

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：84414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09121

研究課題名(和文) Rubiconを介した膵癌治療抵抗性のメカニズム解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Rubicon can predict prognosis in patients of pancreatic ductal adenocarcinoma after neoadjuvant chemoradiotherapy

研究代表者

後藤 邦仁 (Gotoh, Kunihito)

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター(臨床研究センター)・その他部局等・研究員

研究者番号：10362716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーの抑制因子であるRubiconの臨床的意義を評価するために、化学放射線療法後の膵癌患者から切除された検体を用いて免疫組織化学的解析を行い、Rubiconの発現を解析したところ、Rubicon高発現群がRubicon低発現群よりも有意に予後不良であった。またゲムシタビン耐性(GR)膵癌細胞株を樹立し、Rubiconの発現を測定したところ、GR膵癌細胞株は親株よりも発現量が有意に高かった。GR株にRubiconを標的としたsmall interfering RNA (siRNA)を用いてノックダウンしたところ、ゲムシタビンの感受性には影響しなかったが、浸潤能と細胞生存率は低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rubiconの高発現は、化学放射線療法後の膵癌患者において予後不良な因子であり、細胞実験でRubiconを抑制することでゲムシタビン抵抗性膵癌細胞株の浸潤能と細胞生存率を改善することが示された。以上より、化学放射線療法後の膵癌において、Rubicon高発現が予後不良因子であり、またRubiconをターゲットとした治療が、癌治療後の膵癌において有効な治療法の選択肢の一つになりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the clinical significance of Rubicon, immunohistochemistry was performed, and Rubicon expression was analyzed in specimens resected from pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients after neoadjuvant chemoradiotherapy. We established Gemcitabine-resistant (GR) PDAC cell line, estimated Rubicon expression and Autophagy Flux, and evaluated gemcitabine (GEM) sensitivity, invasion ability, and cell viability, using small interfering RNA (siRNA) targeting Rubicon.

Rubicon expression in resected PDAC after chemoradiotherapy samples revealed significantly worse overall survival and recurrence-free survival in the Rubicon-high expression than in the Rubicon-low group. In vitro, GR PDAC cell lines had higher expression and lower autophagy flux than parent PDAC cell line. Transduction with siRNA downregulated Rubicon, which did not affect on GEM sensitivity but did reduce invasion ability and cell viability in GR PDAC cell line.

研究分野：膵癌

キーワード：Rubicon 膵癌 autophagy 化学療法 Gemcitabine

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治癌である膵癌に対して手術に化学療法/放射線療法を組み合わせた集学的治療の有用性が示されつつあるが、上記治療に抵抗性を示す症例の予後は依然として不良である。一般的に癌細胞は化学療法や放射線治療といった癌治療を受けると、オートファジーという代謝機構を利用して、ダメージを受けたオルガネラを処理していると考えられている。クロロキンやハイドロキシクロロキンといった抗マラリア薬は、リソソーム経路を阻害し、オートファジーを抑制することで、癌細胞を細胞死へと誘導する。このことから、抗マラリア薬が癌治療における新規薬剤の可能性を期待されたが、膵癌における臨床試験では十分な効果が得られていない。そこで我々は内因性のオートファジー抑制因子である Rubicon に着目した。Rubicon はオートファゴソームとリソソームの融合を抑制するタンパクで、老化や様々な生活習慣病との関連について報告されているが、癌との直接の関連についてはほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

内因性の Autophagy 制御因子である Rubicon に着目し、膵癌の治療抵抗性のメカニズムを解明し、新規治療法への応用およびオートファジー関連タンパクをターゲットとした新規治療法の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

当院において 2007 年 3 月～2015 年 5 月に術前化学放射線療法後に根治切除を施行した膵癌 81 例を対象とし、抗 Rubicon 抗体を用いて切除標本の免疫組織化学染色をおこなった。Rubicon の発現強度を High 群と Low 群の 2 群に分け、臨床病理学的因子および予後との相関を解析した。

細胞実験では、膵癌細胞株である MiaPaCa2 を用いて、Rubicon の発現を Western blot 法と qRT-PCR 法で確認した。また MiaPaCa2 のゲムシタピン耐性株(MiaGR)を樹立し、Rubicon の発現を評価した。さらに MiaPaCa2 および MiaGR の Autophagy Flux を評価した。

