

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10683

研究課題名（和文）APC結合タンパクEB1による膵癌の放射線抵抗性の画期的診断とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of radioresistance in pancreatic cancer by EB1 expression and its molecular mechanism

研究代表者

折茂 達也 (Orimo, Tatsuya)

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：80711861

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではEB1と膵癌放射線抵抗性との関連を検討することを目的とした。術前に化学放射線療法を行った膵癌切除症例17例を対象にEB1の免疫染色を施行した。EB1陰性は10例、EB1陽性は7例であった。EB1と放射線効果判定（Grade1,2a,2b,3）との関連を検討したが、EB1と放射線効果の間には相関関係は見られなかった（ $R=-0.0236, p=0.928$ ）。EB1と予後との関連も同様に解析したが、生存、再発ともにEB1の発現の有無では有意差を認めなかった（ $p=0.811, p=0.575$ ）。EB1の機能解析を行うため、膵癌細胞株のK0株に対しての再発現、WTに対しての強制発現を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EB1は肝細胞癌において生物学的悪性度と関連しその過剰発現が肺癌の放射線抵抗性に関わるとの報告があり、本研究ではEB1と膵癌放射線抵抗性との関連を検討した。本研究の結果ではEB1と放射線効果の間には相関関係は見られず、またその発現と予後との関連も見られなかった。この結果の考察として、癌腫が異なることによるEB1の発現に違いがある可能性があること、またEB1の発現検出は既に放射線照射されている検体で行ったため、放射線照射の修飾がEB1発現に影響を及ぼした可能性が考えられた。しかし本研究で確立したEB1関連の膵癌細胞株が、EB1と膵癌の関連について今後新たな知見を生み出す可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the association between EB1 and radioresistance of pancreatic cancer. Immunostaining for EB1 was performed in 17 patients with resected pancreatic cancer who had undergone preoperative chemoradiotherapy; 10 patients were EB1 negative and 7 patients were EB1 positive. The association between EB1 and radiation efficacy determination was examined, but no correlation was found between EB1 and radiation efficacy ($R=-0.0236, p=0.928$). The association between EB1 and prognosis was analyzed, but no significant difference was found between EB1 expression and both survival and recurrence ($p=0.811, p=0.575$). To analyze the function of EB1, we established re-expression against K0 pancreatic cancer cell lines and forced expression against WT.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：EB1

1. 研究開始当初の背景

膵癌はあらゆる癌のなかで最難治癌であり、5年生存率はわずか6%に過ぎない。多くの治療が試みられているが、今なお外科的切除のみが唯一治癒の可能性がある治療法である。しかし膵癌は多くの場合進行した状態で診断され、外科的切除の適応となるのは膵癌症例のうちわずか10~20%である。さらに膵癌は外科切除のみで治癒が得られることは極めてまれであり、さらなる治療法の開発が予後向上には必須である。近年局所進行膵癌の集学的治療の一環として術前化学放射線療法 (Neoadjuvant chemoradiotherapy ; NACRT) が注目されており、治癒切除率の向上や転移リンパ節の減少、局所再発率の低下の効果が報告されている (Satoi S, et al. J Gastrointest Surg 2012、Arvold ND, et al. Cancer 2012)。しかし NACRT の効果は症例によって異なり、効果予測のためのバイオマーカーやその分子学的背景についてはほとんど解明されていない。

EB1 は 1995 年に大腸癌において腫瘍制御タンパクである APC と結合するタンパク質として見出された。EB1 は微小管に結合することで細胞骨格制御に関わることは広く知られていたが、ヒトの癌との関連については我々が肝細胞癌との関連を示すまでほとんど知られていなかった。我々は肝細胞癌の臨床検体を用いたプロテオミクス解析において非癌部と比較して癌部で高発現していることを発見し、さらに免疫組織化学染色を行い染色強度から独立した予後再発因子となることを示した。(Hepatology 2008)。その後肝細胞癌以外にも、EB1 と癌との関連については生物学的悪性度以外に EB1 の過剰発現が肺癌の放射線抵抗性に関わるとの報告がなされた (Cancer Lett 2013)。肺癌においては、EB1 はアポトーシス制御に関わり、EB1 の過剰発現が放射線照射による細胞死を抑制するという機序が提唱されている。反対に EB1 発現を抑制すると活性酸素種 (ROS) の産生が促され放射線照射による細胞死が促進するとの報告がなされている。我々は膵癌細胞株のプロテオミクス解析で、高悪性度膵癌細胞株に EB1 が高発現していることを確認しており (Journal of Proteomics & Bioinformatics 2009)、上記の肺癌での EB1 の作用機序と膵癌細胞株での EB1 過剰発現の結果から、膵癌の分子背景ならびに放射線抵抗性の分子背景にも EB1 が関与する可能性があるとの仮説を立案した。

