

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10201

研究課題名(和文)細胞動態解析を指標とした膵癌の新しい転移・増殖因子の探索

研究課題名(英文) Explorative research of novel factors for pancreatic cancer metastasis and proliferation based on analysis of cell dynamics

研究代表者

山内 明 (Yamauchi, Akira)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80372431

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)：膵癌は、癌の中で最も予後不良の疾患の一つであり、早急な対策を要する。血清は、*in vitro*でのアッセイ系において癌細胞の最も強い走化性因子であることが分かっていたが、血清中のどのような因子が最も強い因子なのかは不明であった。本プロジェクトではこの未知の癌細胞走化性惹起因子(=転移促進因子)を探索した。まず癌細胞走化性評価方法を確立した。次に血清中、非タンパク質の疎水性かつ低分子の分画に存在する因子を発見した。またタンパク質としては炎症組織で産生されるS100タンパク群を見出した。これらについて現在、動物実験と患者サンプルでの検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is one of the diseases with poorest prognosis, which needs urgent countermeasures. Serum is known to be a strong chemoattractant, however, particular factors which cause cancer cell migration or metastasis remain unknown because of its heterogeneity. In this project, we explored the unknown factors which attract cancer cells, i.e. the metastasis promoting factors. At first, we established the evaluation system for cancer cell migration. Next, we found such factors in the non-protein, hydrophobic, and low-molecular-weight fraction. Also we found S100 proteins, known as factors produced in inflammation sites, as such factors. We are now evaluating these factors with animal model and with patients' samples.

研究分野：生化学

キーワード：転移惹起因子 走化性 遊走 がん

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、治療成績が改善しつつあるがまだまだ予後不良であり、早急かつ効果的な対策を要する疾患の一つである。癌細胞の多くは遊走能に富み、転移・浸潤を起こす。研究開始当時、癌細胞に対して走化性惹起作用と増殖促進作用を併せもつ血清因子としてケモカインや脂質メディエータが知られていた。これらの癌細胞走化性惹起分子およびその受容体の阻害剤や抗体のうち、直接的な抗がん作用をもつ薬剤は、研究開始当時 2012 年に認可された ATL に対する抗 CCR4 抗体のみであり、固形がん に直接作用する薬で認可されたものはまだ無かった。これは創薬ターゲットとなる未だ知られていない走化性惹起作用および増殖促進を持つ因子が存在する可能性を暗示していた。一方、これまでの癌研究の俯瞰から、既知の癌細胞走化性惹起分子以外の癌細胞転移・増殖促進因子の存在も予想されていた (Nat. Rev. Canc. 3(8):582-91, 2003)。

研究代表者は画像解析に基づいたリアルタイム細胞動態解析法 (TAXIScan 法) の開発に携わり、好中球、マクロファージなど免疫担当細胞の走化性を解析しその機序を明らかにしてきた (J Immunol. Methods. 320, 155-163, 2007, J Biol Chem. 283, 35715-23, 2008, J Immunol. Methods. 404, 59-70, 2014)。本法は定量と画像解析が同時に行えること、また細胞数(100 個)と走化性因子 (1 μ l) が微量で済むなど多数の利点がある。研究開始時までに、本評価系を用いて膵癌細胞および大腸癌細胞で走化能・浸潤能を評価する系を構築しつつあった (H23 年度川崎医学・医療福祉学振興会教育研究助成)。さらにこの評価系を用いて膵癌細胞走化性を試したところ、数ある既知の走化性惹起物質 (CXCL12、LPA、S1P および C1P) の活性は血清 (特にウシ胎児血清) の活性には及ばないこと、つまり血清が最も強い走化性を惹起することを見出した。しかしながら血清には多種多様な物質が含まれており、既知の走化性惹起物質以外のどのような因子が強い走化性を引き起こすのかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vitro* 実験系で血清中の強い走化性惹起かつ細胞増殖作用を持つ因子を探索・同定し、さらに *in vivo* でこの因子が機能していることを証明することである。

