

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10189

研究課題名(和文) 膵癌のdesmoplasiaを標的とした治療薬と新しい薬剤送達システムの開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic agent targeting desmoplasia in pancreatic cancer and novel drug delivery system

研究代表者

白羽根 健吾 (SHIRAHANE, Kengo)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10529803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は膵星細胞の活性化にオートファジーが関連し、オートファジーを抑制することで膵癌の浸潤転移が抑制されることを報告した。この事実から膵星細胞のオートファジーが膵癌治療の標的となる可能性が示唆された。また、膵星細胞の活性化の際に細胞質の脂肪滴が減少する現象を利用して膵星細胞の活性化を抑制する薬剤のスクリーニング法を開発した。具体的には化合物ライブラリーから抽出した化合物群を膵星細胞に投与し、膵星細胞の脂肪滴の増減を脂肪滴の蛍光染色剤であるBODIPYで染色して蛍光の増減で評価を行う方法である。この手法を用いてこれまでに膵星細胞の活性化を抑制する可能性がある特定の化合物群の絞り込みを行った。

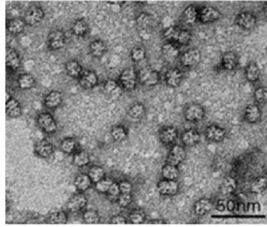
研究成果の概要(英文)：We have reported that activation of pancreatic stellate cells(PSCs) is associated with autophagy and inhibiting autophagy results in suppression of pancreatic cancer progression and metastasis. Thus, autophagy in PSCs is a possible therapeutic target in pancreatic cancer.

Furthermore, we have developed a high-throughput screening system, based on a phenomenon that lipid droplets inside PSCs decrease during activation, to find PSCs suppressive compounds. In detail, candidate agents selected from compound library were administered to PSC, followed by lipid droplets dye with BODIPY, a fluorescent lipid dye. Then quantified the intensity of BODIPY fluorescence and found compounds which suppressed PSCs activation. Using this method we have found some compounds which may lead PSCs into quiescent state.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 desmoplasia オートファジー 化合物ライブラリー

1. 研究開始当初の背景



ナノカプセルの電子顕微鏡観察  
(内孔10nm、外径12nm)

膵癌は極めて予後不良であるが、その原因として化学療法や放射線療法への高い抵抗性が関連している。この治療抵抗性には膵癌に特徴的

な desmoplasia と呼ばれる豊富な間質増生が寄与しており、癌間質相互作用が化学療法抵抗性を高めていることが明らかになりつつある。したがって、癌間質における癌悪性化責任間質細胞をターゲットとした治療薬は膵癌の有効な治療法となる可能性が高い。また、新規のドラッグデリバリーシステム(DDS)を開発し、癌悪性化責任間質細胞を特異的に制御することでより強力な治療効果を得ることができると考えられる。

2. 研究の目的

膵癌の癌間質相互作用により化学療法抵抗性を主導する癌微小環境における癌悪性化責任間質細胞に着目してその機能を明らかにする。さらにその制御を目的とした抗線維化作用を持つ薬剤を同定し、同時にナノカプセルを用いた新規のドラッグデリバリーシステムを開発してこのような微小環境に存在する癌悪性化責任間質細胞をより効果的に抑制する新たな治療法を開発する。

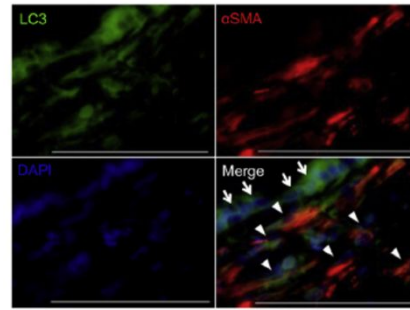
3. 研究の方法

- (1) ヒト膵癌切除組織の免疫染色を行い、膵癌間質におけるオートファジー関連分子の発現を評価し、臨床病理学的検討を行い、膵癌におけるオートファジーの関与を検討した。
- (2) ヒト膵癌切除組織から初代培養で膵星細胞を樹立した。樹立した膵星細胞と癌細胞を用いてオートファジーが癌間質相互作用に与える影響を検討した。
- (3) ノドマウスに膵癌細胞と膵星細胞を共移植し、膵星細胞のオートファジーの抑制が膵癌の進展に与える影響を検討した。
- (4) 膵星細胞が活性化すると細胞質の脂肪滴が増加することが知られている。この現象に着目し、脂肪滴を蛍光色素で染色して蛍光を自動化した装置で定量化することで膵星細胞の活性化を抑制する可能性がある薬剤をスクリーニングする系を確立した。
- (5) (4)で確立したスクリーニング系を用いて膵星細胞を抑制する可能性がある薬剤を抽出した。

