

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：17K10715

研究課題名(和文) 膵癌のアグレッシブな進展様式におけるヒアルロン酸分解酵素KIAA1199の役割

研究課題名(英文) Role of KIAA1199, a novel hyaluronidase, in the aggressive progression of pancreatic ductal adenocarcinoma

研究代表者

平田 敬治 (Keiji, Hirata)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：70269059

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)：我々は、膵癌において新規ヒアルロン酸分解酵素のKIAA1199の発現が上昇しており、予後不良と相関していることを見いだした(Koga et al, Pancreatology 2017)。さらに、膵癌細胞においてKIAA1199は炎症によって誘導され、膵癌細胞の増殖、遊走、浸潤能を高めていることを発見した(Kohi et al, Oncotarget 2017)。さらに、KIAA1199の発現は、他のヒアルロン酸分解酵素TMEM2 (transmembrane 2) と相互に調節されている可能性が示唆された (manuscript in submission)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は5年生存率が依然とし10%以下であり、消化器癌のなかでも最も予後不良な難治癌である。膵癌に対する画期的な治療法の開発が急務である。今回、我々は膵癌におけるヒアルロン酸分解酵素の役割に注目し、KIAA1199が膵癌の悪性化に重要な役割をはたしていることを発見した。KIAA1199は、膵癌における予後因子として役に立つだけでなく、治療のターゲットとしても有用である。KIAA1199あるいはヒアルロン酸分解酵素を阻害することで、膵癌の悪性進展を抑制できる可能性がある。本研究は、膵癌の治療へつなげる非常に社会的意義がある研究である。

研究成果の概要(英文)：We have shown that KIAA1199 expression is increased in pancreatic ductal adenocarcinoma and its expression correlates with poor prognosis (Koga et al, Pancreatology 2017). The expression of KIAA1199 in pancreatic cancer cells is induced by inflammation and enhances proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer cells (Kohi et al., Oncotarget 2017). Furthermore, KIAA1199 expression could be regulated through interaction with another hyaluronidase TMEM2 (transmembrane 2) in pancreatic cancer cells (manuscript in submission).

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

(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、癌の進展に重要な役割を果たしており、特に分解産物である低分子ヒアルロン酸が、膵癌の浸潤・転移を促進することを明らかとした。最近、KIAA1199 (CEMIP または HYBID) が新たなヒアルロン酸の分解酵素として同定され、癌との関係が示唆されている。一方、KIAA1199 の膵癌における発現や機能的役割に関する研究報告は見当たらない。

(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では、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: HYAL1-3) の発現を検討し、一部の膵癌では HYAL1 が高発現していることを見いだした。

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 (~ 50 kDa) によって) 細胞の遊走能が増加した。

以上の所見より、膵癌ではヒアルロン酸代謝が亢進しており、特に分解された低分子ヒアルロン酸のレセプターへの結合によるシグナル伝達によって、癌の血管新生、細胞遊走、浸潤、増殖、および薬剤耐性を促進していることが考えられた。

最近、KIAA1199 (CEMIP または HYBID) が、HYAL (ヒアルロン酸分解酵素) とは独立したヒアルロン酸の強力な分解酵素であることが報告された (Yoshida et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2013)。KIAA1199 はもともと難聴との関連で報告された遺伝子であるが、大腸癌をはじめとするいくつかの癌での過剰発現が確認されている。

我々は、ヒアルロン酸分解酵素 (HYAL) の発現が上昇していない膵癌が少なからず存在することを認識しており、他のヒアルロン酸分解メカニズムが存在する可能性を考えていた。そこで、KIAA1199 が膵癌におけるヒアルロン酸分解および浸潤・転移を促進しているのではないかと仮説を立てた。つまり、膵癌 (または間質細胞) から過剰に産生されたヒアルロン酸は KIAA1199 で低分子ヒアルロン酸へと分解され、レセプターへの結合を介してシグナル伝達が活性化されるといふモデルの着想へと至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌における KIAA1199 の発現パターンと予後を含めた臨床病理学的因子との関連を明らかにし、その発現を調節する因子を同定し、さらに機能的役割について解析することである。

