

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10597

研究課題名(和文)膵癌の神経浸潤における神経細胞のオートファジーの役割の解明

研究課題名(英文)The role of autophagy in perineural infiltration of pancreatic cancer

研究代表者

江上 拓哉(EGAMI, Takuya)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：40507787

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)：膵癌は非常に予後不良な疾患であり、その進展機序解明は急務とされる。本研究では、膵癌細胞、及び膵癌の豊富な間質中に存在する膵星細胞のオートファジー活性とその役割について検討したところ、膵星細胞の活性化にオートファジーが関与していることを示した。今後、神経浸潤過程でのオートファジーの役割についてさらに検討を重ねていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の5年生存率はここ30年間でほとんど改善が無く、治療法の開発は社会的緊急性・重要度が高い。また、再発形式として神経浸潤を主体とした後腹膜再発が高率にみられることも膵癌の大きな特徴である。この原因のひとつである神経浸潤の制御の機序解明につながる膵癌間質制御のメカニズム解明は膵癌治療成績の向上の一翼を担うと考えられ、それによって得られる社会的意義は非常に高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer shows aggressive progression with a very poor prognosis. Perineural infiltration is one of the biggest reason contribute to its miserable outcome, so it is urgently needed to clarify the mechanism of pancreatic cancer invasion. In this study, we focused on the activity of autophagy in pancreatic cancer. We examined its activity and role, both of pancreatic cancer cells and pancreatic stellate cells. We showed that autophagy plays a protective role for pancreatic cancer cells, and also autophagy is involved in pancreatic stellate cell activation. These results play an important role for the elucidation of the process that pancreatic cancer infiltrate into nerves.

研究分野：医歯薬学

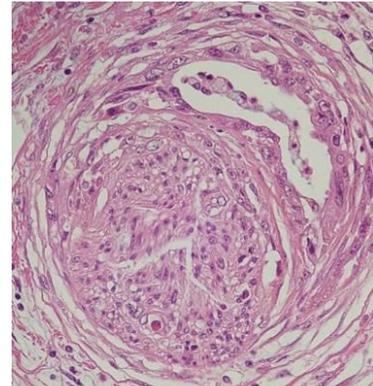
キーワード：膵癌 神経浸潤 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌を代表とする難治性固形腫瘍は、早期から浸潤、転移を生じ、発見時に既に治癒切除が困難であることが多い。膵癌において唯一の根治療法である外科的切除が可能な時期に適切に診断・手術を行うことが、予後改善のために必要であるが、膵癌の早期発見は非常に困難であるため、外科的切除が施行できる割合は全体の 15~20%に過ぎない。また肉眼的治癒切除と判定されてもその約半数が、主に後腹膜剥離面の癌浸潤陽性のため、組織学的には非治癒切除となっている。さらに再発形式からみても神経浸潤を主体とした後腹膜再発が高率にみられることも膵癌の大きな特徴であり、この原因のひとつである神経浸潤の制御は今後の大きな課題の一つである。

オートファジーは細胞成分をリサイクルする代謝機構で、細胞機能維持のために活発にコントロールされている。膵癌標本における膵癌細胞のオートファジー活性化は予後不良と相関すると報告され、膵癌細胞株のオートファジーは肺癌や乳癌の細胞株と比較して著明にオートファジーが活性化している (Fujii, Cancer science, 2008)。また、オートファジーの抑制によって膵癌細胞の増殖が抑制されることが報告されている。(Yang, Genes&development,2011)。さらにマウス同所移植モデルにおいて抗癌剤のジェムシタピンにオートファジー抑制剤であるクロロキンを併用することで癌増殖抑制効果が増強するため (Hashimoto, Euro J of cancer, 2014) 膵癌におけるオートファジーの役割の重要性が注目されている。生涯分裂を続ける多くの体細胞と異なり、神経細胞は三歳以降ほとんど分裂しない。そのため異常蛋白質分解の必要性も高く、神経細胞のオートファジーは亢進していることが知られている。アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病などの神経変性疾患は、神経細胞内の異常たんぱく質蓄積を共通の特徴とし、これはオートファジーによる異常たんぱく質の分解機構に問題があるとされる。



膵癌の神経浸潤(H.E.染色)

癌治療においてはオートファジー抑制剤による臨床試験が国内外で進行中であるが、これが神経細胞に与える影響は不詳である。また膵癌の特徴のひとつに神経浸潤が挙げられ、膵癌細胞の神経浸潤の過程において、隣接する神経細胞のオートファジーが影響している可能性に着目し、今回、膵癌の神経浸潤における神経細胞のオートファジーの役割を明らかにすることを目的とした本テーマの着想に至った。

