A, Okumura F, Sano H, Ohara H, Joh T. Comparison of intraductal ultrasonography findings between primary sclerosing cholangitis and IgG4-related sclerosing cholangitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jun;30(6):1104-9. 査読有 doi: 10.1111/jgh.12894.
15. Miyabe K, Hayashi K, Nakazawa T, Sano H, Yamada T, Takada H, Naitoh I, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Kato A, Ohara H, Joh T. Safety and benefits of self-expandable metallic stents with chemotherapy for malignant gastric outlet obstruction. *Dig Endosc*. 2015 Jul;27(5):572-81. 査読有 doi: 10.1111/den.12424.
16. Miyabe K, Hori Y, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Kato A, Ohara H, Joh T, Inagaki H. Locus/chromosome aberrations in intraductal papillary mucinous neoplasms analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Am J Surg Pathol*. 2015 Apr;39(4):512-20. 査読有 doi: 10.1097/PAS.0000000000000360.
17. Miyabe K, Notohara K, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Shimizu S, Kondo H, Yoshida M, Yamashita H, Umemura S, Hori Y, Kato A, Takahashi S, Ohara H, Joh T. Comparison study of immunohistochemical staining for the diagnosis of type 1 autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol*. 2015 Apr;50(4):455-66. 査読有 doi: 10.1007/s00535-014-0980-9.
18. Yamashita H, Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Ohara H, Takahashi S, Joh T. A comparison of the diagnostic efficacy in type 1 autoimmune pancreatitis based on biopsy specimens from various organs. *Pancreatology*. 2014 May-Jun;14(3):186-92. 査読有 doi: 10.1016/j.pan.2014.03.003.
19. Kondo H, Naitoh I, Ohara H, Nakazawa T, Hayashi K, Okumura F, Miyabe K, Shimizu S, Nishi Y, Yoshida M, Yamashita H, Umemura S, Hori Y, Kato A, Joh T. Efficacy of pancreatic stenting prior to extracorporeal shock wave lithotripsy for pancreatic stones. *Dig Liver Dis*. 2014 Jul;46(7):639-44. 査読有 doi: 10.1016/j.dld.2014.02.017.

[学会発表](計 5 件)

Michihiro Yoshida, The absent of NHERF2 attenuates colon cancer growth, DDW 2015, 2015年5月16日, ワシントン(米国)

Michihiro Yoshida, Deletion of NHERF2 suppresses colon cancer progress, 日本癌学会総会, 2016年10月7日, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜)

Michihiro Yoshida, NHERF2 regulates colon cancer progress via stat3, UEGW 2016, 2016年10月17日, ウィーン(オーストリア)

Michihiro Yoshida, Transgenic expression of human lysophosphatidic acid receptor 2(LPA2) in mouse intestinal epithelial cells induces intestinal dysplasia, UEGW 2016, 2016年10月17日, ウィーン(オーストリア)

吉田道弘, 大腸癌治療におけるオートタキシン(ATX)制御の有用性, 日本消化器病学会総会 2017年4月20日, 京王プラザホテル(東京都, 新宿)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田道弘(YOSHIDA Michihiro)
名古屋市立大学大学院医学研究科 助教
研究者番号: 20636328

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

Chris Yun
Emory University School of Medicine,
Division of Digestive Diseases