

令和元年5月26日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10568

研究課題名(和文) Pre-metastatic nicheを制御する新規転移抑制治療法の開発

研究課題名(英文) Novel strategies to target the premetastatic niche for cancer metastasis

研究代表者

水野 隆史 (MIZUNO, TAKASHI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：90444413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞株においてTPX2は高発現しており、TPX2 siRNAの導入によるTPX2抑制によりMCP1の発現が亢進していた。TPX2 siRNA 導入によりTPX2発現を抑制させた癌細胞株の培養液は、増殖能および浸潤能に抑制効果を有していた。TPX2の発現抑制による癌細胞からの分泌物が、副次的効果をおこしていると考えられた。

また細胞株において、細胞傷害目的の低濃度の抗癌剤5FUでの培養液は増殖能を亢進させたが、浸潤能、運動能には有意差を認めなかった。これらの結果より癌細胞に対する細胞傷害の副次的効果が単純かつ画一的なものではないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、TPX2抑制および抗癌剤5FUによる細胞傷害後の培養液に副次的効果があり、その効果が単純かつ画一的なものではないことを明らかにした。また、新たな知見が明らかになっただけでなく、新規治療法の可能性も示唆しており、本研究成果の学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：TPX2 was highly expressed in pancreatic cancer cell lines (PANC1 and KLM1) and colon cancer cell lines (DLD1 and HCT15). A TPX2 siRNA induced the TPX2 suppression and MCP1 overexpression in PANC1 and KLM1 cells. The culture medium of TPX2 siRNA-transfected pancreatic cancer cells showed an inhibitory effect on the proliferation and invasion of cancer cells. Factors secreted by TPX2 siRNA-transfected pancreatic cancer cells may cause a secondary effect on pancreatic cancer.

Pre-exposure to 5-FU significantly enhanced its anticancer effect on the proliferation of KLM1, KP4 and DLD1 cells. However, there were no significant differences in the motility and invasion between cells that were and were not pre-exposed to 5-FU. The secondary effect was not simple and uniform in terms of cancer cell damage. Further investigations will be required for clinical applications. However, our data indicate the potential for a new therapy using TPX2 siRNA to improve the cancer prognosis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：Pre-metastatic niche TPX2

1. 研究開始当初の背景

癌に対する診断や治療の進歩により、一部の癌においてはその治療成績の改善が報告されている。しかし、局所高度浸潤症例や転移症例などは外科的切除ができず、十分な治療法もないためその治療成績は満足のいくものではない。膵癌の切除不能・遠隔転移症例の場合、その予後は5年生存率5.5%と極めて予後不良である。癌における治療成績の改善のためには新規治療法、特に遠隔転移を対象とした転移抑制治療法の開発が極めて重要である。

niche は、細胞の維持や細胞機能、増殖を制御する特殊な微小環境であり、転移メカニズムにおいても niche の重要性が報告されている。特に Pre-metastatic niche は、原発巣の癌細胞が産生するサイトカインや増殖因子が、遠隔臓器の血管内皮前駆細胞、線維芽細胞などの間質細胞を活性化させ、遠隔臓器に作らせる癌細胞の転移しやすい環境のことである。癌細胞は遠隔臓器に形成された Pre-metastatic niche に生着し、転移巣を形成し、Micrometastasis、さらに Macrometastasis になっていくと考えられる。Pre-metastatic niche を解明することにより新たな転移抑制治療法の開発が可能と考えられる。

科学研究費補助金(基盤研究C)平成23~26年度、「膵癌における新規治療抵抗性遺伝子の探索とその阻害剤による治療法の開発」において TPX2 (targeting protein for Xklp2) を標的にした分子標的治療法の実験を行った。TPX2 は増殖だけでなく浸潤にも関与しており、血管新生アレイによる血管新生関連分子の探索を行い、TPX2 の浸潤メカニズムでの IGFBP3 の関与を報告している。また IGFBP3 以外にも浸潤抑制に関連して MCP1 などの血管新生関連分子が変動していた。

Pre-metastatic niche では、遠隔臓器での血管内皮前駆細胞などの活性化が重要な要素の1つであり、血管新生関連分子が Pre-metastatic niche に関連していると考えられる。しかし、Pre-metastatic niche については、niche が高度で複雑な構造をしており再構成が困難であり、いまだ多くのことがわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では癌における血管新生関連分子が Pre-metastatic niche へどのように作用するのか詳細なメカニズムの解明を行い、Pre-metastatic niche を制御する新規転移抑制治療法の実験を行う。

3. 研究の方法

膵癌細胞株 PANC1、KLM1、大腸癌細胞株 DLD1、HCT15 における TPX2 タンパクの発現をウェスタンブロッティング法にて検討した。

TPX2 に対する siRNA を作成し、膵癌細胞株 PANC1、KLM1、KP4 に導入した。導入前、導入後24、48時間後 TPX2 タンパクの発現をウェスタンブロッティング法にて検討した。

膵癌細胞株 PANC1、KLM1 に TPX2 siRNA 導入した。導入前、導入後24、48時間後 MCP1 タンパクの発現をウェスタンブロッティング法にて検討した。

ヒト胆管癌細胞株 HuCCT1、ヒト大腸癌細胞株 DLD1 に TPX2 siRNA 導入した。導入前、導入後24、48時間後の増殖能を MTT アッセイにて経時的に検討した。導入24時間後の運動能についてはスクラッチアッセイ、24時間後の浸潤能についてはインベーションアッセイにて検討した。

膵癌細胞株 PANC1、KLM1、KP4 に TPX2 siRNA 導入した。TPX2 の発現を抑制させた膵癌細胞株

PANC1、KLM1、KP4 の培養液を回収し、この培養液を用いてそれぞれの膵癌細胞株の培養を行なった。TPX2 siRNA 導入により TPX2 の発現が抑制された膵癌細胞株の培養液での培養後 24、48 時間後の増殖能を MTT アッセイにて経時的に検討した。TPX2 siRNA 導入により TPX2 の発現が抑制された膵癌細胞株の培養液での培養 24 時間後に運動能についてはスクラッチアッセイ、浸潤能についてはインベーションアッセイにて検討した。

膵癌細胞株 KLM1、KP4、大腸癌細胞株 DLD1 に 5FU の投与を行い、投与後 24、48 時間後に培養液を回収した。5FU 非投与の培養液、5FU 投与後 24、48 時間の培養液で膵癌細胞株および大腸癌細胞株の培養を行い、培養前、培養後 24、48 時間後の増殖能を MTT アッセイにて経時的に検討した。培養 24 時間後の細胞死誘導能についてトリパンブルー色素排出試験にて、アポトーシスについては Muse Annexin V & Dead Cell kit を用いて検討した。培養 24 時間後の運動能についてはスクラッチアッセイ、24 時間後の浸潤能についてはインベーションアッセイにて検討した。

4 . 研究成果

【TPX2 発現抑制による血管新生関連分子の機能解析】

膵癌細胞株 PANC1、KLM1、大腸癌細胞株 DLD1、HCT15 における TPX2 の発現についてウェスタンブロッティング法にて検討した。PANC1 の TPX2 発現量を 1 としたときの KLM1 の TPX2 発現量は 0.4122、KP4 の TPX2 発現量は 0.3275、DLD1 の TPX2 発現量は 0.6800、HCT15 の TPX2 発現量は 0.6304 であった。TPX2 遺伝子の発現量は、膵癌細胞株 PANC1 で最も高発現していた。

TPX2 に対する siRNA を作成し、これらの TPX2 siRNA を膵癌細胞株 PANC1、KLM1、KP4 に導入し、TPX2 の抑制効果をウェスタンブロッティング法により検討した。PANC1 のコントロール群での TPX2 発現を 1 にした場合、siTPX2 による抑制効果は 0.4072、KLM1 での抑制効果は 0.8507、KP4 では十分に抑制できなかった。膵癌細胞株 PANC1、KLM1 への TPX2 siRNA を導入後の MCP1 の発現をウェスタンブロッティング法により検討した。PANC1 のコントロール群での MCP1 発現を 1 にした場合、TPX2 siRNA による抑制効果は 2.227、KLM1 での抑制効果は 1.852 であった。TPX2 siRNA の導入により、TPX2 の発現量が低下した PANC1 と KLM ではコントロール群と比較して MCP1 発現量が増加していた。

【血管新生関連分子の転移への影響の検討】

ヒト胆管癌細胞株 HuCCT1、ヒト大腸癌細胞株 DLD1 に対して TPX2 siRNA を導入し、TPX2 の発現を抑制させ、増殖能、細胞死誘導能、運動能、浸潤能について検討した。増殖能に関して、いずれの細胞株においても TPX2 siRNA は未治療群と比較して有意に増殖能、運動能および浸潤能を抑制させた。これまで報告している膵癌細胞株での結果と同様に、TPX2 が胆管癌、大腸癌においても増殖や浸潤に関与していることが示唆された。

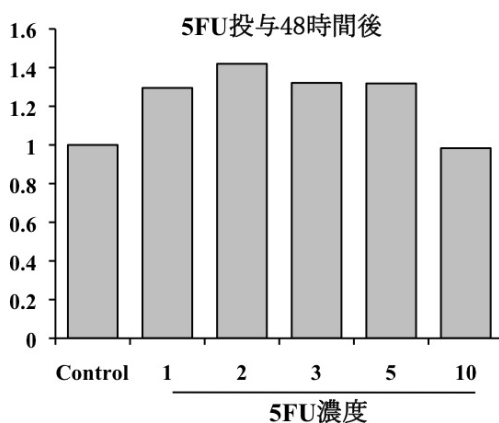
TPX2 siRNA を導入し、TPX2 の発現を抑制させた膵癌細胞株 PANC1、KLM1、KP4 において、TPX2 siRNA の導入前、導入後 24、48 時間後に培養液を回収し、それぞれの培養液で膵癌細胞株の培養を行い、増殖能、細胞死誘導能、運動能、浸潤能について検討した。増殖能および浸潤能に関して、TPX2 siRNA 導入により TPX2 の発現が抑制された膵癌細胞株の培養液は、TPX2 の発現が抑制されていない膵癌細胞株の培養液と比較して、癌細胞の増殖能および浸潤能が抑制していた。しかし導入後 24、48 時間後の培養液では増殖能および浸潤能の経時的な変化に有意差を

認めなかった。一般的に、増殖を抑制させた細胞と増殖を抑制させていない細胞の培養液を用いて細胞培養を行なった場合、増殖を抑制させた細胞のほうが培養液中の血清等の消費が抑制される。そのため増殖を抑制させた細胞の培養液での培養の方が、相対的に細胞が増殖する。しかし、TPX2 siRNA 導入により TPX2 の発現が抑制された膵癌細胞株においては、TPX2 の発現抑制により癌細胞の増殖が抑制され、培養液中の血清等の消費が抑制されたにもかかわらず、TPX2 siRNA 導入群において増殖が抑制された。TPX2 の発現抑制により癌細胞から分泌されたものが、副次的効果をおこしていることが示唆された。

【Pre-metastatic niche を標的にした治療法の開発】

膵癌細胞株 PANC1 と KLM では siTPX2 の導入後の TPX2 の発現低下により MCP1 発現量が増加していた。このことより、細胞傷害による細胞分泌因子の関与を考え、ヒト膵癌由来細胞株 KLM1、KP4、ヒト大腸癌由来細胞株 DLD1 に対して細胞傷害のために 5FU の投与を行い、投与後 24、48 時間後に培養液を回収した。非投与の培養液、投与後 24、48 時間の培養液で膵癌細胞株および大腸癌細胞株の培養を行い、増殖能、細胞死誘導能、運動能、浸潤能について検討した。高濃度の 5FU での培養液では、非投与および投与後 24、48 時間の培養液にて増殖能、浸潤能、運動能のいずれにおいて有意差を認めなかった。しかし低濃度の 5FU での培養液では、非投与と比較して投与後 24、48 時間の培養液で増殖能の亢進を認めた(図 1)。

図 1



浸潤能、運動能に関しては有意差を認めなかった。この結果は TPX2 の発現抑制の場合と異なり細胞傷害において、副次的効果が単純かつ画一的なものではないことを明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Baba T, Kokuryo T, Yamaguchi J, Yokoyama Y, Uehara K, Ebata T, Nagino M. Pre-exposure to Fluorouracil Increased Trifluridine Incorporation and Enhanced its Anti-tumor Effect for Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2018 Mar;38(3):1427-1434. PMID: 29491068 (査読有)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 榑野 正人

ローマ字氏名：(NAGINO,masato)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 20237564

研究分担者氏名：横山 幸浩

ローマ字氏名：(YOKOYAMA,yukihiro)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：寄附講座教授

研究者番号(8桁): 80378091

研究分担者氏名：國料 俊男

ローマ字氏名：(KOKURYO,toshio)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 60378023

研究分担者氏名：山口 淳平

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI,junpei)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 00566987

(2)研究協力者

なし