2. 研究の目的

膵癌組織中に存在する膵癌細胞・間質細胞、さらに神経浸潤における神経細胞のオートファジーの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

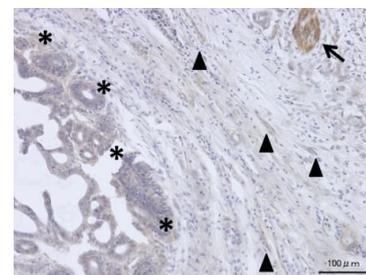
膵癌切除標本を用いて、LC3の免疫染色を行いオートファジー活性の評価を行う。

また、膵癌神経細胞のオートファジー活性評価に先立ち、膵癌細胞及び間質中の膵星細胞におけるオートファジー活性の評価を行う。具体的には、薬剤投与や遺伝子ノックダウンの手法を用いてオートファジー誘導及び抑制を確認する。その際の細胞内でのオートファジー活性の評価には LC3・p62 の蛍光免疫染色や蛋白発現を用いる。

4. 研究成果

(1) 膵癌切除標本の LC3 による免疫化学染色

まず、当科で手術を行った膵癌切除切片を用いて、オートファジーのマーカーとして microtubule associated protein light chain 3(LC3)による免疫化学組織染色を行った。Fujiiらの報告と同様に癌細胞での LC3 陽性を認めると共に、間質細胞の一部も LC3 陽性であった。この免疫化学組織染色の internal positive control には一般的に使用される神経細胞を用いた。この結果は、膵癌組織内においても神経細胞のオートファジーが活発に行われていることを示唆するものである。(右図)

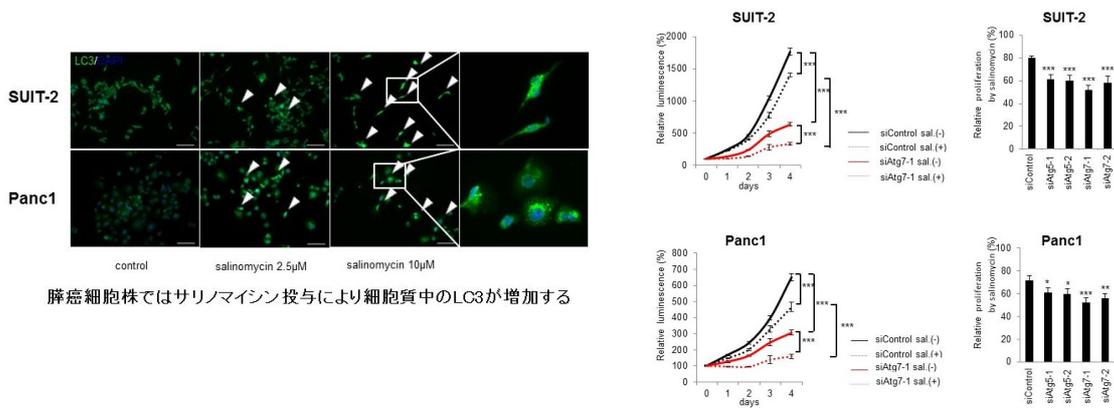


膵癌切除標本のLC3による免疫化学組織染色
(*:膵癌細胞, 矢頭:膵星細胞, 矢印:神経細胞)

(2) 膵癌細胞におけるオートファジー誘導、及びその意義についての検討

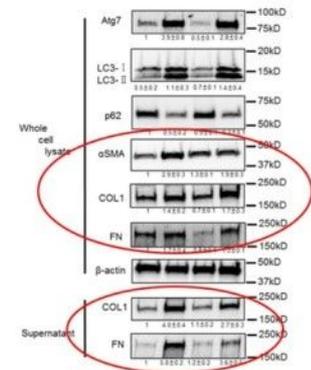
オートファジーには細胞傷害作用、細胞保護作用の相反する作用が報告されているが、癌種により報告が異なる。家畜に対する抗生物質として使用されるサリノマイシンは、膵癌を含む様々な癌種において細胞増殖抑制効果を示すが、このとき、細胞内ではオートファジーが誘導されていることが知られている。今回、この薬剤を膵癌細胞に投与したところ、膵癌細胞株の細胞質中 LC3 の増加、cyto-ID の蛍光強度の上昇を認め、サリノマイシンによって膵癌細胞株のオートファジーが亢進することが示唆された。(下左図)さらに、siRNA を用いてオートフ

オートファジーを抑制した膵癌細胞株を作成した。この細胞株にサリノマイシンを投与したところ膵癌細胞の増殖抑制効果はさらに増強され、膵癌細胞株のサリノマイシン感受性が亢進していることも同定した。(下右図)これは、膵癌細胞におけるオートファジーが、細胞保護的に働いていることを示唆するものである。以上の内容はすでに論文投稿済みである。

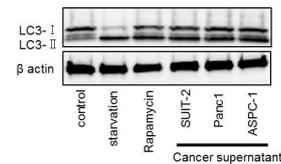


(3) 膵癌間質細胞におけるオートファジー活性の評価と活性誘導因子の検討

膵癌間質中の膵星細胞は癌間質相互作用により膵癌細胞の悪性形質に促進的に働くことが知られている。膵星細胞において、オートファジー阻害剤であるクロロキンを添加したところ、活性化膵星細胞のマーカーである SMA の発現低下、及び上清中の細胞外基質の発現低下を認め、オートファジー阻害によって膵星細胞の活性化が抑制されることを示した。また、膵星細胞におけるオートファジー活性化の機序を検討するため、オートファジーを誘導することで知られる飢餓条件培養やラパマイシン処理だけでなく、膵癌細胞株の上清添加でも正常膵星細胞の LC3- の発現は上昇し、オートファジーの誘導が示唆された。(右図)以上の結果はすでに論文として報告済みである。



オートファジー阻害PSCではαSMA、細胞外基質の発現低下を認める



正常膵星細胞への癌上清添加によるオートファジー亢進 (Gastroenterology 2017, Endo et al.より一部改変。)

このように、膵癌細胞や膵星細胞においてはその活性状態とオートファジーの関連性は解明されつつあり、積極的に学会・論文発表を行ってきた。一方で、膵癌に隣接する神経細胞と癌細胞の癌間質作用における詳細な研究は行えていない。今後も、膵星細胞のオートファジー誘導の手法やその結果を応用して引き続き神経細胞でのオートファジーについてさらに検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Yan Z, Ohuchida K, Zheng B, Okumura T, Takesue S, Nakayama H, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, CD110 promotes pancreatic cancer progression and its expression is correlated with poor prognosis, *J Cancer Res Clin Oncol*, 145(5):1147-1164, 2019, 査読有、DOI: 10.1007/s00432-019-02860-z

Okumura T, Ohuchida K, Kibe S, Iwamoto C, Ando Y, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Koikawa K, Sada M, Horioka K, Mochidome N, Arita M, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Adipose tissue-derived stromal cells are sources of cancer-associated fibroblasts and enhance tumor progression by dense collagen matrix, *Int J Cancer*, 144(6),1401-1413,2018, 査読有、DOI: 10.1002/ijc.31775

Koikawa K, Ohuchida K, Takesue S, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Endo S, Abe T, Okumura T, Horioka H, Sada M, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohuchida R, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Pancreatic stellate cells reorganize matrix components and lead pancreatic cancer invasion via the function of Endo180, *Cancer letters*,1(412), 143-15,2018, 査読有、DOI:10.1016/j.canlet.2017.10.0104

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*, 17(6):990-996, 2017, 査読有,
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*, 152(6),1492-1506, 2017, 査読有, DOI: 10.1053/j.gastro.2017.01.010

遠藤翔、仲田興平、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史、アミノ酸代謝 膵癌進展におけるオートファジーの重要性、*肝胆臓*, 75(1),71-77, 2017年, 査読無

〔学会発表〕(計 4 件)

相良亜希子、仲田興平、遠藤翔、米永晃子、安藤陽平、岐部晋、中山宏道、武居晋、進藤幸治、森山大樹、宮坂義浩、大内田研宙、大塚隆生、水元一博、中村雅史、オートファジー抑制は、サリノマイシンによる膵癌細胞増殖抑制効果を増強する、第49回日本膵臓学会大会、2018年

Kibe S, Ohuchida K, Ando Y, Takesue S, Nakayama M, Abe T, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Nagai S, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto T, Nakamura M, The role of cancer-associated acinar atrophy via ADM-like lesion in the invasive front of pancreatic cancer, Digestive Disease Week 2018,2018年

Nakata K, Endo S, Ohuchida K, Mori Y, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nakamura M, Autophagy is Related with Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated with Pancreatic Cancer Progression, The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association, 2017年

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年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮坂 義浩

ローマ字氏名：(MIYASAKA, yoshihiro)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：40507795

研究分担者氏名：大内田 研宙

ローマ字氏名：(OHUCHIDA, kenoki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：20452708
（2018年度）

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。