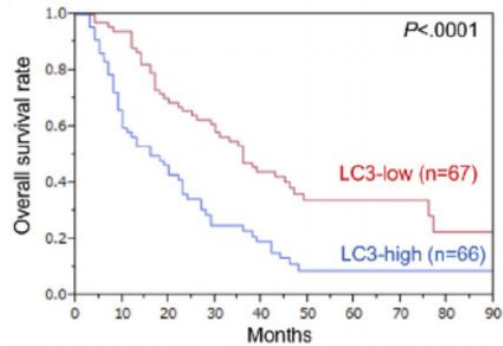
4. 研究成果

(1) ヒト膵癌切除組織を活性化膵星細胞のマーカーである  $\alpha$ -SMA とオートファジーのマーカーである LC3 の免疫染色を行うと膵星細胞でオートファジーが起こっている

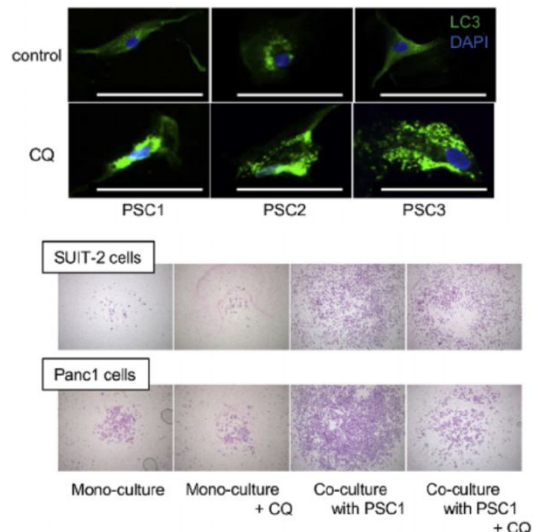
ことが確認できた(下図)。

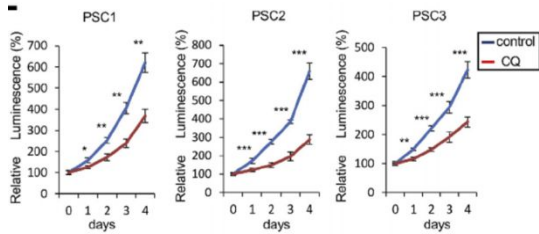


次に膵星細胞のオートファジーが予後に与える影響を検討するために臨床病理学的検討を行うと、膵星細胞の LC3 の発現が高い群において有意に予後が不良であった。このことから膵星細胞のオートファジーが癌の悪性化に関与している可能性が示唆された(下図)。



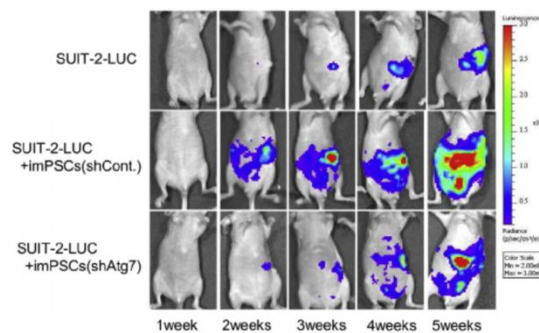
(2) 膵星細胞は癌間質相互作用により膵癌の悪性度を高めることが知られているが、膵癌の癌間質相互作用におけるオートファジーの影響については不明な点が多い。この点を明らかにするためにヒト膵癌切除組織から膵星細胞を樹立した。樹立した膵星細胞にオートファジー阻害剤であるクロロキンを投与すると膵星細胞の脂肪滴が増加し、増殖能が低下する現象が観察された(下図)。





また、トランスウェルチャンバーを用いて膵癌細胞と膵星細胞を間接共培養すると膵癌細胞の浸潤能が亢進したが、この変化はクロロキンの投与により抑制され、癌間質相互作用に膵星細胞のオートファジーが関係していることが示唆された。

(3)膵星細胞のオートファジーをオートファジー必須因子である Atg7 をノックダウンすることで抑制した細胞株を樹立した。膵癌細胞とオートファジーを抑制した膵星細胞を共にヌードマウスに同所移植した。その結果 Atg7 をノックアウトした膵星細胞と共移植群で有意に原発巣の増大と腹膜播種が抑制された(下図)。



(4)膵星細胞が静止状態になると細胞質の脂肪滴が増加するため、脂肪滴の増減が膵星細胞の活性を評価するひとつの指標となり得る。そこで我々は化合物ライブラリーから抽出した多数の化合物をそれぞれ膵星細胞の添加し、その活性の変化を膵星細胞の脂肪滴を BODIPY (脂肪の蛍光染色剤) で染色し、蛍光強度を定量化することで評価する系を考案した。この系はシンプルな手順で再現性のあるデータが得られ、スクリーニング系として優れている。