3. 研究の方法

ウシ胎児血清中の未知の細胞走化性惹起作用かつ増殖作用を持つ因子を同定する。

同定した因子の細胞走化性惹起・増殖作用を癌細胞株 (*in vitro*) および担癌マウス (*in vivo*) で確認する。

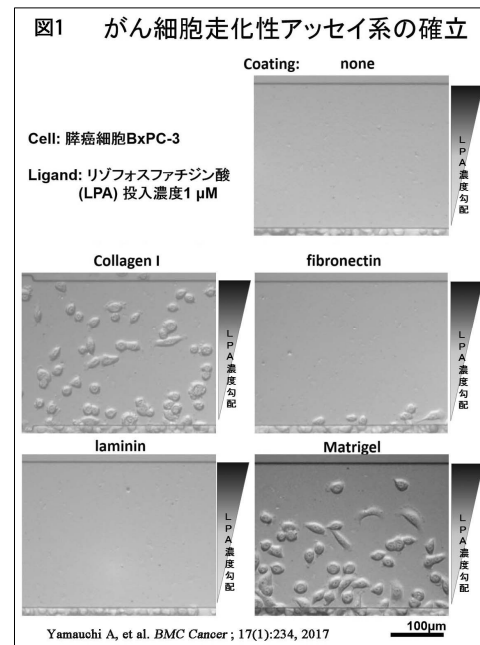
癌患者で、血清中にこのような物質が検

出あるいは増減していることを確認する。また、転移との関係も調査する。

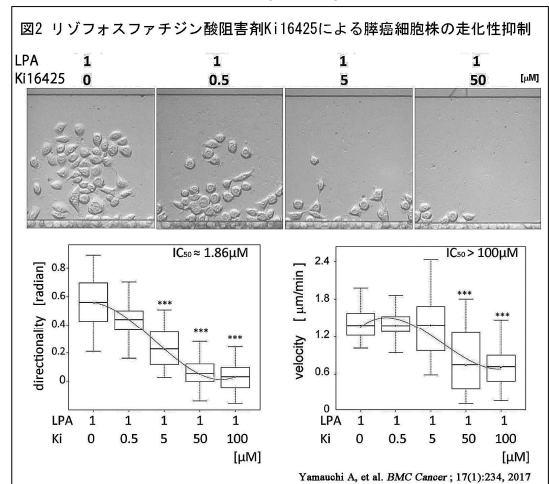
4. 研究成果

癌細胞走化性惹起作用かつ増殖作用を持つ因子の同定:

まず、*in vitro* 癌細胞走化性評価系を確立した。即ち、膵癌細胞株のうち遊走活性の高い細胞株 BxPC-2 を用いて、既知の走化性惹起分子であるリゾフォスファチジン酸 (LPA) に対する走化性を TAXIScan 法にて詳細に評価する系を構築した。その結果、この細胞株では、遊走する微小環境の足場としてコラーゲン I またはマトリゲルを要すること (図 1)。



LPA に対して濃度依存性に走化性を示すこと、この活性は LPA の阻害剤 Ki16425 で濃度依存性に抑制されることを示し、この評価系の確立を確認した (図 2)。

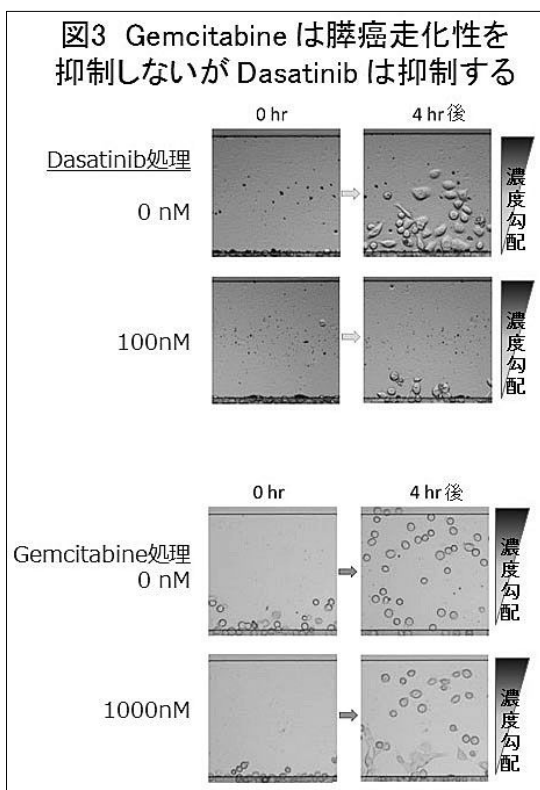


次に、この評価系を用いて、血清 (ウシ胎児血清) のうちどの分画に走化性惹起活性があるのかを検討した。目的の物質がタンパク質、脂質、糖質、あるいは低分子化合物であることを想定し、それぞれの可能性を検討した。血清に熱処理 (120、20 分、2 気圧)

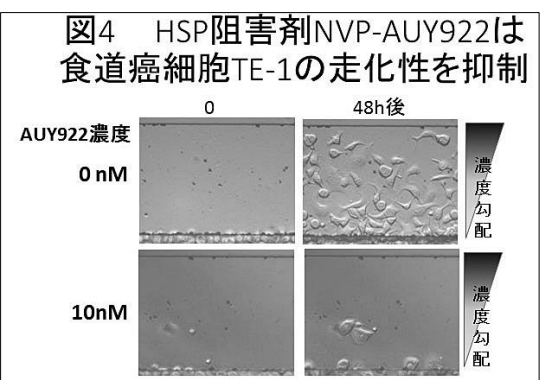
を加えてタンパク質を変性しても活性は保たれたことから、**目的物質はタンパク質ではないことが分かった**。また、血清を逆相カラムで分離すると、疎水性分画にその活性があることが分かった。この分画について質量分析計を用いて、走化性惹起活性をもつ物質群を分析した。この成果として見いだされた新規分子については現在、特許出願を準備中である。

さらに、この走化性評価系が膵癌以外の種々の癌細胞でも評価可能かを検討し、悪性黒色腫、乳癌、食道癌、大腸癌の細胞株等でも評価可能であることを確認した。

また、癌細胞の遊走を抑制することを目的に、膵癌細胞を含むこれらの細胞の遊走に対して種々の阻害剤を試したところ、Src 阻害剤である Dasatinib (図 3)そして熱シヨツ



クタンパク質 90 (HSP90) 阻害剤である NVP-AUY922 (図 4) がこれらの癌細胞の走化性を抑制することを見出した。これは、癌



増殖を抑制する薬剤として開発されている物質について、癌細胞走化性をも抑制する効果を持つことを TAXIScan 法にて初めて示し

た例である。

同定した因子の担癌マウス (*in vivo*) で確認：

担癌マウスを用いた *in vivo* での腫瘍の増大・転移についての評価系を構築した。現在、上記の走化性惹起活性について *in vivo* での活性を評価しており、さらなる解析が必要である。

また、癌転移し、生着する組織には転移促進に関わる物質の存在が予想され、探索したところ、炎症組織で産生される S100 タンパク質 (特に A8, A9, A11) が重要であることを見出した。

癌患者の血清中での転移惹起因子の確認：

上記 *in vitro* 実験および動物実験を踏まえて、膵癌患者の血清に同様の因子が存在するのか否かについてまだ確認ができておらず、今後確認を進める必要がある。

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 8 件)

1. Kawai C, Yamauchi A, Kuribayashi F. Monoclonal antibody 7D5 recognizes the R147 epitope on the gp91phox, phagocyte flavocytochrome b558 large subunit. **Microbiology and Immunology**. 2018; in press. 査読有
2. Katase N, Nishimatsu SI, Yamauchi A, Yamamura M, Terada K, Itadani M, Okada N, Hassan NMM, Nagatsuka H, Ikeda T, Nohno T, Fujita S. DKK3 Overexpression Increases the Malignant Properties of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. **Oncology research**. 2018; 26(1):45-58. 査読有
3. Sumardika IW, Youyi C, Kondo E, Inoue Y, Ruma IMW, Murata H, Kinoshita R, Yamamoto KI, Tomida S, Shien K, Satoh H, Yamauchi A, Futami J, Putranto EW, Hibino T, Toyooka S, Nishibori M, Sakaguchi M. β -1,3-galactosyl-O-glycosyl β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 3 increases MCAM stability, which enhances S100A8 /A9-mediated cancer motility. **Oncology research**. 26, 431-444, 2018. 査読有
4. Yamauchi A, Yamamura M, Katase N, Itadani M, Okada N, Kobiki K, Nakamura M, Yamaguchi Y, Kuribayashi F. Evaluation of pancreatic cancer cell migration with multiple parameters *in vitro* by using an optical real-time cell mobility assay device. **BMC cancer**. 2017; 17(1):234. 査読有

5. Saho S, Satoh H, Kondo E, Inoue Y, Yamauchi A, Murata H, Kinoshita R, Yamamoto KI, Futami J, Putranto EW, Ruma IM, Sumardika IW, Youyi C, Suzawa K, Yamamoto H, Soh J, Tomida S, Sakaguchi Y, Saito K, Iioka H, Huh NH, Toyooka S, Sakaguchi M. Active Secretion of Dimerized S100A11 Induced by the Peroxisome in Mesothelioma Cells. **Cancer microenvironment**. 2016; 9(2-3):93-105.
 6. Banerji S, Lawrance W, Metcalfe C, Briggs DC, Yamauchi A, Dushek O, van der Merwe PA, Day AJ, Jackson DG. Homodimerization of the Lymph Vessel Endothelial Receptor LYVE-1 through a Redox-labile Disulfide Is Critical for Hyaluronan Binding in Lymphatic Endothelium. **J Biol Chem**. 2016; 291(48):25004-25018. 査読有
 7. Ruma IM, Putranto EW, Kondo E, Murata H, Watanabe M, Huang P, Kinoshita R, Futami J, Inoue Y, Yamauchi A, Sumardika IW, Youyi C, Yamamoto K, Nasu Y, Nishibori M, Hibino T, Sakaguchi M. MCAM, as a novel receptor for S100A8/A9, mediates progression of malignant melanoma through prominent activation of NF- κ B and ROS formation upon ligand binding. **Clinical & experimental metastasis**. 2016; 33(6):609-27. 査読有
 8. Kurose K, Ohue Y, Sato E, Yamauchi A, Eikawa S, Isobe M, Nishio Y, Uenaka A, Oka M, and Nakayama E. Increase of activated Treg in TIL in lung cancer and in vitro depletion of Treg by ADCC using an anti-human CCR4 mAb (KM2760). **J Thorac Oncol**. 2015, 10(1),74-83 査読有
- [学会発表](計 15 件)
1. Yamauchi A, Okamoto S, Itadani M, Kawai C, Kuribayashi F. The Effect of ROS on the chemotaxis of Inflammatory cells. Con Bio 2017 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会 合同大会(神戸市), 2017/12/06
 2. Yamauchi A, Okamoto S, and Kuribayashi F. ROS suppress the cellular chemotaxis. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, ICIS 2017. (金沢市) 2017/10/30
 3. Yamamura M, Yamauchi A, Katase N, Okawaki M, Katata Y, Kuribayashi F, Kurebayashi J, Yamaguchi Y. Heat shock protein 90 inhibitors suppress PDGFRA reactivation and other receptor tyrosine kinase activation important in drug resistant gastrointestinal stromal tumors. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017. (Washington, D.C., USA) 2017/04/03
 4. 山内明, 山村真弘, 片瀬直樹, 板谷益美, 山口佳之, 栗林太. Gemcitabine は膵癌細胞の走化性に影響を与えないが Dasatinib は走化性を抑制する. 第 54 回日本癌治療学会学術集会(横浜市)2016/10/20
 5. 山内明, 山村真弘, 片瀬直樹, 山口佳之. 癌転移を惹起・増強する血清因子の探索. 第 75 回日本癌学会学術総会(横浜市). 2016/10/06
 6. 山村真弘, 山内明, 片瀬直樹, 栗林太, 山口佳之. HSP90 阻害剤は、膵臓癌細胞における増殖、走化性および上皮間葉転換を阻害する. 第 54 回日本癌治療学会学術集会(横浜市), 2016/10/06
 7. Yamamura M, Yamauchi A, Katase N, Katata Y, Okawaki M, Sawaki A, Nohno T, Yamaguchi Y. HSP90 inhibitor inhibit the activation of multiple kinase pathways and migration of pancreatic cancer cells. AACR Precision Medicine Series: TARGETING THE VULNERABILITIES OF CANCER (Florida, USA) 2016/05/18
 8. 仁科惣治, 山内明, 小山展子, 富山恭行, 吉岡奈穂子, 原裕一, 日野啓輔. 肝細胞癌治療標的としての CD26 (DPP-4) の分子生物学的解析. 第 11 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム(広島) 2015/12/04
 9. 片瀬直樹, 寺田久美子, 西松伸一郎, 鈴木貴弘, 松崎秀紀, 山村真弘, 山内明, 大槻剛巳, 濃野勉. 口腔癌由来細胞における DKK3 遺伝子発現の影響. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会(神戸市), 2015/12/01
 10. Katase N, Yamamura M, Yamauchi A, Nishimatsu S, Nohno T. Functional analyses of DKK3 in oral squamous cell carcinoma cell lines 第 75 回日本癌学会学術総会(名古屋市). 2015/10/10
 11. Yamamura M, Yamauchi A, Katase N, Hirai T. HSP90 inhibitor inhibit the activation of multiple kinase pathways of pancreatic cancer cells 第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋市) 2015/10/09
 12. Nishina S, Yamauchi A, Hino K. CD26 (DPP-4) as a molecular target for HCC treatment. JDDW2015 the 90th Congress of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society (JGES)(東京) 2015/10/09
 13. Yamauchi A, Yamamura M, Katase N, Itadani M, Okada N, Yamaguchi Y, Nohno T, Kuribayashi F. Suppressing

pancreatic cancer metastasis by small molecular compounds. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015 (東京) 2015/07/10

14. 仁科惣治, 山内明, 小山展子, 富山恭行, 吉岡奈穂子, 原裕一, 日野啓輔肝細胞癌標的治療薬としての DPP-4 阻害剤の分子生物学的解析. 第 41 回日本肝臓学会西部会 (名古屋市) 2015/07/04
15. Yamamura M, Nohno T, Yamauchi A, Katase N, Okawaki M, Sawaki A, Matsumoto M, Hirai H, Yamaguchi Y. The new molecular target therapy of Hsp90 inhibition in esophageal squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2015 (Philadelphia, USA) 2015/04/20

〔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:

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=203>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 明 (Yamauchi, Akira)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80372431

(2) 研究分担者

栗林 太 (Kuribayashi, Futoshi)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60251443

山村 真弘 (Yamamura, Masahiro)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70299204

(3) 連携研究者

中村 雅史 (Nakamura, Masafumi)
九州大学・医学部・教授
研究者番号: 30372741

(4) 研究協力者

阪口 政清 (Sakaguchi, Masakiyo)
岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・准教授

片瀬 直樹 (Katase, Naoki)
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・助

教

板谷 益美 (Itadaini, Masumi)

川崎医科大学・医学部・実験補助員