

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10714

研究課題名(和文) 浸潤性膵癌に対するヒアルロン酸産生代謝経路をターゲットにした個別化治療戦略

研究課題名(英文) Personalized treatment strategy for pancreatic cancer targeting hyaluronan metabolism

研究代表者

佐藤 典宏 (Sato, Norihiro)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：20423527

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)：膵癌細胞において複数のヒアルロン酸産生酵素と分解酵素の発現を検討したところ、全てのヒアルロン酸代謝遺伝子の発現が上昇しているヒアルロン酸代謝亢進フェノタイプ(HAMP: hyaluronan activated-metabolism phenotype)を同定した。膵癌患者において、HAMP陽性の症例は、HAMP陰性の症例よりも予後不良であった。HAMP陽性の膵癌細胞は、ヒアルロン酸産生・分解阻害剤の感受性が高かった。以上の所見より、膵癌ではヒアルロン酸の産生および分解が亢進しているフェノタイプが存在し、予後不良のマーカーおよび治療のターゲットとして重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の生存率は依然として改善しておらず、画期的な治療法の開発が急務である。今回、膵癌の間質に着目し、細胞外マトリックスの成分であるヒアルロン酸の代謝についての研究を行った。膵癌ではヒアルロン酸の代謝が亢進しており、低分子に分解したヒアルロン酸を利用しながら悪性度を高めている可能性が示唆された。したがって、このヒアルロン酸代謝経路をターゲットとした治療戦略は、膵癌の新たな治療法となることが期待される。国内外で同じような研究成果の報告はなく、学術的および臨床的にも重要な発見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated transcriptional profiling of genes involved in HA synthesis (including HAS2 and HAS3) and degradation (including HYAL1 and KIAA1199) in a panel of PDAC cell lines and primary tissues. A subset of PDAC (20% of cell lines and 25% of tissues) showed overexpression of multiple genes encoding both HA-synthesizing and HA-degrading enzymes, displaying a phenotype defined as an HA activated-metabolism phenotype (HAMP). Interestingly, HAMP+ cells were more susceptible to the treatment with an HA synthesis inhibitor and HA degradation inhibitor than HAMP- cells. Patients with HAMP+ tumors were significantly associated with shorter survival than those with HAMP- tumors (P = 0.049). The present study identified a novel phenotype, HAMP, characterized by activation of HA metabolism pathways, in PDAC. HAMP should be further investigated as a prognostic marker as well as a target for personalized medicine.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 ヒアルロン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

(1) 国内外における研究動向および位置づけ

膵癌は消化器癌の中でも最も予後不良な癌であり、本邦における死亡者数は増加の一途をたどっている。近年、癌間質に豊富に存在するヒアルロン酸が、癌の増殖、浸潤、転移や薬剤耐性に直接寄与していることが明らかとなってきた。一方で、膵癌におけるヒアルロン酸の発現、調節メカニズム、機能的役割、および治療標的としての意義についてはほとんど解明されていない。

(2) これまでの研究成果

これまでに膵癌におけるヒアルロン酸の臨床・生物学的意義についての研究を進め、以下の知見を報告してきた。

免疫組織化学染色による検討により、ヒアルロン酸は膵癌の約 80% で高発現しており、発現が強い患者群では有意に予後不良であった。

膵癌細胞はヒアルロン酸産生酵素 HAS2 を過剰発現しており、培養上清中に直接ヒアルロン酸を産生・分泌する。

膵癌におけるヒアルロン酸分解酵素(ヒアルロニダーゼ)の発現を検討し、主に HYAL1 が高発現していることを見いだした(文献 3)。

ヒアルロン酸の特異的レセプター RHAMM の発現が膵癌で亢進していた。

ヒアルロン酸を膵癌細胞に直接加えたところ、(特に低分子ヒアルロン酸は)細胞の遊走能を増加させた。

以上の所見より、膵癌ではヒアルロン酸の産生、分解、およびレセプターへの結合によるシグナル伝達が亢進しており、この一連のプロセスは膵癌の進展に重要な役割を果たしていることが考えられた。

そこで、我々はこの一連の活性化されたヒアルロン酸代謝を 3 つの異なるプロセスで阻害する新たな治療モデルの着想に至った。つまり、ヒアルロン酸の産生阻害、分解阻害、およびレセプター結合からのシグナル伝達阻害の 3 つのアプローチ法である。これらの選択的ヒアルロン酸代謝阻害を行うことによって、膵癌の進展(増殖、浸潤、転移)を阻止できないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌におけるヒアルロン酸の産生、分解、およびレセプター結合(シグナル伝達)の 3 つのプロセスをつかさどる分子の発現プロファイリングを作成し、それぞれの活性化されたプロセスを阻害する治療アプローチの有効性を確立することである。

(1) 膵癌(細胞株と切除標本)におけるヒアルロン酸関連遺伝子の発現プロファイリングを作成し、ヒアルロン酸産生酵素亢進、分解亢進、シグナル伝達亢進の 3 種類のフェノタイプで分類する。また、この分類と予後を含めた臨床病理学的因子との関連を調べる。

(2) 膵癌細胞に対し、ヒアルロン酸産生代謝経路を 3 つの異なるプロセス(産生、分解、シグナル伝達)で阻害し、それぞれの治療が膵癌の遊走、浸潤、増殖におよぼす影響を調べる。

(3) ヒアルロン酸発現プロファイリングと上記の 3 つの阻害治療の感受性についての関係を明らかにする。その上で、発現が亢進している経路を選択的に阻害する治療(いわゆる個別化治療)の有効性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞株におけるヒアルロン酸代謝経路(産生、分解、シグナル伝達)の遺伝子発現プロファイリング作成

膵癌細胞株 10 株(AsPC1, BxPC3, CFPAC1, Capan1, Capan2, MiaPaCa2, NOR-P1, Panc1, SW1990, SUI2)を用い、ヒアルロン酸代謝に関わる以下の遺伝子(mRNA)・蛋白の発現を定量的リアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロットで確認する。

- ・ヒアルロン酸産生: HAS1, HAS2, HAS3
- ・ヒアルロン酸分解: HYAL1, HYAL2, HYAL3
- ・ヒアルロン酸シグナル伝達経路: CD44, RHAMM

以上の遺伝子(蛋白)発現強度を定量化し、クラスター図を用いてプロファイリングを作成し、ヒアルロン酸産生亢進、分解亢進、およびシグナル亢進フェノタイプに分類する。

(2) 膵癌組織におけるヒアルロン酸代謝経路の遺伝子発現プロファイリング作成

同様の遺伝子(蛋白)発現解析およびクラスター分類を膵癌患者の切除標本(N=50)から採取したサンプルについても行い、実際の膵癌組織におけるヒアルロン酸産生亢進、分解亢進、シグナル亢進フェノタイプの割合を調べる。

また、これらのフェノタイプと臨床病理学的因子および患者の術後生存期間(予後)との関係(例えば、どのフェノタイプが最も予後不良か等)を明らかにする。

(3) ヒアルロン酸代謝プロセスの段階的阻害実験

膵癌細胞株 10 株を用い、以下の 3 つのグループにおける薬剤(または遺伝子ノックダウン)の細胞遊走能、浸潤能、および増殖能に対する治療効果を評価する。

ヒアルロン酸産生阻害: ヒアルロン酸産生阻害剤 4-methylumbelliferone(4-MU)、HAS2、HAS3 を small interfering RNA (siRNA) を用いてノックアウト

ヒアルロン酸分解阻害: ヒアルロン酸分解酵素(ヒアルロニダーゼ)阻害剤である硫酸デキストラン、および新たに発見された海洋微生物由来のヒアルロニダーゼ阻害剤(ヒアルロマイシン: 富山県立大学(微生物工学講座)五十嵐康弘先生より供与)

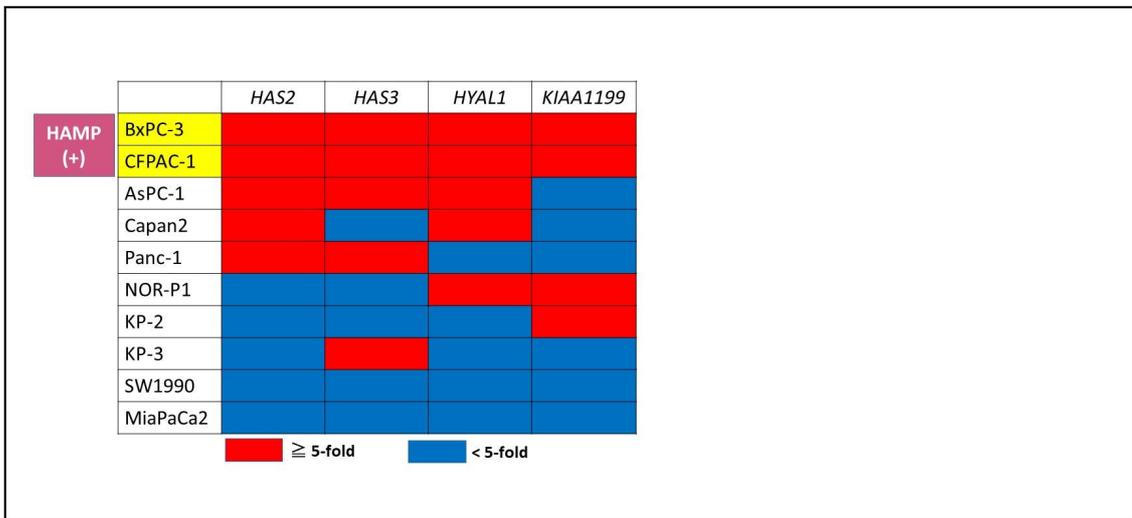
ヒアルロン酸シグナル伝達阻害: CD44 の中和抗体、RHAMM の siRNA ノックアウト

(4) 発現プロファイリングと治療感受性との関連性の証明、および各プロセスに対する選択的阻害(個別化治療)の有効性検証

発現プロファイリングに基づいて分類したフェノタイプと、産生阻害、分解阻害、シグナル阻害治療の感受性との関係を調べる。フェノタイプと治療感受性の間に関連が見られた場合、それぞれの亢進したプロセスを単独で(あるいは複数の場合は併用にて)阻害する個別化治療の有効性を検証する。

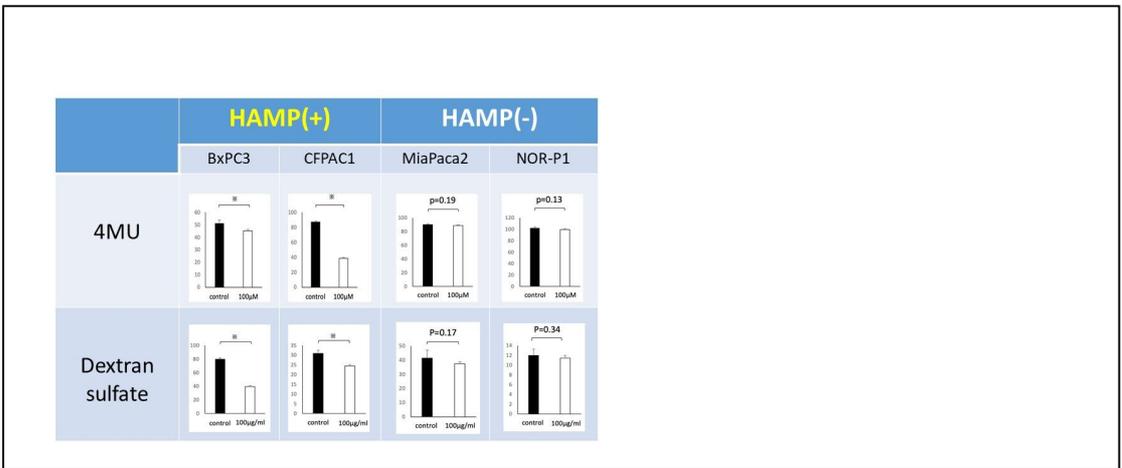
4. 研究成果

(1) 10 種の膵癌細胞において、代表的なヒアルロン酸産生酵素(HAS2, HAS3)とヒアルロン酸分解酵素(HYAL1, KIAA1199)の発現を検討したところ、これら全てのヒアルロン酸代謝遺伝子の発現が上昇している膵癌細胞株が同定され、ヒアルロン酸代謝亢進フェノタイプ(HAMP: hyaluronan activated-metabolism phenotype)と名付けた。

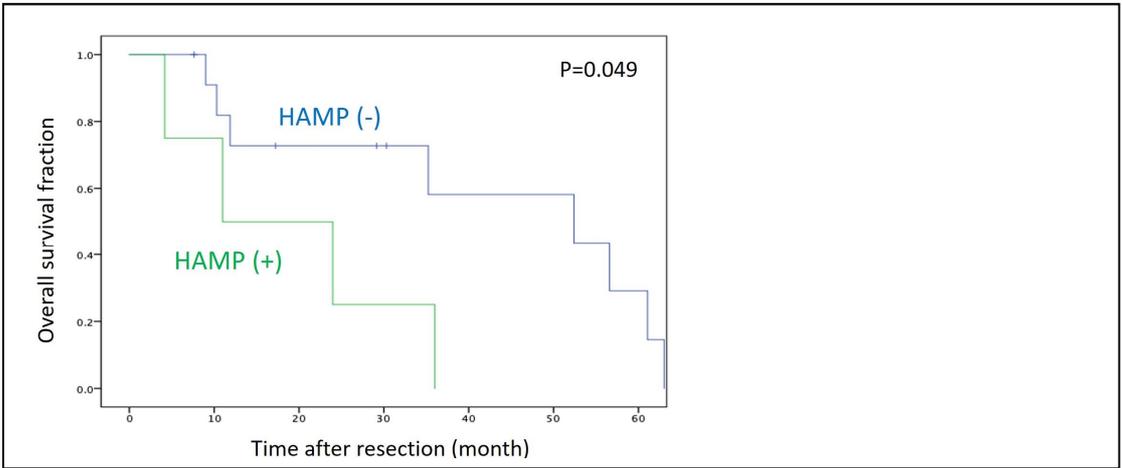


(2) HAMP 陽性の膵癌細胞株は、ヒアルロン酸産生阻害剤(4-メチルウンベリフェロン: 4MU)およびヒアルロン酸分解酵素阻害剤(硫酸デキストラン: dextran sulfate)に対する感受性が高い

く、一方、HAMP 陰性の膵癌細胞株は感受性が低かった。



(3) 膵癌組織におけるヒアルロン酸代謝関連遺伝子の発現プロファイリングを行ったところ、セルラインと同様に HAMP 陽性の症例があることが示された。予後との相関を調べたところ、HAMP 陽性の症例は、HAMP 陰性の症例よりも予後不良であった。



以上の所見より、膵癌ではヒアルロン酸の産生および分解が亢進しているフェノタイプが存在し、予後不良のマーカ―および治療のターゲットとして重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Cheng Xiao Bo, Sato Norihiro, Kohi Shiro, Koga Atsuhiko, Hirata Keiji	4. 巻 15
2. 論文標題 4-Methylumbelliferone inhibits enhanced hyaluronan synthesis and cell migration in pancreatic cancer cells in response to tumor-stromal interactions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 6297-6301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.8147	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 Kohi S, Sato N, Koga A, Matayoshi N, Hirata K	4. 巻 8
2. 論文標題 KIAA1199 is induced by inflammation and enhances malignant phenotype in pancreatic cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 17156-17163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632	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 佐藤 典宏, 厚井 志郎, 天池 孝夫, 工藤 遊山, 古賀 敦大, 又吉 信貴, 平田 敬治	4. 巻 75
2. 論文標題 【膵癌研究Cutting Edge-from Carcinogenesis to Metastatic Colonization-】Hyaluronan(ヒアルロン酸)を中心としたMicroenvironmentからみた膵癌進展機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 821-829
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 無
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 Yuzan, Kohi Shiro, Hirata Keiji, Goggins Michael, Sato Norihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Hyaluronan activated-metabolism phenotype (HAMP) in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 5592 ~ 5604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27172	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤典宏, 厚井志郎, 古賀敦大, 工藤遊山, 天池孝夫, 又吉信貴, 平田敬治
2. 発表標題 浸潤性膵癌におけるヒアルロン酸レセプターRHAMM の発現および機能解析
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤典宏, 厚井志郎, 古賀敦大, 又吉信貴, 天池孝夫, 工藤遊山, 平田敬治
2. 発表標題 膵癌悪性化における低分子ヒアルロン酸の役割と分解酵素をターゲットにした新規治療
3. 学会等名 第49回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤典宏, 厚井志郎, 古賀敦大, 工藤遊山, 安達保尋, 天池孝夫, 又吉信貴, 平田敬治
2. 発表標題 膵癌におけるヒアルロン酸代謝亢進フェノタイプの同定と治療ターゲットとしての可能性
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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	平田 敬治 (Hirata Keiji) (70269059)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	