

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06942

研究課題名（和文）オートファジーによる膵星細胞活性化メカニズムの解明と新規治療開発

研究課題名（英文）New strategy for pancreatic cancer treatment by regulating pancreatic stellate cell activation through autophagy

研究代表者

遠藤 翔（ENDO, Sho）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20801749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌間質内の膵星細胞は癌間質相互作用によって活性化し、膵癌細胞の増殖と浸潤を促進する。本研究では、当科での膵癌手術検体から、膵癌由来の膵星細胞と非膵癌病変由来の膵星細胞を樹立し、これらのオートファジー活性の差異を確認した。また、これらの膵星細胞における mRNA の発現を網羅的に解析し、オートファジー関連遺伝子となりうるいくつかの候補遺伝子を選定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は発見時に既に治癒切除が困難であることが多く、さらに放射線照射や化学療法に抵抗性であるという特徴をもつ。このため、膵癌患者の5年生存率はここ30年でほとんど改善なく、治療法の開発は社会的緊急性・重要性が高い。膵星細胞は癌間質中で活性化し、その活性化が膵癌の増殖・転移を促進することは明らかであるが、活性化を誘導する詳細な機序は未だ解明されておらず、この機序の解明は膵癌に対する新たな治療開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic stellate cells (PSCs) change from a quiescent to activated state in the tumor microenvironment and secrete extracellular matrix (ECM) molecules and cytokines to increase the aggressiveness of tumors. However, it is not clear how PSCs are activated in cancer stroma. We previously reported that autophagy played an important role for the activation of PSCs and its inhibition led to reduce tumor progression and metastasis. In this study, we established pancreatic stellate cells derived from pancreatic cancer and non-pancreatic cancer lesions, and confirmed the difference between these autophagy activities. In addition, we comprehensively analyzed mRNA expression in these pancreatic stellate cells and selected several candidate genes that could be autophagy related genes. These results might be a new strategy for pancreatic cancer treatment.

研究分野：医歯薬学

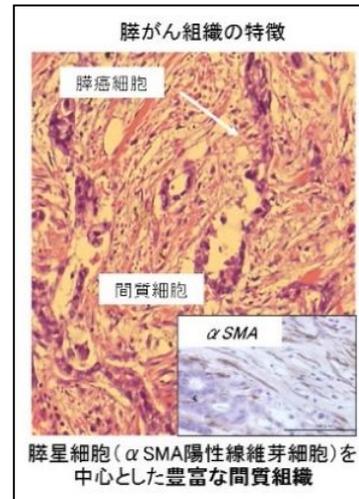
キーワード：膵癌 オートファジー 癌間質相互作用

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

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は欧米や日本でもここ 30 年以上ほとんど生存率の改善が見られない、取り残された癌腫であり、膵臓癌への新たな治療法および診断法の開発は、社会的要請度・貢献度・緊急性が高い。

これまで腫瘍細胞自体に関する研究が進められてきたが、いまだに画期的治療法の確立には至っていない。膵臓癌の組織は、豊富な間質増生(desmoplasia)を特徴とし(右図)、癌細胞と間質細胞の相互作用が癌の浸潤能・転移能・治療抵抗性に影響を及ぼしている。間質細胞の中で線維化に特に関わる細胞として膵星細胞(Pancreatic Stellate Cells; PSCs)の存在が報告された(Gastroenterology, 1998, Bachem)。この膵星細胞は膵癌組織中の desmoplasia 中にも同定され、腫瘍細胞の刺激により活性化された膵星細胞(activated PSCs)が間質増生を促すことが報告された(Gastroenterology, 2005, Bachem)。腫瘍細胞と膵星細胞との相互作用が膵癌の悪性度を高める主因として注目されており、膵星細胞を新たな治療標的とする新規治療戦略の確立が期待されている。



当研究室ではこれまで解明されていなかった膵星細胞の活性化について、オートファジーが関与していることを以前に報告した。しかしオートファジーが膵星細胞の活性化を誘導する詳細な機序は未だに解明されておらず、この機序の解明は膵癌に対する新たな治療開発につながると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、膵癌間質に存在する膵星細胞におけるオートファジーの役割を明らかにし、オートファジーによる膵星細胞活性化に関与する詳細なメカニズム、因子の同定、さらには膵星細胞活性化阻害を介した膵癌新規治療法を開発することを目的とする。

