

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08651

研究課題名(和文) 膵癌進展におけるTGF-β-Hippoシグナルのクロストークに関する研究

研究課題名(英文) Signal crosstalk between TGF-β and Hippo-pathway in pancreatic

研究代表者

近本 亮 (CHIKAMOTO, Akira)

熊本大学・病院・教授

研究者番号：10419640

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)：膵癌細胞株8株でYAP/TAZの発現を確認し、TAZ優位の発現パターンを8株中7株で呈した。TGF-β1投与により、MIAPaCa-2細胞株では、YAP/TAZの活性化ならびにEMTの促進を同定した。膵癌切除組織よりcancer-associated fibroblast(CAF)ならびに非癌部よりnormal fibroblast(NF)を樹立し、TGFβ mRNA levelを検討するとCAFではNFに比べて高いTGFβの発現を認めた。CAF由来のTGFβが膵癌細胞におけるYAP/TAZの活性化を引き起こし、EMT誘導に寄与してい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

本研究は難治癌として知られる膵臓癌におけるEMT獲得機構において、主要なEMT誘導因子として知られるTGF-βシグナルと多くの固形癌で破綻していることが知られるHippo-pathwayのcross talkによる膵癌浸潤・転移機構の解明を試みた。癌微小環境としての間質(CAF)由来のTGFβが膵癌細胞におけるHippo-pathwayの不活化を促進し、YAP/TAZの活性化を介してEMTを誘導して浸潤能獲得に寄与していることが示唆された。固形癌における主要な二つのシグナルがcross talkすることで高悪性度獲得に寄与することを示した。

研究成果の概要(英文)：YAP/TAZ protein expressions were investigated by western blotting in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells, and then seven of 8 PDAC cells displayed predominant TAZ expression rather than YAP. Treatment of recombinant TGFβ1 suppressed phosphorylated YAP/TAZ expressions, but not do not affect total YAP/TAZ expressions. These finding showed that TGFβ1 activated YAP/TAZ signaling pathway. Furthermore, In several PDAC cells, TGFβ1 treatment promoted EMT with loss of E-cadherin, and knockdown of YAP/TAZ attenuated TGFβ mediated EMT induction. These findings suggested that TGFβ-Hippo signal crosstalk might be associated with the invasiveness in PDAC.

研究分野：難治癌として知られる膵癌の高い浸潤、転移能の解明を試み、新たな治療法開発を目標とする

キーワード：膵癌 YAP TAZ TGF-β EMT

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は治療抵抗性が高く、難治性癌として知られ、高い浸潤・転移能が予後不良の一因と考えられる。申請者らはこれまでに、肝疾患における TGF- β シグナルの役割について、1) TGF- β 添加により癌幹細胞表面マーカーである接着因子 CD44 を介して、間葉系マーカーである vimentin の発現上昇を引き起こす、2) TGF- β による EMT 誘導は CD44 を siRNA を用いて downregulation することで阻害される、ことを明らかにし、肝細胞癌における浸潤・転移を促す EMT を制御する方法として、TGF- β -CD44-EMT axis をターゲットにした治療法を提唱した。今回、膵癌進展(EMT 誘導)における TGF- β -Smad シグナルの役割解明と、新しい膵癌治療法の開発を目的とする本研究を遂行するにあたって、申請者らは Hippo pathway の構成成分である転写補助因子 YAP/TAZ に着目した。Hippo pathway はショウジョウバエから哺乳動物まで保存されている腫瘍抑制シグナル伝達系で、細胞間の contact inhibition を担って器官サイズをコントロールすることが知られている。その破綻はヒト癌症例で高頻度に認められ、YAP/TAZ の発現上昇を引き起こす。乳癌において、YAP/TAZ の高発現は癌幹細胞様の性質を獲得させ、転移を促し、化学療法への抵抗性も上昇させ予後が悪いことが報告されている(Cell, 2011)。また、ヒト胚性幹細胞においては、TGF- β 刺激による Smad の核移行と引き続く標的遺伝子発現に TAZ が必要であることが報告されている。