具体的には、以下の 3 つのテーマに沿って研究する。

(1) 膵癌 (細胞株と切除標本) における KIAA1199 の発現を mRNA および蛋白レベルで調べる。KIAA1199 の発現パターンと他のヒアルロン酸関連因子 (HAS や HYAL) の発現との関係、および予後を含めた臨床病理学的因子との関連について調査する。

(2) 膵癌細胞における KIAA1199 の発現調節における低酸素 (hypoxia)、炎症、および癌間質相互作用の関与を調べる。

(3) KIAA1199 を強制発現およびノックダウンするモデルを作成し、機能的役割を調べる。同時に、KIAA1199 を選択的に阻害する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 KIAA1199 の発現パターン解析

膵癌細胞株 10 株 (AsPC1, BxPC3, CFPAC1, Capan1, Capan2, MiaPaCa2, NOR-P1, Panc1, SW1990, SUI2) を用い、KIAA1199 の 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。

(2) 膵癌組織における KIAA1199 の発現パターン解析と臨床病理学的因子との関連
臨床病理学および予後の解析がなされた浸潤性膵管癌 100 例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、免疫組織化学染色法にて KIAA1199 の発現を解析する。さらに、KIAA1199 の発現パターンと予後を含めた臨床病理学的因子との関連を調べる。

(3) KIAA1199 の発現を誘導する因子 (低酸素、炎症、癌間質相互作用) の同定
膵癌における KIAA1199 発現を誘導する因子として、低酸素、炎症、および癌間質相互作用の影響を調べる。
膵癌細胞を低酸素培養、炎症惹起、および線維芽細胞との共培養 (トランスウェルシステムによる非接触共培養) を行い、KIAA1199 発現の変化を調べる。

(4) KIAA1199 の機能解析および治療ターゲットとしての可能性検討
以下の遺伝子操作によって膵癌細胞の KIAA1199 の発現を変化させ、癌進展を規定する悪性形質に与える影響を調べる。

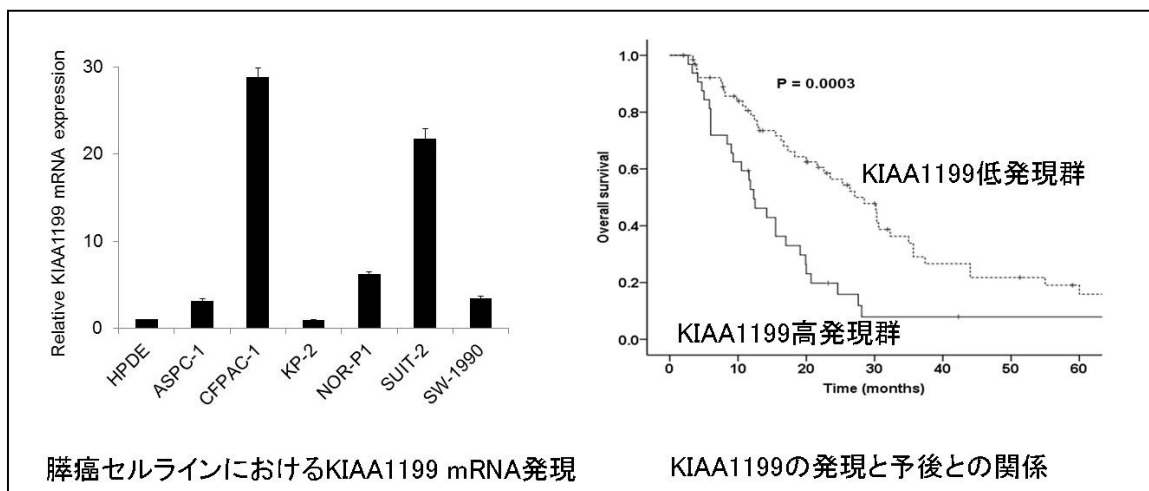
KIAA1199 発現ノックダウンモデル: KIAA1199 強発現株である CFPAC1 において、siRNA、ショートヘアピン RNA (shRNA) あるいは CRISPR/Cas9 システムを用い、KIAA1199 低発現 (あるいは発現消失) モデルを作成する。

KIAA1199 強制発現モデル: KIAA1199 発現ベクターを KIAA1199 低発現株 Panc1 に導入し、強制発現クローンを作成する。

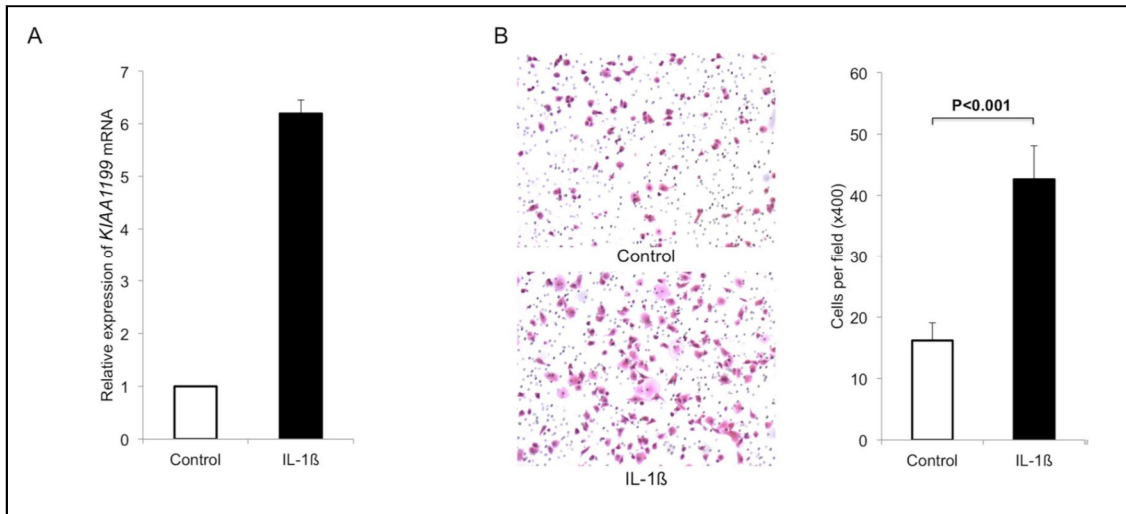
最後に、shRNA または CRISPR/Cas9 システムを用いて KIAA1199 を完全にノックアウトしたクローンをマウスに同所性あるいは異所性に移植し、増殖、浸潤、腹膜播種、肝転移を調べる。このモデルにより、将来的な KIAA1199 をターゲットとした膵癌治療の可能性について検討する。

4. 研究成果

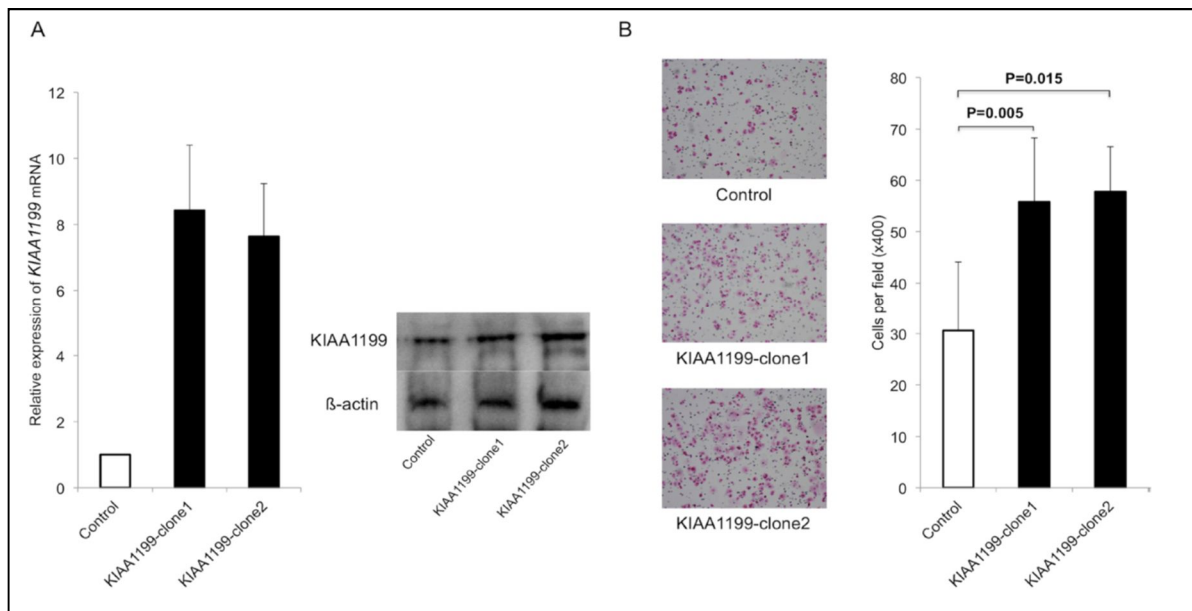
(1) KIAA1199 の発現が膵癌細胞株 (mRNA) および膵癌組織 (免疫染色) で亢進しており、発現が高い患者の予後は不良であることを見いだした (Koga et al, Pancreatology 2017)。また、KIAA1199 発現は、膵癌患者から得られた凍結組織においても、癌で正常組織に比べて有意に高かった。



(2) 膵癌細胞において KIAA1199 の発現は炎症 (IL-1 による刺激) によって誘導され、膵癌細胞の増殖、遊走、浸潤能と関連していることを報告した (Kohi et al. Oncotarget 2017)。



(3) 膵癌細胞において KIAA1199 を siRNA でノックダウンしたところ、細胞の遊走能、増殖能、および浸潤能が低下した。逆に、発現ベクターをトランスフェクションして KIAA1199 の強制発現モデルを作成したところ、細胞の遊走能、増殖能、および浸潤能が亢進した (Kohi et al. Oncotarget 2017)。



(4) 最近発見されたヒアルロン酸分解酵素 TMEM2 (transmembrane 2) は、膵癌の一部で過剰発現しており、この TMEM2 を siRNA でノックダウンしたところ、KIAA1199 の発現上昇と細胞遊走能の亢進がみられた。すなわち、KIAA1199 の発現は、他のヒアルロン酸分解酵素である TMEM2 の発現によって調節されている可能性が示唆された (論文投稿中)。

以上の結果より、KIAA1199 は膵癌において、炎症を介して発現が上昇しており、遊走・浸潤・増殖など悪性の振る舞いを亢進させている可能性が示された。この KIAA1199 をターゲットとした新たな治療戦略が考えられる。

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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 Koga A, Sato N, Kohi S, Yabuki K, Cheng XB, Hisaoka M, Hirata K	4. 巻 17
2. 論文標題 KIAA1199/CEMIP/HYBID overexpression predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 115-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016	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 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古賀 敦大, 厚井 志郎, 佐藤 典宏, 天池 孝夫, 工藤 遊山, 又吉 信貴, 柴尾 和徳, 平田 敬治
2. 発表標題 膵癌におけるKIAA1199の発現調節メカニズム 炎症およびマイクロRNAの関与
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 古賀 敦大, 佐藤 典宏, 厚井 志郎, 天池 孝夫, 工藤 遊山, 又吉 信貴, 柴尾 和徳, 平田 敬治
2. 発表標題 膵癌におけるヒアルロン酸分解酵素KIAA1199/CEMIPを調節するmiR-216aの新たなメカニズム
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	佐藤 典宏 (Sato Norihiro) (20423527)	産業医科大学・医学部・講師 (37116)	