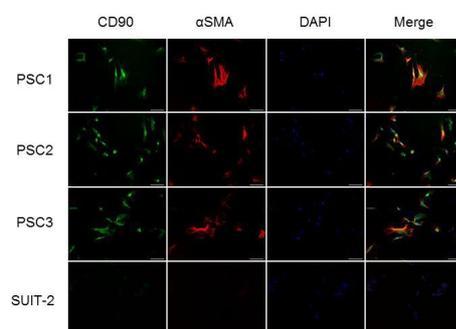
## 3. 研究の方法

膵癌切除標本に加え、下部胆管癌や十二指腸乳頭部癌などの非膵癌疾患からの膵切除標本からも膵星細胞の樹立を行う。樹立した膵星細胞の活性化やオートファジー活性の差異を確認し、mRNA の発現を網羅的に解析する。さらに、正常膵星細胞に癌上清を加えてオートファジー亢進と膵星細胞活性化を確認し、これらの条件の差異による mRNA の発現を網羅的に解析し、オートファジー関連候補遺伝子を探索する。

## 4. 研究成果

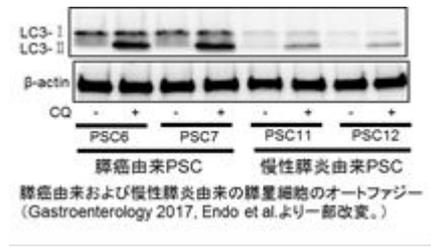
(1) 膵癌由来および非膵癌由来の膵星細胞のオートファジーの評価

我々はヒト膵癌手術検体から複数の膵星細胞を樹立した。手法は Bachem や Apte らにより報告された方法によりヒト膵星細胞を 50 株以上作成した(Gastroenterology 1998, Bachem et al., Gut 1998, Apte et al.)これらは膵星細胞の特徴とされる Myofibroblast 様の形態を呈し、 $\alpha$ -SMA 陽

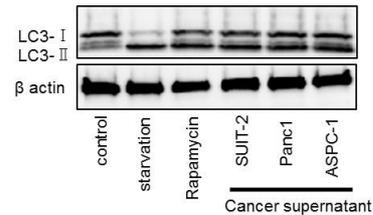


樹立した膵星細胞の免疫蛍光染色  
(Gastroenterology 2017, Endo et al.より引用)

性, Vimentin 陽性, CD90 陽性, GFAP 陽性, nestin 陽性, CK19 陰性であることを確認した。さらに慢性膵炎などの炎症性疾患や十二指腸癌などの膵疾患以外の患者由来の膵切除標本からも膵星細胞を樹立した。膵癌以外由来の膵星細胞と比較して、膵癌由来の膵星細胞はオートファジー活性が高いことを確認した。(右上図) またさらに、正常膵星細胞に癌上清を加えてオートファジー亢進と膵星細胞活性化を確認した。



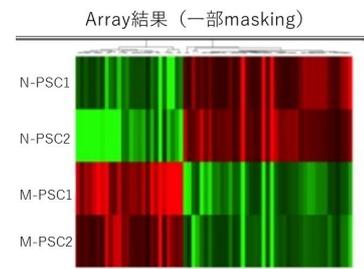
以上より正常や非癌組織と比較して膵癌間質中の膵星細胞ではオートファジーが亢進していることが示唆された。(右図)



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。)

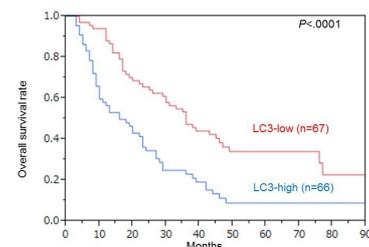
## (2) オートファジーが膵星細胞を活性化させる経路・因子の同定

膵癌由来の膵星細胞と非膵癌病変由来の膵星細胞とのオートファジー活性の差異を確認した後、これらの膵星細胞における mRNA の発現を網羅的に解析した。(右図) 今後は、この結果から得られたオートファジー関連遺伝子となりうる候補遺伝子を siRNA の手法でノックダウンし、活性化膵星細胞のマーカーである SMA の発現の低下や、細胞外基質である Fibronectin や collagen の産生低下等がみられるか検討する。



## (3) 膵星細胞活性化の阻害を介した膵癌の新規治療法の開発

ヒト膵癌組織においては、膵星細胞のオートファジーは全生存期間の短縮と関連していた。(右図)



PSCにおけるオートファジー活性が高い患者の予後は不良である。(Gastroenterology 2017, Endo et al.より引用。)

また、In vitro において、オートファジー抑制剤であるクロロキン投与によって活性化膵星細胞は静止化へと変化し、増殖・浸潤能の低下を認めた。この結果をもとに、化合物ライブラリーを用いて膵星細胞の不活性化に導く化合物の探索を行ったところ、得られた化合物に関して

はオートファジーマーカーである LC3 の低下、p62 の上昇を認めており、オートファジー阻害剤となりうる可能性が示唆された。今後は in vivo での治療効果を評価し、結果を踏まえて論文化する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 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

〔学会発表〕(計 3 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

Koikawa K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Takesue S, Endo S, Abe T, Okumura T, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Pancreas* 2018, 2018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：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(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。