2. 研究の目的

最難治癌である膵癌の唯一治癒の可能性がある治療法は今なお手術療法のみであるが、さらなる成績改善のためにはプラスアルファの治療法が必須である。局所進行膵癌の治療として注目されている術前化学放射線療法 (NACRT) は現在最も注目されている膵癌の集学的治療の一つであり、EB1 と治療抵抗性の関与が明らかになれば EB1 をバイオマーカーとして予後不良群の選定や EB1 を治療標的とした薬物治療の可能性が生まれる。EB1 をバイオマーカーとして用いることで抗 EB1 薬の適応群に対するスクリーニングを行うオーダーメイド治療を行うことができ、膵癌の治療戦略に革新的な変革をもたらし、臨床に直ちに還元できるものであると考えられる。よって本研究の目的は、EB1 が膵癌の放射線抵抗性を診断するバイオマーカーとしての意義とその分子機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 2005 年から 2015 年に北海道大学消化器外科 で切除した NACRT を行った膵癌症例 17 例を対象に EB1 の免疫組織化学染色をおこない、EB1 の発現量と NACRT の効果判定の関連を調べる。さらに EB1 の免疫染色での発現量と臨床病理学的因子の関連を検討し、EB1 の発現強度の予後への関連を検討する。

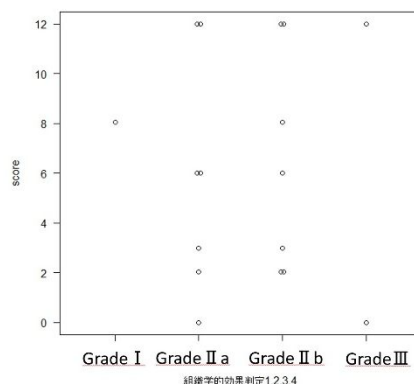
(2) 免疫染色の結果をもとに、膵癌細胞株からのタンパク質抽出を行い EB1 の発現を western blot にて確認する。膵癌細胞株での EB1 発現を確認後に、EB1 の機能解析のため、膵癌細胞株での EB1 ノックアウト株、ノックアウト株に対する再発現、野生株に対する強制発現の系を確立する。

4. 研究成果

(1) EB1 の免疫染色においては、陽性基準は EB1 の染色強度と割合を測定し、強度×割合が 6 以下を EB1 陰性、7 以上を EB1 陽性とした。その結果 EB1 陰性は 10 例、EB1 陽性は 7 例であった。EB1 と放射線効果判定 (Grade1, 2a, 2b, 3) との関連を検討したが、EB1 と放射線効果の間には相関関係は見られなかった (R=-0.0236, p=0.928) (図 1)。

(2) 次に EB1 と膵癌切除後の全生存

図 1



相関係数 = -0.0236, 95%信頼区間 -0.499-0.462, P値 = 0.928

率、無再発生存率の関連について検討した。全生存率についてはEB1の発現強度と生存率の間に統計学的に有意差を認めなかった ($p=0.811$) (図2a)。無再発生存率については、EB1の発現強度と無再発生存率の間に統計学的に有意差を認めなかった ($p=0.575$) (図2b)。

(3) 免疫染色の結果は、仮説と異なりEB1の発現と放射線抵抗性の間には関連性がなかった。EB1の陽性判定基準を各種検討したが、同様の結果であった。また膵癌の悪性度とEB1との関連性についても免疫染色では有意な結果を得られなかった。そのため

EB1と膵癌との関連性について *in vitro* で再検討をすることにした。EB1の機能解析を行うため、膵癌細胞株として *panc-1* と *miapaca-2* を選定した。EB1の発現をwestern blotにて確認