MiaGR において siRubicon 株を作成し、Autophagy Flux、MTT assay で GEM 感受性の変化を、proliferation assay で増殖能の変化を、invasion assay で浸潤能の変化を評価した。

4. 研究成果

全症例の全生存期間(OS)および無再発生存期間(RFS)はそれぞれ 3.7 ± 3.0 年および 2.8 ± 3.0 年であった。Rubicon 発現の High 群は 48 例で、Low 群は 33 例であった。2 群間で臨床病理学的因子に有意差を認めなかった。OS の検討では、Rubicon 発現の High 群の方が Low 群に比べて有意に短い結果であった (中央値 2.0 年 vs 3.2 年; $p = 0.036$)。その他に単変量解析にて有意差を認める因子は認めなかった。RFS の検討では、Rubicon 発現の High 群の方が Low 群に比べて有意に短い結果であった(中央値 0.9 年 vs 1.9 年; $p =$

0.015)。その他に単変量解析にて有意差を認める因子は認めなかった。

Western blot 法と qRT-PCR 法ともに、MiaGRの方が MiaPaCa2 より高い Rubicon の発現を認めた。また MiaGR は MiaPaCa2 より Autophagy Flux が低い結果であった。

MiaGR において siRubicon により Rubicon ノックダウンすることで、GEM 感受性に変化は認めなかったが、Autophagy Flux は上昇し、増殖能・浸潤能の低下を認めた。

以上より、化学放射線療法後の膵癌において、Rubicon 高発現が予後不良因子であり、また Rubicon をターゲットとした治療が、癌治療後の膵癌において有効な治療法の選択肢の一つになりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kubo Masahiko, Gotoh Kunihito, Eguchi Hidetoshi, Kobayashi Shogo, Iwagami Yoshifumi, Tomimaru Yoshito, Akita Hirofumi, Asaoka Tadafumi, Noda Takehiro, Takeda Yutaka, Tanemura Masahiro, Mori Masaki, Doki Yuichiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Impact of CD36 on Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 610～619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-019-07927-2	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 Asaoka Tadafumi, Kobayashi Shogo, Hanaki Takehiko, Iwagami Yoshifumi, Tomimaru Yoshito, Akita Hirofumi, Noda Takehiro, Gotoh Kunihito, Takeda Yutaka, Tanemura Masahiro, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Clinical significance of preoperative CA19-9 and lymph node metastasis in intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1176～1186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-020-01992-x	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 Matsushita Katsunori, Kobayashi Shogo, Akita Hirofumi, Konno Masamitsu, Asai Ayumu, Noda Takehiro, Iwagami Yoshifumi, Asaoka Tadafumi, Gotoh Kunihito, Mori Masaki, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi, Ishii Hideshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinicopathological significance of <sc>MYL9</sc> expression in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cnr2.1582	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 Mori Soichiro, Akita Hirofumi, Kobayashi Shogo, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Noda Takehiro, Gotoh Kunihiro, Takeda Yutaka, Tanemura Masahiro, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 512
2. 論文標題 Inhibition of c-MET reverses radiation-induced malignant potential in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 51 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.04.029	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 Ueno Goro, Iwagami Yoshifumi, Kobayashi Shogo, Mitsufuji Suguru, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Akita Hirofumi, Asaoka Tadafumi, Noda Takehiro, Gotoh Kunihiro, Mori Masaki, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 ACAT-1-Regulated Cholesteryl Ester Accumulation Modulates Gemcitabine Resistance in Biliary Tract Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 2899 ~ 2909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-11152-1	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 Mitsufuji Suguru, Iwagami Yoshifumi, Kobayashi Shogo, Sasaki Kazuki, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Akita Hirofumi, Asaoka Tadafumi, Noda Takehiro, Gotoh Kunihiro, Takahashi Hidenori, Tanemura Masahiro, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of Clusterin Represses Proliferation by Inducing Cellular Senescence in Pancreatic Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-11668-0	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18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 久保 維彦, 後藤 邦仁, 江口 英利, 岩上 佳史, 秋田 裕史, 野田 剛広, 浅岡 忠史, 小林 省吾, 森 正樹, 土岐 祐一郎
2. 発表標題 膵癌治療抵抗性におけるスカベンジャー受容体発現意義の検討
3. 学会等名 第74回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 正成, 岩上 佳史, 江口 英利, 富丸 慶人, 秋田 裕史, 野田 剛広, 後藤 邦仁, 小林 省吾, 森 正樹, 土岐 祐一郎
2. 発表標題 膵癌細胞においてcell cycleとapoptosisを制御するmicroRNAの解析
3. 学会等名 第74回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光藤 傑, 岩上 佳史, 江口 英利, 富丸 慶人, 秋田 裕史, 野田 剛広, 後藤 邦仁, 小林 省吾, 土岐 祐一郎, 森 正樹
2. 発表標題 腫瘍組織内に浸潤するCD68陽性細胞と浸潤性膵管癌の予後に関する検討
3. 学会等名 第120回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋田 裕史, 江口 英利, 森 総一郎, 岩上 佳史, 富丸 慶人, 野田 剛広, 後藤 邦仁, 小林 省吾, 森 正樹, 土岐 祐一郎
2. 発表標題 切除可能膵癌における術前化学放射線治療の功罪
3. 学会等名 第120回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸川 大輝, 後藤 邦仁, 小林 省吾, 岩上 佳史, 山田 大作, 富丸 慶人, 秋田 裕史, 野田 剛広, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 術前加療後膵癌におけるRubicon発現の臨床的意義の検討
3. 学会等名 第76回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西 秀美, 後藤 邦仁, 小林 省吾, 岩上 佳史, 山田 大作, 富丸 慶人, 秋田 裕史, 野田 剛広, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 Gencitabine耐性膵癌に対する新規サリドマイド誘導体投与の有用性の検討
3. 学会等名 第76回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上 弘大, 秋田 裕史, 小林 省吾, 岩上 佳史, 山田 大作, 富丸 慶人, 野田 剛広, 後藤 邦仁, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 膵癌細胞株の増殖に対して癌関連線維芽細胞の老化現象が関与するかの検討
3. 学会等名 第76回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西 秀美, 後藤 邦仁, 小林 省吾, 岩上 佳史, 山田 大作, 富丸 慶人, 秋田 裕史, 野田 剛広, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 膵癌に対する新規サリドマイド誘導体投与の有用性の検討
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹田 佑, 山田 大作, 小林 省吾, 岩上 佳史, 富丸 慶人, 秋田 裕史, 野田 剛広, 後藤 邦仁, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 膵癌集学的治療の個別化を目指した血中microRNA遺伝子の検討
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上 弘大, 秋田 裕史, 小林 省吾, 岩上 佳史, 山田 大作, 富丸 慶人, 野田 剛広, 後藤 邦仁, 佐藤 太郎, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 肺癌術前化学療法施行例における効果予測、予後予測マーカーとしてのPET-CT有用性の検討
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 純一, 秋田 裕史, 小林 省吾, 岩上 佳史, 山田 大作, 富丸 慶人, 野田 剛広, 後藤 邦仁, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 肺癌における術前治療の術後補助療法に与える影響の検討
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩上 佳史, 植野 吾郎, 小林 省吾, 佐々木 一樹, 山田 大作, 富丸 慶人, 秋田 裕史, 野田 剛広, 後藤 邦仁, 高橋 秀典, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 ACAT1に制御されるコレステロールエステルの蓄積は胆道がんのゲムシタピン耐性を調整する
3. 学会等名 第58回 日本外科代謝栄養学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光藤 傑, 岩上 佳史, 小林 省吾, 佐々木 一樹, 山田 大作, 富丸 慶人, 秋田 裕史, 野田 剛広, 後藤 邦仁, 高橋 秀典, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 Clusterin発現抑制は細胞老化を介して膵がん細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第80回 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 邦仁, 酒井 健司, 俊山 礼志, 柳澤 公紀, 三代 雅明, 高橋 佑典, 浜川 卓也, 土井 貴司, 竹野 淳, 加藤 健志, 高見 康二, 平尾 素宏
2. 発表標題 高齢者膵癌に対する外科的治療の安全性に関する検討
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸川 大輝, 後藤 邦仁, 小林 省吾, 佐々木一樹, 岩上 佳史, 山田 大作, 富丸 慶人, 野田 剛広, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 術前化学放射線療法後の膵癌症例におけるRubicon発現の臨床的意義の検討
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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	小林 省吾 (Kobayashi Shogo) (30452436)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究 分担者	江口 英利 (Eguchi Hidetoshi) (90542118)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

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