2. 研究の目的

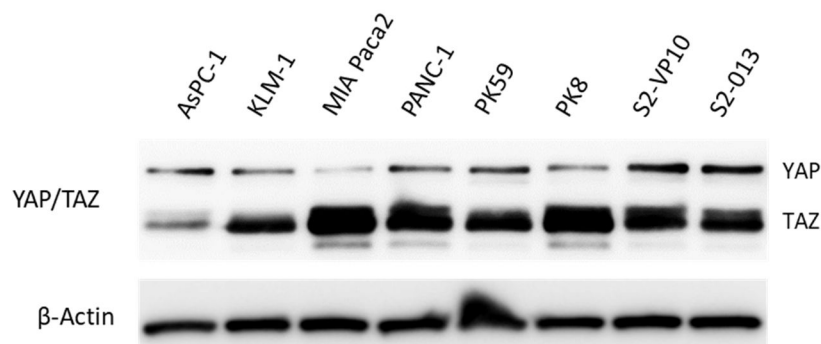
Transforming growth factor (TGF- β)-Smad シグナルは癌細胞に対しては上皮間葉転換 Epithelial-mesenchymal transition (EMT) を誘導し、癌の浸潤・転移に関与する。申請者らは腫瘍抑制シグナル Hippo pathway の構成成分 YAP/TAZ を介した TGF- β -Smad シグナルを抑制することで膵癌の浸潤・転移が抑制される、という仮説を立てた。本研究提案の最終目的は、膵癌進展における TGF- β -Smad シグナルのメカニズムを分子生物学的に紐解くことにより、新しい膵癌治療法の基礎を築くことである。

3. 研究の方法

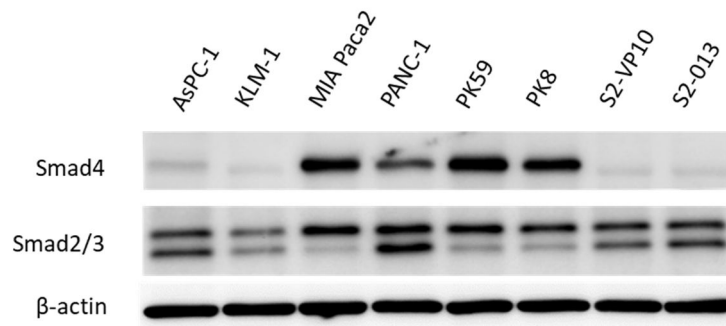
YAP 低発現株を用いてプラスミドによる YAP 強制発現系と YAP 高発現株を用いた siRNA による発現抑制系を作成する。細胞内 Smad シグナルの変化や細胞増殖能や浸潤能へ与える影響を MTT assay や invasion assay を用いて control と比較検討する。TAZ に関しても同様に検討を行う。具多的な方法としては、YAP/TAZ の膵癌細胞株への強制発現の方法は、YAP/TAZ の cDNA をサブクローニングした後に、GATEWAY システム (invitrogen) を用いて発現ベクターを作成する。申請者らはこれまでの研究においてすでにベクターを作成し保有しており、作成したプラスミドは、大腸菌へ導入し、増幅させる。プラスミドを抽出・精製を行った後に、Lipofectamine を用いて、細胞へ導入する。発現抑制系では、YAP/TAZ 高発現株へ YAP/TAZ の siRNA (invitrogen) を行い、細胞内 Smad シグナルの低下を確認する。細胞増殖能の変化や浸潤能の変化などの表現型が得られた場合には、YAP/TAZ ならびに Smad の標的遺伝子を同定するために、cell-cycle-related genes や EMT-related genes の発現変化を control 群と比較検討する。

4. 研究成果

保有する膵癌細胞株 8 株で YAP/TAZ の発現状態を western blotting 法で確認したところ、肝癌細胞株同様に TAZ 優位 (TAZ>YAP) の発現パターンを 8 株中 7 株で呈していた。AsPC-1 細胞株では YAP=TAZ 程度の発現状態であった。

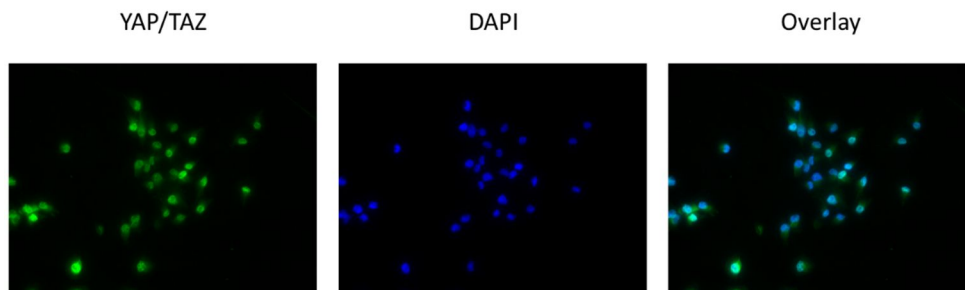


Smad4 の発現についても western blotting 法で確認したところ、Smad4 発現あり (MIAPaca2, PANC-1, PK59, PK8) と Smad4 発現なし (AsPC-1, KLM-1, S2-VP10, S2-013) の株があり、以降の TGF- 添加実験には AsPC-1, KLM-1, MIAPaca2, PANC-1, PK59 を用いることとした。

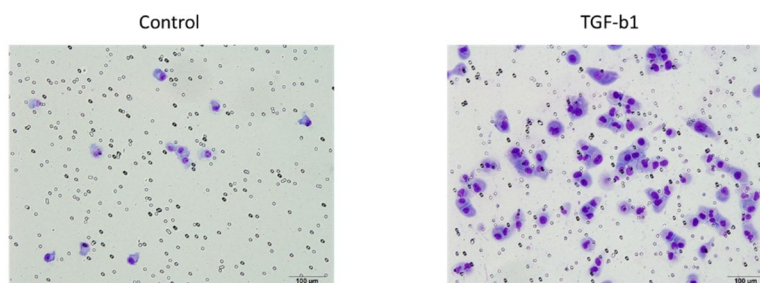


TGF- 添加量の設定を行うために、TGF- を 5ng/mL, 10ng/mL, 15ng/mL で添加し、Smad シグナルの活性化を phospho-Smad3 で確認し添加量を TGF- 1 の投与量を 15ng/mL に設定した。TGF- 1 を膵癌細胞に投与することにより、MIAPaCa-2 細胞株では、YAP/TAZ の total 発現量は変わらなかったが、リン酸化 YAP/TAZ の発現低下を認め Hippo-pathway の不活性化ひいては YAP/TAZ の活性化ならびに EMT の促進を同定した。

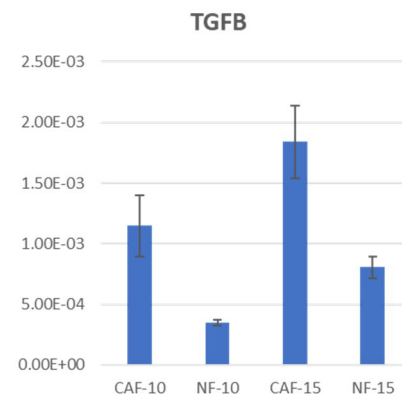
MIAPaca2 (normal), rhTGF-b1 (+)



Invasion (MIAPaca2)



膵癌微小環境において、cancer-associated fibroblast が癌進展に重要な役割を有することが注目されており、膵癌切除組織より isolate した CAF ならびに非癌部より normal fibroblast を樹立し、CAF と normal fibroblast で TGF beta1, 2, 3 の mRNA level を real time PCR で検討した。CAF では normal fibroblast に比べて高い TGF beta1, 2, 3 の発現を認めた。



癌微小環境として CAF 由来の TGFbeta が膵癌細胞における Hippo-pathway の不活性化ひいては YAP/TAZ の活性化を引き起こし、EMT 誘導による膵癌の高悪性度に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyata Tatsunori, Hayashi Hiromitsu, Yamashita Yo-ichi, Matsumura Kazuki, Nakao Yosuke, Itoyama Rumi, Yamao Takanobu, Tsukamoto Masayo, Okabe Hirohisa, Imai Katsunori, Chikamoto Akira, Ishiko Takatoshi, Baba Hideo	4. 巻 28
2. 論文標題 Prognostic Value of the Preoperative Tumor Marker Index in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Retrospective Single-Institution Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1572 ~ 1580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09022-3	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 -

〔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 上村紀雄、林 洋光、東 孝暁、伊東山瑠美、中尾陽佑、遊佐俊彦、今井克憲、山下洋市、近本 亮、馬場秀夫
2. 発表標題 膵癌における スタチンのHippo-pathwayを介した抗腫瘍効果
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村紀雄、林 洋光、松村和季、北村文優、伊東山瑠美、中尾陽佑、山尾宣暢、東 孝暁、山村謙介、今井克憲、近本 亮、山下洋市、馬場秀夫
2. 発表標題 膵癌に対するStatin投 与によるYAP/TAZを介した抗腫瘍効果に関する検討
3. 学会等名 第53回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有馬浩太、伊東山瑠美、石本崇胤、三宅慧輔、内原智幸、中川茂樹、岡部弘尚、林洋光、今井克憲、近本亮、山下洋市、馬場秀夫
2. 発表標題 腫瘍微小環境における炎症性シグナルを介した膵癌進展メカニズムの解明
3. 学会等名 第29回日本消化器癌発生学会総会
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	林 洋光 (HAYASHI Hiromitsu) (80625773)	熊本大学・病院・助教 (17401)	
研究分担者	岡部 弘尚 (OKABE Hirohisa) (40573621)	熊本大学・病院・非常勤診療医師 (17401)	
研究分担者	橋本 大輔 (HASHIMOTO Daisuke) (80508507)	熊本大学・病院・非常勤診療医師 (17401)	

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
---------	---------