

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K10587

研究課題名(和文) ヒアルロン酸を標的とした癌微小環境の制御による新規膵癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Therapies for Pancreatic Cancer by Regulating the Cancer Microenvironment Using Hyaluronan as a Target

研究代表者

袴田 健一 (Hakamada, Kenichi)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：30271802

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)：膵癌の増殖調節と治療抵抗性の獲得に関与する間質の主要構成成分であるヒアルロン酸を標的とする新規治療の開発を目的に、ヒアルロン酸の合成抑制作用を有する4-methylumbelliferone(MU)の膵癌の増殖と進展、抗癌剤の作用増強効果、免疫機能に与える影響を検討した。結果、各種膵癌細胞株を用いてMUによるHA合成抑制、組織レベルでのMUによるHA合成抑制、MU投与下の抗癌剤5FUの膵癌細胞内移行の増加、HA減少時の細胞障害性リンパ球の組織内移行を確認し、腫瘍抑制効果と機序を明らかにした。膵癌の微小環境を形成するヒアルロン酸を標的とする治療は、膵癌の新規治療として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の難治性の機序として、癌細胞自体の悪性度に加えて、強固に形成された間質を特徴とする微小環境が、抗癌剤の分布・拡散と免疫細胞の到達を阻害していることが示唆されている。本研究は、膵癌間質の多くを占め、細胞機能に重要な役割をもつヒアルロン酸を標的として、ヒアルロン酸合成阻害剤である4-methylumbelliferone(MU)による新規治療の可能性を検証した点で学術的意義が高い。得られた結果は、MUによる直接的な膵癌に対する抗腫瘍作用に加え、微小環境変化による抗癌剤や細胞障害性免疫担当細胞の腫瘍内への移行促進効果を明らかにし、新規機序による膵癌治療の可能性を示した点で社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of 4-methylumbelliferone (MU), an inhibitor of hyaluronan synthesis, on pancreatic cancer growth and progression, enhancement of anticancer drug effects, and immune function in order to develop novel therapies targeting hyaluronan, a major component of the stroma involved in the regulation of pancreatic cancer growth and the acquisition of resistance to treatment. We confirmed 1) the suppression of hyaluronan synthesis by MU in various pancreatic cancer cell lines, 2) the suppression of hyaluronan synthesis by MU at the tissue level, 3) the increased intracellular transfer of the anticancer drug 5-FU into pancreatic cancer cells under MU administration, and 4) the intratumoral transfer of cytotoxic lymphocytes during hyaluronan depletion, and these results clarified the tumor suppressive effect and mechanism. Targeting hyaluronic acid, which forms a microenvironment, is expected to be a novel therapeutic method for pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 間質 ヒアルロン酸 4メチルウンベリフェロン 癌幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 難治癌の代表である膵癌では、癌細胞自体の悪性度に加えて、膵癌細胞周囲に形成される豊富な間質が、治療抵抗性を獲得に関与している可能性が示唆されてきた。
- (2) 申請者は、癌間質の多くを占めるヒアルロン酸の合成を、4-methylumbelliferone (MU) が特異的に抑制することを見出し、多様な癌腫で抗腫瘍効果を確認してきた。また、膵癌細胞を用いた前研究で、MU が単体でヒト膵癌細胞に抗腫瘍効果を有することを明らかにしてきた。
- (3) 一方で、ヒアルロン酸合成抑制による膵癌細胞への抗がん剤移行の増強効果や免疫細胞による傷害増強効果や、抗腫瘍効果の具体的な機序と有効性の不十分であり、解明が待たれていた。

2. 研究の目的

MU のヒアルロン酸合成抑制による、1) 膵癌細胞への抗がん剤移行増強効果、2) 免疫担当細胞の腫瘍内移行増強効果、を検証するとともに、3) ヒアルロン酸のリガンドである癌幹細胞マーカーの CD44 との関係を検討し、MU による抗腫瘍作用の機序と新規抗腫瘍薬としての可能性を検証することを目的とした。

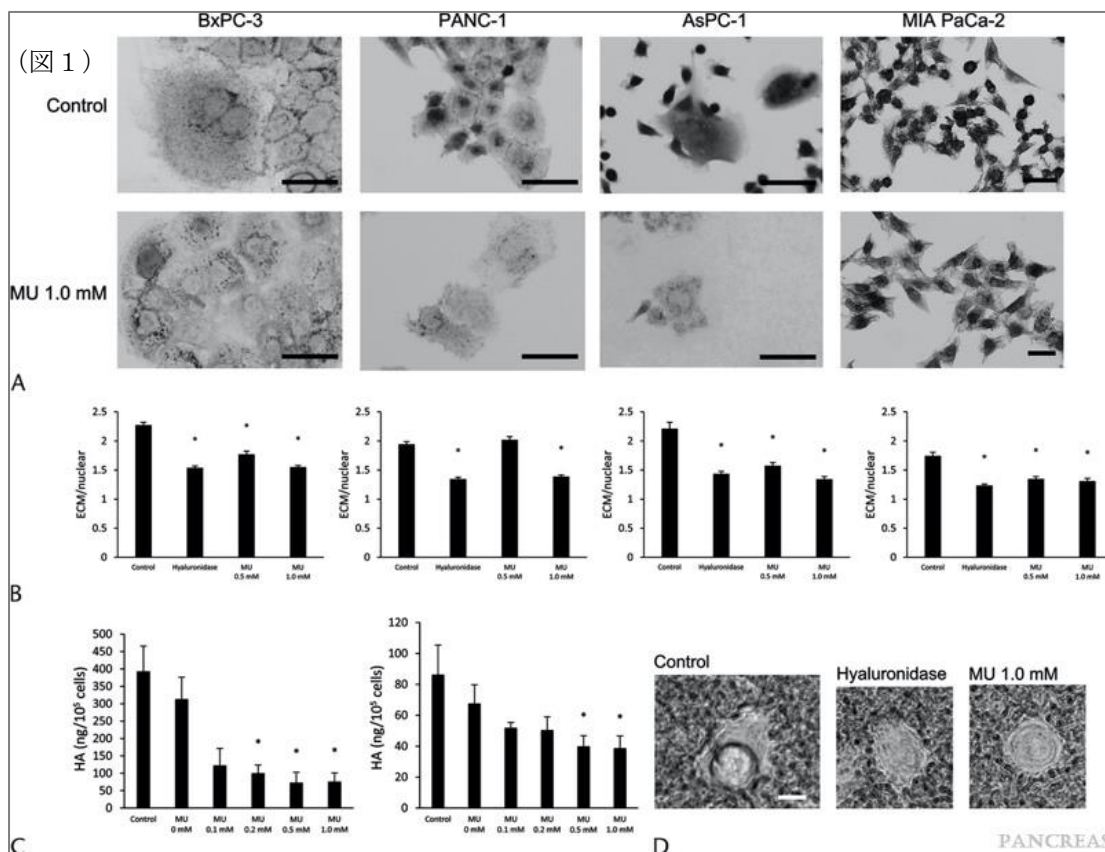
3. 研究の方法

ヒト膵癌の培養細胞株およびマウス異種移植モデルを用い、以下の方法で検討した。

- (1) 各種細胞株における MU によるヒアルロン酸合成抑制の確認試験
- (2) 組織レベルでの MU によるヒアルロン酸合成抑制の確認試験
- (3) MU 投与下の、抗癌剤の膵癌細胞への移行に関する定量試験
- (4) 間質減少の細胞障害性リンパ球の挙動の変化に関する検討
- (5) gemcitabine, nab-paclitaxel と MU との併用効果に関する検討
- (6) CD44 を介した細胞内シグナル伝達への影響に関する検討
- (7) MU 併用抗癌剤投与による幹細胞制御に関する検討

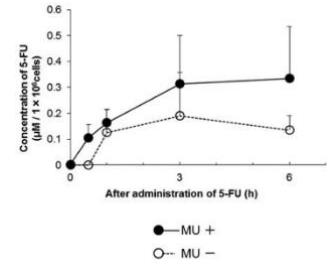
4. 研究成果

- (1) 各種細胞株ならびに組織レベルでの MU によるヒアルロン酸合成抑制の確認試験
各種細胞株 (BxPC-3, Panc-1, AsPC-1, MIA PaCa-2) で MU 濃度依存性にヒアルロン酸合成抑制を確認した。1.0mM MU は細胞増殖を 45-70%, ヒアルロン酸合成を 55%-80%抑制した。形態的にも膵癌細胞周囲のヒアルロン酸減少を確認した。(図1)



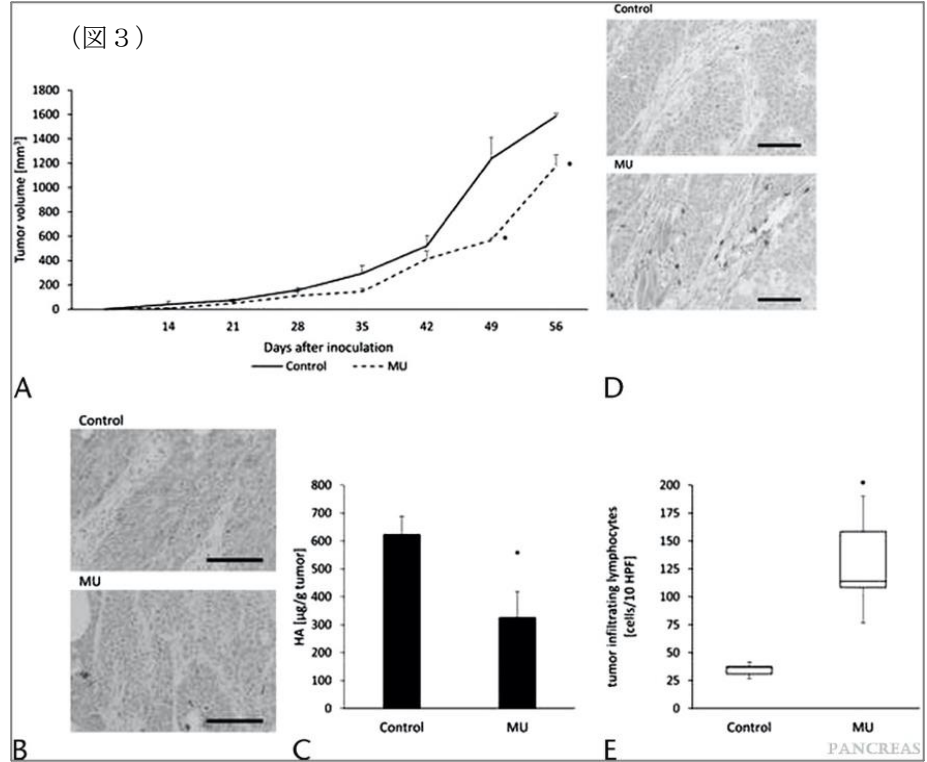
- (2) MU 投与下の、抗癌剤の膵癌細胞への移行に関する定量試験
 MU 投与下での膵癌細胞内への 5-FU の移行の上昇を確認した。
 (図 2)

(図 2)



- (3) 間質減少の細胞障害性リンパ球の挙動の変化に関する検討

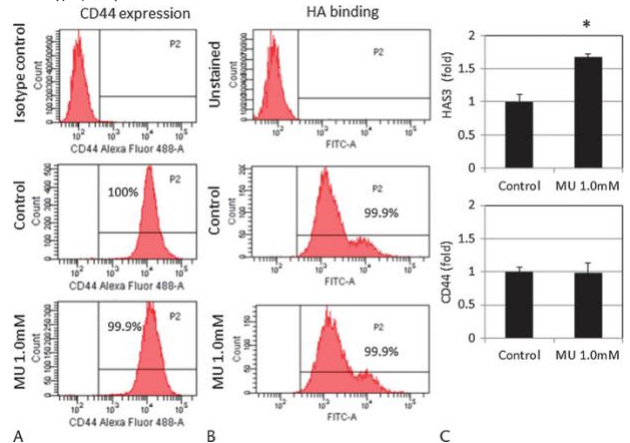
In Vitro では、1.0mM MU は、 $\gamma \delta$ T-cell-rich peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) の細胞障害性を増強した。
In Vivo では、MU は腫瘍組織内ヒアルロン酸量を減じ、 $\gamma \delta$ T-cell-rich PBMCs の組織内への移行を促進し、腫瘍増大を抑制した。(図 3)



- (4) gemcitabine, nab-paclitaxel と MU との併用効果に関する検討
 MU 投与により、gemcitabine と nab-paclitaxel の細胞内濃度の上昇と、細胞障害性の増強が確認された。

- (5) CD44 を介した細胞内シグナル伝達への影響に関する検討ならびに膵癌幹細胞 (CD44 発現細胞) の増殖能への影響と MU 併用抗癌剤投与による幹細胞制御に関する検討
 ヒアルロン酸は癌幹細胞マーカーである CD44 のリガンドを有することから、MU によるヒアルロン酸合成抑制によって、膵癌細胞の増殖調整の可能性を作業仮説としたが、MU は膵癌細胞の Apoptosis を誘導するものの、CD44 の発現ならびに CD44 とヒアルロン酸の結合性に影響を及ぼしてはいなかった。(図 4)

(図 4)



以上の結果をまとめると、

- (1) MU は各種膵癌細胞のヒアルロン酸合成を抑制し、単独で腫瘍増殖抑制効果と Apoptosis 誘導効果を有することが判明した。
- (2) MU の投与によって、膵癌細胞内の抗癌剤濃度が上昇し、細胞障害性が上昇した。
- (3) MU の投与によって、膵癌組織内のヒアルロン酸量が減量し、膵癌組織内に細胞障害性リンパ球の浸潤、さらには腫瘍量の減量が確認された。

このような結果から、MU は難治性癌の代表である膵癌に対して、新規機序による治療薬として有望視された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Umetsu S, Mizukami H, Saito T, Uchida C, Igawa A, Kudo K, Itabashi C, Osonoi S, Danyang G, Sasaki T, Yagihashi S, Hakamada K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Diabetes, an independent poor prognostic factor of non-B non-C hepatocellular carcinoma, correlates with dihydropyrimidinase-like 3 promoter methylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-57883-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morohashi S, Morohashi H, Seino H, Yoshizawa T, Haga T, Goto S, Wu Y, Sakamoto Y, Hakamada K, Kijima H	4. 巻 11
2. 論文標題 Investigating the association between radiological images and the pathology of rectal cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 573-579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2019.1931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hara Y, Miura T, Sakamoto Y, Morohashi H, Nagase H, Hakamada K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Organ/space infection is a common cause of high output stoma and outlet obstruction in diverting ileostomy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Surg.	6. 最初と最後の頁 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12893-020-00734-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wakasa Y, Kimura N, Yamada T, Shimizu T, Hakamada K, Tsuchida S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Delay in hepatocyte proliferation and prostaglandin D2 synthase expression for cholestasis due to endotoxin during partial hepatectomy in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 4367-4375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2019.10681.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Katsuda M, Miyazawa M, Ojima T, Katanuma A, Hakamada K, Sudo K, Asahara S, Endo I, Ueno M, Hara K, Yamada S, Fujii T, Satoi S, Ioka T, Ohira M, Akahori T, Kitano M, Nagano H, Furukawa M, Adachi T, Yamaue H.	4. 巻 20
2. 論文標題 A double-blind randomized comparative clinical trial to evaluate the safety and efficacy of dendritic cell vaccine loaded with WT1 peptides (TLP0-001) in combination with S-1 in patients with advanced pancreatic cancer refractory to standard chemotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trials	6. 最初と最後の頁 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13063-019-3332-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hakamada K	4. 巻 1
2. 論文標題 Cancer stroma-targeting therapy: A new tool for fighting pancreatic cancer?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg	6. 最初と最後の頁 120-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suto A, Kudo D, Yoshida E, Nagase H, Suto S, Mimura J, Itoh K, Hakamada K.	4. 巻 48
2. 論文標題 Increase of Tumor Infiltrating T-cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Through Remodeling of the Extracellular Matrix by a Hyaluronan Synthesis Suppressor, 4-Methylumbelliferone.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pancreas.	6. 最初と最後の頁 292-298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida E, Kudo D, Nagase H, Suto A, Shimoda H, Suto S, Kakizaki I, Endo M, Hakamada K.	4. 巻 38
2. 論文標題 4-Methylumbelliferone Decreases the Hyaluronan-rich Extracellular Matrix and Increases the Effectiveness of 5-Fluorouracil	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 5799-5804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Takeshi, Mizukami Hiroki, Umetsu Satoko, Uchida Chiaki, Inaba Wataru, Abe Makoto, Takahashi Kazuhisa, Kudo Kazuhiro, Itabashi Chieko, Yagihashi Soroku, Hakamada Kenichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Worsened outcome in patients with pancreatic ductal carcinoma on long-term diabetes: association with E-cadherin1 (CDH1) promoter methylation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18438-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Takeshi, Ishido Keinosuke, Kudo Daisuke, Kimura Norihisa, Wakiya Taiichi, Nakayama Yoshihito, Hakamada Kenichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Combination therapy with gemcitabine and nab-paclitaxel for locally advanced unresectable pancreatic cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 963 ~ 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2017.1251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kudo D, Suto A, Hakamada K.	4. 巻 18
2. 論文標題 The Development of a Novel Therapeutic Strategy to Target Hyaluronan in the Extracellular Matrix of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18030600.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagase H, Kudo D, Suto A, Yoshida E, Suto S, Negishi M, Kakizaki I, Hakamada K	4. 巻 46
2. 論文標題 4-Methylumbelliferone Suppresses Hyaluronan Synthesis and Tumor Progression in SCID Mice Intra-abdominally Inoculated With Pancreatic Cancer Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pancreas.	6. 最初と最後の頁 190-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000000741.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida E, Kudo D, Nagase H, Shimoda H, Suto S, Negishi M, Kakizaki I, Endo M, Hakamada K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Antitumor effects of the hyaluronan inhibitor 4-methylumbelliferone on pancreatic cancer.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 2337-2344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishido K, Hakamada K, Kimura N, Miura T, Wakiya T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Current topics in the surgical treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg	6. 最初と最後の頁 7-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12379.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ishido K, Kimura N, Wakiya T, Nagase H, Hakamada K
2. 発表標題 Impact of chemotherapy with gemcitabine and nab-paclitaxel in conversion surgery for UR-LA pancreatic cancer
3. 学会等名 第31回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishido K, Kimura N, Wakiya T, Goto S, Yoshizawa T, Kijima H, Hakamada K
2. 発表標題 Pathological Impact on the Stroma After Preoperative Chemotherapy With nab-Paclitaxel and Gemcitabine for Pancreatic Cancer.
3. 学会等名 The 7th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hakamada K
2. 発表標題 The rationale of conversion surgery for far-advanced pancreatic adenocarcinoma
3. 学会等名 The 31st World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakasa Y, Kimura N, Ishido K, Kudo D, Nagase N, Hakamada K.
2. 発表標題 Clinical Experience of Nab-paclitaxel Plus Gemcitabine Treatment in Recurrent Cases with Pancreatic Cancer in our Institution
3. 学会等名 International Hepato-Pancreatic-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤亜希子、工藤 大輔、吉田 枝里、長瀬 勇人、三橋 佑人、脇屋 太一、木村 憲央、石戸圭之輔、袴田 健一
2. 発表標題 膵癌間質中ヒアルロン酸を標的とした新規治療法の可能性
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須藤亜希子、工藤 大輔、吉田 枝里、長瀬 勇人、三橋 佑人、脇屋 太一、木村 憲央、石戸圭之輔、袴田 健一
2. 発表標題 膵癌間質中ヒアルロン酸を標的とした新規治療
3. 学会等名 第72回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田 枝里、工藤 大輔、長瀬 勇人、須藤亜希子、脇屋 太一、石戸圭之輔、豊木 嘉一、袴田 健一
2. 発表標題 ヒアルロン酸合成抑制剤を用いた間質制御による新たな膵癌治療法開発
3. 学会等名 第116回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 長瀬 勇人、工藤 大輔、須藤亜希子、吉田 枝里、豊木 嘉一、袴田 健一
2. 発表標題 ヒアルロン酸合成阻害剤4-メチルウンベリフェロンの膵癌に対する抗腫瘍効果
3. 学会等名 第71回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Suto A, Kudo D, Toyoki Y, Ishido K, Wakiya T, Nagase H, Yoshida T, Hakamada K
2. 発表標題 A novel tactics for the treatment of pancreatic adenocarcinoma by targeting extracellular matrix
3. 学会等名 20th meeting of the International Association of Pancreatology
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石戸 圭之輔 (Ishido Keinosuke) (00436023)	弘前大学・医学研究科・准教授 (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	工藤 大輔 (Kudo Daisuke) (00587024)	弘前大学・医学研究科・客員研究員 (11101)	
研究分担者	三浦 卓也 (Miura Takuya) (30722136)	弘前大学・医学部附属病院・講師 (11101)	
研究分担者	脇屋 太一 (Wakiya Taiichi) (50571246)	弘前大学・医学部附属病院・講師 (11101)	
研究分担者	木村 憲央 (Kimura Norihisa) (60436029)	弘前大学・医学研究科・講師 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関