(5)上記(4)のスクリーニング系を用いて152個の化合物を膵星細胞を静止状態に導く可能性がある化合物として抽出した。今後はこれらの化合物の有効性を検討していく予定である。

##### 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7件)

Endo S, Nakata K, Sagara A, Koikawa K, Ando Y, Kibe S, Takesue S, Nakayama H,

Abe T, Okumura T, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M, Autophagy inhibition enhances antiproliferative effect of salinomycin in pancreatic cancer cells, *Pancreatology*, 査読有,17(6):990-996, 2017, doi:10.1016/j.pan.2017.08.009

Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Mizuuchi Y, Iwamoto C, Murata M, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Autophagy Is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice, *Gastroenterology*, 査読有, 152(6):1492-1506,2017,

doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.010  
Yoshida M, Miyasaka Y, Ohuchida K, Okumura T, Zheng B, Torata N, Fujita H, Nabae T, Manabe T, Shimamoto M, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M, Calpain inhibitor calpeptin suppresses pancreatic cancer by disrupting cancer-stromal interactions in a mouse xenograft model, *Cancer Sci*, 査読有, 107(10):1443-1452, 2016,

doi: 10.1111/cas.13024  
Horioka K, Ohuchida K, Sada M, Zheng B, Moriyama T, Fujita H, Manabe T, Ohtsuka T, Shimamoto M, Miyazaki T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Suppression of CD51 in pancreatic stellate cells inhibits tumor growth by reducing stroma and altering tumor-stromal interaction in pancreatic cancer, *Int J Oncol*, 査読有,48(4):1499-1508, 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3374

Zheng B, Ohuchida K, Chijiwa Y, Zhao M, Mizuuchi Y, Cui L, Horioka K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Tanaka M, CD146 Attenuation in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Pancreatic Cancer Progression,

*Molecular Carcinogenesis*, 査読有, 55:1560-1572,2016  
doi: 10.1002/mc.22409

大内田研宙, 中村雅史, 膵がん浸潤・転移における微小環境の病態、膵炎・膵がん、査読無, 76-84, 2016

大内田研宙, 大塚隆生, 橋爪誠, 中村雅史, 膵癌の浸潤・転移における癌微小環境の新たな役割、胆と膵、査読無、36(10):1181-1187,2015

〔学会発表〕(計 6 件)

Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Mizuuchi Y, Moriyama T, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Autophagy Drives Pancreatic Stellate Cells Activation and Promotes Pancreatic Cancer, 47th Annual Meeting of the American Pancreatic Association, 2016.

遠藤翔、仲田興平、大内田研宙、水内祐介、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、小田義直、中村雅史、膵星細胞におけるオートファジーは、膵癌の成長と転移を促進する、第 71 回日本消化器外科学会、2016.

吉田真樹、宮坂義浩、大内田研宙、遠藤翔、阿部俊也、肥川和寛、巖子龍、千々岩芳朗、奥村隆志、佐田政史、堀岡宏平、鄭彪、森山大樹、真鍋達也、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、癌と間質を同時に標的とするカルパイン阻害薬カルペプチンの膵癌に対する治療効果の検討、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016.

Horioka K, Ohuchida K, Sada M, Zheng B, Ohtsuka T, Ueki T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Suppression of CD51 in Pancreatic Stellate Cells Inhibits Tumor Growth by Reducing Stroma and Altering Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer, American Pancreatic Association 46th Annual Meeting, 2015.

Koikawa K, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Horioka K, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Ohuchida R, Ueki T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M, Pancreatic Stellate Cells Lead and Promote the Local Invasion of Cancer Cells, by Physically Remodeling the Extracellular Matrix with Collagen Fiber Alignment in Pancreatic Cancer, American Pancreatic Association 46th Annual Meeting, 2015.

佐田政史、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、堀岡宏平、水内祐介、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、高畑俊一、植木隆、永井英司、水元一博、小田義直、中村雅史、田中雅夫、低酸素誘導性 LOX による癌間質リモデリングが膵癌膵癌浸潤能に与える影響の検討、第 23 回消化器関連学会週間、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
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

白羽根 健吾 (SHIRAHANE, Kengo)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：10529803

(2) 研究分担者

難波江 俊永 (NABAE, Toshinaga)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：10467889

鬼丸 学 (ONIMARU, Manabu)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：80529876

大内田 研宙 (OHUCHIDA, Kenoki)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：20452708  
(2017 年度)

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )