

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19875

研究課題名(和文)肝胆膵領域癌における細胞間相互作用制御分子機構の解明および先端治療開発

研究課題名(英文)Development of novel treatment and analysis in molecular mechanism of cell-cell interaction for Hepatobiliary pancreatic carcinoma

研究代表者

藍原 有弘 (Aihara, Arihiro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：90451939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：難治性癌である肝胆膵癌における細胞間相互作用に着目してその分子機序を明らかにするとともに治療開発を目的とした。aspartate beta-hydroxylase (ASPH)によるNotch経路制御が肝細胞癌だけでなく、膵臓癌、胆道癌にも有望な治療標的となり得ることが示された。膵神経内分泌腫瘍に対する細胞間相互作用解析実験基盤の確立および、肝胆膵領域癌における治療抵抗性獲得機序解析に有用なin vivo実験モデル開発に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Hepatobiliary pancreatic cancer is well known as poor prognostic cancers. Our purpose is development of novel treatment and investigation of cell-cell interaction in hepatobiliary pancreatic cancer. Overexpression of aspartate beta-hydroxylase (ASPH) is frequently observed not only in hepatocellular carcinoma but also in pancreatic and biliary cancer, which positively regulates Notch signaling pathway. The biological effects of ASPH inhibitors on the Notch signaling cascade were evaluated. The ASPH inhibitor reduced suppressed cell migration, invasion in pancreatic and biliary cancer. Furthermore, substantial inhibition of tumor growth and progression was observed in animal models. ASPH is promising for treatment of hepatobiliary pancreatic cancer. Additionally experiments to investigate cell-cell interaction in Neuroendocrine tumor were established and novel animal model was developed to analyze molecular mechanisms acquiring resistance for anti-cancer treatment.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：細胞間相互作用 ASPH

1. 研究開始当初の背景

肝胆膵領域癌において外科手術による切除が唯一の根治的治療であるが、診断時に手術適応となる症例は少ない、またたとえ外科的根治切除が施行されても、再発率は高く、予後不良な症例が多い。癌に対する分子生物学的解析の発展により分子標的阻害剤を中心とした、新規癌治療開発の進歩は著しい。しかし、肝胆膵領域癌においてはその恩恵はまだまだ少なく、新規治療開発が喫緊の課題といえる。近年、癌研究において癌幹細胞の存在など、癌細胞の不均一性が注目されており、癌の特性である転移、浸潤、治療抵抗性獲得のメカニズム解明に重要な概念である。生体内では細胞間相互作用により不均一性が誘導されるが、そのなかでも Notch 経路は神経、造血、血管、体節などの様々な分化過程に関係し、ヒトを含め脊椎動物から節足動物まで多くの後生動物でよく保存された遺伝子調節（シグナル伝達）経路である。Notch 受容体は一回膜貫通型受容体であり、Notch 受容体にリガンドが結合すると Notch タンパクは細胞膜で細胞外ドメインと細胞内ドメインにプロテアーゼに切断され、細胞内ドメインが細胞質へ遊離して核内の CBF1 と結合することで、標的遺伝子の転写活性が行われる。Notch シグナリング経路は細胞間情報伝達において非常に重要であり、その経路は発生や恒常性の維持のための細胞分化のための遺伝子制御を担っている。癌組織においても Notch 経路の異常が多く報告されており、難治性の肝胆膵領域癌（肝細胞癌、胆管細胞癌、膵癌）においても Notch 経路異常が発癌、進展に関与していることが予想される。

2. 研究の目的

Notch 経路による細胞間相互作用は癌組織の維持、増殖、浸潤、転移および薬剤抵抗性に重要な役割を果たしていることが予想され、有望な治療標的候補である。申請者は aspartate beta-hydroxylase (ASPH) が Notch 受容体およびそのリガンドの細胞外ドメインを修飾することにより Notch 経路を制御していることを世界で初めて報告した。Notch 受容体 リガンド間の直接制御は細胞間相互作用の解明に新たな知見をもたらすと考える。本研究では ASPH による Notch 経路制御をもちいて、癌組織における細胞間相互作用を明らかにし、新規治療標的探索を目的とする。

3. 研究の方法

Notch シグナルの生体内での重要な特徴は、隣り合う同起源の細胞同士間で受容体を供給する細胞とリガンドを供給する細胞が異なった運命をたどることにある。そのことは胎生期における各臓器における分化、発生制御に重要な役割を果たすことが知ら

れているが、癌組織においても幹細胞特性の誘導、宿主反応による血管新生など癌の維持、進展に重要な機構である。ASPH は Notch 経路の細胞外ドメインを修飾することにより、Notch 受容体-リガンド間の親和性を変化させることが予想される。本研究では ASPH 強制発現株、および ASPH 特異的阻害剤を用い、ASPH による Notch 経路制御モデルを作成する。プラスミドおよび ASPH 特異的阻害剤は研究協力者である、米国ブラウン大学肝臓研究所所長 Dr. Jack R Wands より供与いただくことが可能である。

肝胆膵癌同所性モデルの作成：免疫不全マウスを麻酔下に開腹し肝臓、脾臓、膵臓にヒト癌細胞株を注入することによる、各種、肝胆膵癌動物モデル作成の技術を有している。数種のヒト肝胆膵癌細胞株と免疫不全マウスを用いて、同所モデルを作成し、以降の実験に使用する。細胞間相互作用 *in vivo* リアルタイム解析の開発：申請者が所属する研究室は、Intravital videomicroscopy system を有しており、ラットおよびマウス等の小動物の肝類洞レベル微小環境の生体内ライブ観察が可能である。この Intravital videomicroscopy system は顕微鏡と動物固定装置、麻酔装置を組み合わされた装置であり、全身麻酔下にラットおよびマウス等の小動物の心拍動下肝臓微小環境をリアルタイムに約 4 時間にわたる連続観察が可能である。マウス脾臓に各種癌細胞株の細胞株浮遊液を注入することにより、経門脈的に肝類洞内に流入する癌細胞の動態をリアルタイムで観察することが可能である。また、蛍光マーカーを導入した細胞を作成し、リアルタイム蛍光観察を行う。

Notch 経路による血管新生評価 Notch 経路は癌細胞同士の細胞間相互作用のみならず、宿主細胞との相互作用にも重要な役割を果たしている。特に Delta 4 リガンドと Notch 1 受容体による腫瘍血管新生誘導が報告されており、上記動物モデルと ASPH 阻害剤を用いて、Notch 経路制御による細胞間相互作用変化が血管新生に与える影響を *in vivo* にて評価する

4. 研究成果

肝胆膵外科領域の難治性癌に対して細胞間相互作用に着目した分子制御基盤に基づいた新規治療開発を行った。とくに肝腫瘍、局所進行膵癌、転移性膵癌など実臨床に即した xenograft モデルを作成し、その分子標的治療開発を行った。生体内において EGF liked domain の Asp、Asn 残基を特異的に阻害し、Notch 経路の受容体-リガンド親和性を制御している ASPH について、膵癌に対するその意義を検証した。膵癌臨床検体において ASPH 高発現は有意にその臨床病理学的悪性度と相関することを見出した。膵癌細胞株を用い

た検討では、ASPH の on off により有意にその増殖力、遊走能、浸潤能が更新することが示された。タンパク発現解析では、Notch 経路の更新が示され、ASPH 過剰発現により Notch 細胞内ドメインの核内移行が確認され、ASPH による Notch 経路制御が確認された。構造相関活性分析より開発された ASPH 特異的阻害剤を用いた検討では、同様に ASPH 阻害により、浸潤能、遊走能、増殖能は抑制され、Notch 受容体の cleavage による活性化を阻害し、Notch の標的遺伝子である Hes1, Hey1 の発現低下が確認された。さらに ASPH 高発現 MiaPaCa2 株による xenograft の検討では選択的 ASPH 阻害剤による効果が ASPH 高発現腫瘍において有意に高い治療効果を示し、膵癌治療標的としての ASPH 阻害剤の可能性が示唆された。

胆道癌も非常に予後不良な癌として知られているが、95%の胆道癌に ASPH の高発現が確認されている。胆道癌細胞株に ASPH 強制発現させた検討では、有意にその増殖能、遊走能、浸潤能が亢進し高悪性度を獲得することが確認された。また興味深いことに細胞周期制御因子である cyclin D1 の高発言が確認された。Xenograft による in vivo 検討では ASPH 阻害剤が胆道癌でも同様に高腫瘍効果を示すことが確認された。

膵神経内分泌腫瘍において ASPH の過剰発言を観察したが、その臨床病理学的意義について、臨床検体による解析を試みたが、現時点での症例数、観察期間では有意差を持った因子は検出されなかった。並行して神経内分泌腫瘍における細胞間相互作用解析のために、臨床検体からの細胞株樹立実験基盤を構築し確立した。今後の細胞株樹立により膵神経内分泌腫瘍に対する、in vitro 解析の進展が期待される。レンチウイルスベクターによる ASPH 過剰発言及び抑制モデルに加えて、Crisper Cas 9 による ASPH 発言制御技術の開発に着手している。また肝細胞癌における治療抵抗性獲得機序解明にあたり、血管新生阻害剤に対する耐性獲得機序の解明のため in vivo モデルを用いて、血管新生阻害剤耐性肝細胞癌株樹立から thymosin beta-4 による血管新生阻害耐性機序の解明に貢献した。肝細胞癌領域癌に対する治療開発において、細胞間相互作用、難治性機序解明のための臨床検体解析、in vitro, in vivo 解析技術基盤の開発を行うことができた。

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13件)(全て査読あり)

1. Huang CK, Iwagami Y, Aihara A, Chung W, de la Monte S, Thomas JM, Olsen M, Carlson R, Yu T, Dong X, Wands J. Anti-Tumor Effects of

Second Generation β -Hydroxylase Inhibitors on Cholangiocarcinoma Development and Progression. PLoS One. 2016 Mar 8;11(3):e0150336. doi: 10.137

2. Dong X, Lin Q, Aihara A, Li Y, Huang CK, Chung W, Tang Q, Chen X, Carlson R, Nadolny C, Gabriel G, Olsen M, Wands JR. Aspartate β -Hydroxylase expression promotes a malignant pancreatic cellular phenotype. Oncotarget. 2015 Jan 20;6(2):1231-48.

3. Aihara A, Wands JR, Tanaka S. Molecular pathology of advanced hepatocellular carcinoma. Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi. 2016 May;113(5):790-7. doi:10.11405/nisshoshi.113.790.

4. Katsuta E, Kudo A, Akashi T, Mitsunori Y, Matsumura S, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Tanaka S, Eishi Y, Tanabe M. Macroscopic morphology for estimation of malignant potential in pancreatic neuroendocrine neoplasm. J Cancer Res Clin Oncol. 2016 Jun;142(6):1299-306. doi: 10.1007/s00432-016-2128-1.

5. Ito H, Tanaka S, Akiyama Y, Shimada S, Adikrisna R, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Arie S, Yamaoka S, Tanabe M. Dominant Expression of DCLK1 in Human Pancreatic Cancer Stem Cells Accelerates Tumor Invasion and Metastasis. PLoS One. 2016 Jan 14;11(1) doi: 10.1371/journal.pone.0146564.

7. Akahoshi K, Tanaka S, Mogushi K, Shimada S, Matsumura S, Akiyama Y, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Arie S, Tanabe M. Expression of connective tissue growth factor in the livers of non-viral hepatocellular carcinoma patients with metabolic risk factors. J Gastroenterol. 2016 Sep;51(9):910-22. doi: 10.1007/s00535-015-1159-8. Epub 2016 Jan 6.

8. Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Shimada S, Akiyama Y, Aihara A, Matsumura S, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Fukamachi H, Tanaka

H, Nakayama K, Arii S, Tanabe M. CD73 as a therapeutic target for pancreatic neuroendocrine tumor stem cells. *Int J Oncol*. 2016 Feb;48(2):657-69. doi: 10.3892/ijo.2015.3299. Epub 2015 Dec 18.

9. Ohata Y, Shimada S, Akiyama Y, Mogushi K, Nakao K, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Arii S, Tanabe M, Tanaka S. *Mol Cancer Ther*. 2017 Jun;16(6):1155-1165. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0728. Epub 2017 Feb 28.

10. Oba A, Shimada S, Akiyama Y, Nishikawaji T, Mogushi K, Ito H, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Asahara H, Kaida A, Miura M, Tanabe M, Tanaka S. ARID2 modulates DNA damage response in human hepatocellular carcinoma cells. *J Hepatol*. 2017 May;66(5):942-951. doi: 10.1016/j.jhep.2016.12.026. Epub 2017 Feb 24.

11. Furuyama T, Kudo A, Matsumura S, Mitsunori Y, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Tanaka S, Tanabe M. Preoperative direct bilirubin to prothrombin time ratio index to prevent liver failure after minor hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2016 Dec;23(12):763-770. doi: 10.1002/jhbp.400. Epub 2016 Oct 12.

12 Huang CK, Aihara A, Iwagami Y, Yu T, Carlson R, Koga H, Kim M, Zou J, Casulli S, Wands JR. Expression of transforming growth factor β 1 promotes cholangiocarcinoma development and progression. *Cancer Lett*. 2016 Sep 28;380(1):153-62. doi: 10.1016/j.canlet.2016.05.038. Epub 2016 Jun 27.

13. Furuyama T, Tanaka S, Shimada S, Akiyama Y, Matsumura S, Mitsunori Y, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Fukamachi H, Arii S, Kawaguchi Y, Tanabe M. Proteasome activity is required for the initiation of precancerous pancreatic lesions. *Sci Rep*. 2016 May 31;6:27044.

doi: 10.1038/srep27044.

〔学会発表〕(計5件)

1. 第51回日本肝臓学会総会(熊本県熊本市): 肝細胞癌に対する Aurora kinase B を標的とした治療開発。藍原有弘、松永浩子、田中真二 2015年5月21日
2. 第115回日本外科学会定期学術集会(愛知県名古屋市): 肝細胞癌に対する新規治療標的としての Aspartyl-(Asparaginy)^beta-hydroxylase (ASPH)。藍原有弘、Chiung-Kuei-Huang、Waihong Chung、松村聡、伴大輔、落合高德、工藤篤、田中真二、田邊稔、Jack Wands 2015年4月16日
3. 第27回日本肝胆膵外科学会学術集会(東京都港区): 肝胆膵領域癌に対する新規治療標的の探索。藍原有弘、田中真二、田邊稔、Wands Jack。2015年6月11日
4. 第70回日本消化器外科学会総会(静岡県浜松市): A cell surface beta-hydroxylase is a novel therapeutic target for pancreatic cancer。藍原有弘、田中真二、松村聡、光法雄介、伴大輔、落合高德、工藤篤、田邊稔、Jack Wands。2015年7月15日
5. 第53回癌治療学会学術集会(京都府京都市): 肝胆膵領域癌に対する治療標的としての ASPH の解析。藍原有弘、Chiung-Kuei-Huang、Mark Olsen、Waihong Chung、Tang Xiaoqun Dong、田中真二、田邊稔、Jack Wands。2015年10月29日

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藍原有弘 (Aihara Arihiro)
東京医科歯科大学医学部附属病院
肝胆膵外科非常勤講師
研究者番号: 90451939