図2a

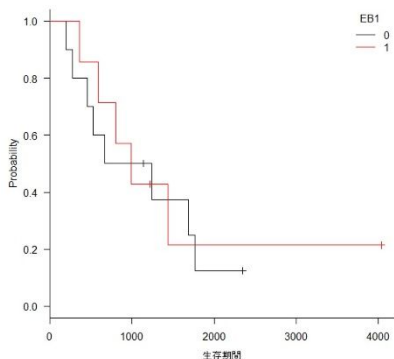


図2b

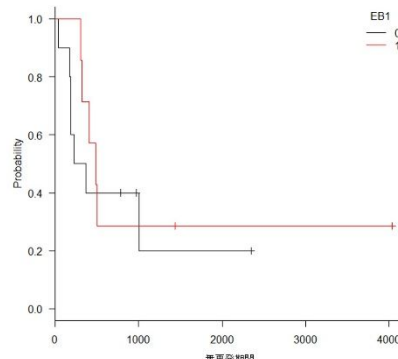


図3

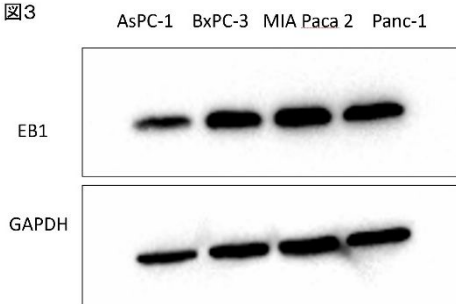
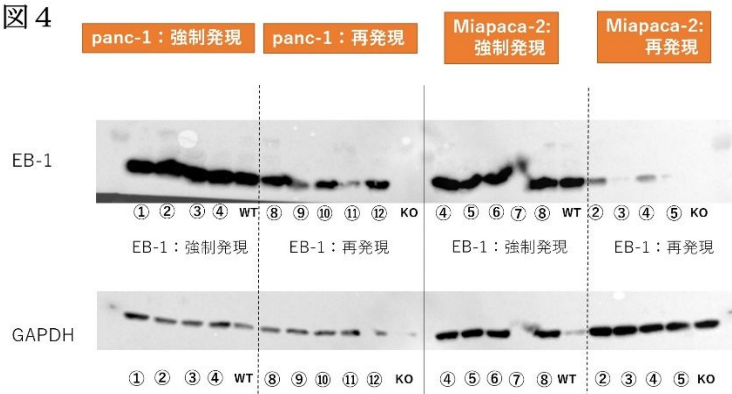
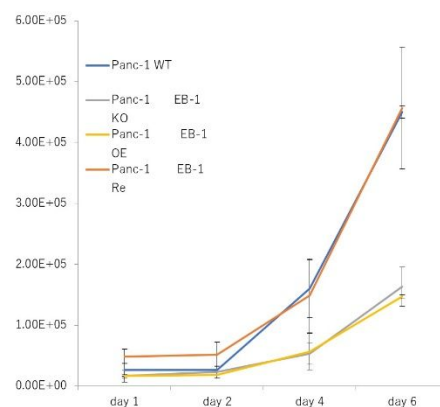


図4



したところ、*panc-1* と *miapaca-2* にEB1の発現を認めた(図3)。Panc-1についてはEB-1 KO株を確立し、Panc-1 KO株に対しての再発現、WTに対しての強制発現を確立した。Miapaca-2についてもKO株を確立し、Miapaca-2 KO株に対しての再発現は確立したが、WTに対しての強制発現は確立できなかった(図4)。Panc-1、Panc-1:EB1強制発現、Panc-1:EB1-KO、Panc-1:EB1再発現について細胞の増殖能をチェックするとKOして増殖能が落ちた細胞は再発現(re株)したらWTと同様の増殖能を示した(図5)。細胞株の樹立には長時間を要したため、放射線照射の影響については現在準備段階であり、EB1をknock down,あるいは強発現させた膵癌細胞株に放射線照射を行い、その細胞死の割合、characterの変化をみる予定である。

図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	若山 顕治 (Wakayama Kenji) (50646544)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	
研究分担者	蒲池 浩文 (Kamachi Hirofumi) (60374237)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	横尾 英樹 (Yokoo Hideki) (70399947)	旭川医科大学・医学部・准教授 (10107)	
研究分担者	神山 俊哉 (Kamiyama Toshiya) (80322816)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	

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