

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18113

研究課題名（和文）膵癌におけるHDAC1の発現意義とEMT抑制をターゲットとした新規治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of the role of histone deacetylase 1 in distant metastasis of pancreatic ductal cancer

研究代表者

山本 慧（Yamamoto, Kei）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90835240

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌は上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal-transition; EMT)を介してがんの浸潤・転移を引き起こす。本研究では、エピジェネティック機構の一つであるヒストン脱アセチル化酵素1(Histone deacetylase 1; HDAC1)が膵癌においてEMTを介して遠隔転移を促進する事を明らかにした。更にHDAC1阻害薬であるVorinostatはEMT関連転写因子であるSNAILを抑制する事でEMTを抑制する事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸潤性膵管癌は極めて予後不良であり、新たな治療標的の同定は喫緊の課題である。本研究では膵癌においてHDAC1及びSNAILがEMTを介して遠隔転移を制御し、HDAC1が膵癌治療における新たな治療ターゲットとなり得る事を示した。癌発生的に類似している胆道癌においても同遺伝子が特定されており、難治性癌である膵胆道癌においてEMTを制御する重要なエピジェネティック機構の一つが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer causes cancer infiltration and metastasis through epithelial-mesenchymal transition. In this study, we revealed that one of the epigenetic mechanisms, histone deacetylase 1 (HDAC1), promotes distant metastasis via EMT in pancreatic cancer. Furthermore, it was shown that Vorinostat, an HDAC1 inhibitor, regulates EMT by suppressing SNAIL, which is an EMT-related transcription factor.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：上皮間葉転換 HDAC1 SNAIL

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

浸潤性膵管癌(以下:膵癌)は5年生存率が約8%と予後不良な癌腫である。切除可能病変であっても術後70%に全身転移、20%に局所再発を来す。しかし現行の抗癌剤治療は、癌の浸潤・転移を十分に抑制出来ておらず、新たな観点から治療標的を同定する必要がある。

癌の浸潤・転移を引き起こす変化として上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal-transition; EMT)が重要とされる。EMTについて、エピジェネティック機構の関与が多数の癌腫において報告されている。教室では胆道癌のEMTにヒストン脱アセチル化酵素1(Histone deacetylase 1; HDAC1)が関わることを証明した。胆道癌と膵癌は癌生物学的に類似しており、膵癌でも同様の機構が存在すると考えられるが膵癌における十分な報告はない。

### 2. 研究の目的

膵癌治療において浸潤転移のメカニズムを解明することは非常に重要である。炎症がEMTに関与すると報告されることから、膵癌においては慢性炎症がエピジェネティックな遺伝子発現変化を引き起こし、これが膵癌の浸潤・転移に重要な役割を果たしているのではないかと想定される。本研究では、エピジェネティック機構の一つであるヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1)に着目し、HDAC1発現が膵癌の浸潤転移に関与するか、あるいは新規治療の標的となりうるかを検討するとともに、HDACと関連する炎症性マーカーを同定することにより新規のバイオマーカーおよび治療標的となるかを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

①HDAC1発現とEMTの関係の評価・膵癌においてもHDAC1発現とEMTが関連するかを検証する。具体的には当教室で所有する複数の膵癌細胞株を用いてHDAC1発現の誘導・阻害実験を行い、EMTとの関与についてEMTに関連する浸潤能の変化、EMT関連遺伝子/蛋白の変化(E-カドヘリン、ビメンチン、SNAIL1/2、ZEB1/2、TWIST)などをRT-PCR, Western blottingを用いて評価する。

②HDAC1発現に関与する炎症性サイトカインの同定・膵癌切除症例の内、特にHDAC1高発現/低発現であった症例の凍結保存している背景膵から蛋白抽出を行い、膵癌細胞へ添加しHDAC1の発現変化を確認する。HDAC1を賦活する抽出液とそうでない抽出液を用いてサイトカインアレイを行いHDAC1高発現症例で高値を示すサイトカインをpick upする。

③同定した炎症性サイトカインのHDAC1、EMTへの影響の検討・同定した炎症性サイトカインの添加実験により、HDAC1発現の賦活の有無、EMTに関連する浸潤能の変化、EMT関連遺伝子/蛋白の変化をRT-PCR, Western blottingを用いて評価する。

④発癌/転移マウスモデルを作製/検証・炎症性サイトカインをマウス皮下腫瘍移植モデルに局所投与し、膵癌細胞株の転移が増悪するかどうかを検証を行う。さらに腫瘍を摘出し、サイトカイン投与前後でHDAC1の発現がどのように変化しているかを解析し、またサイトカイン投与前後の腫瘍の遺伝子発現をmicroarrayを用いて網羅解析し、GSEA解析を行うことにより、EMT関連遺伝子がサイトカイン投与によって惹起されていることを確認する。またサイトカイン投与後のマウスの末梢血中にも同様のサイトカインがdetectできるかどうかを検証する。

⑤新規治療targetの開発・皮下腫瘍モデルマウスに、同定したサイトカインの抗体を静注後、サイトカインを腫瘍内に局注し、サイトカイン抗体存在下で、転移能が低下するかを検証する。さらに腫瘍を摘出し、サイトカイン抗体を投与しないものに比べ、HDAC1発現が抑制されていることを確認する。

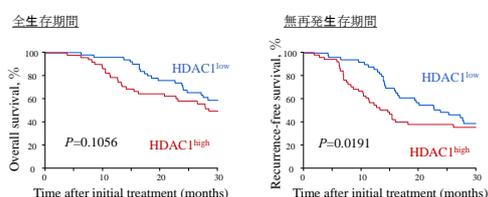
⑥膵癌患者血清を用いた新規バイオマーカーの開発・同定したサイトカインについて膵癌患者血清を術前、術後定期的にモニタリングし、切除後どのように変化するか、あるいは再発時にサイトカインがどのように変化するかを検証する。

### 4. 研究成果

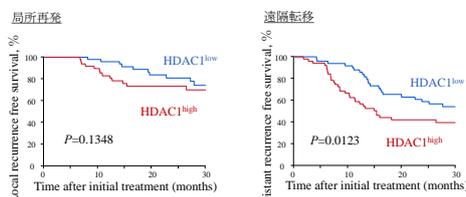
2007年3月から2013年9月に当科で膵切除を施行した膵癌切除検体(n=103)を対象に免疫組織化学染色でHDAC1発現を解析し再発予後を含めた臨床病理学的因子との比較解析を行なった。膵癌切除例のうち、HDAC1high群では、HDAC1low群と比較して遠隔再発までの期間が有意に短かった(図1)。

図1

HDAC1発現と全生存期間及び無再発生存期間



HDAC1発現と再発形式についてのサブ解析

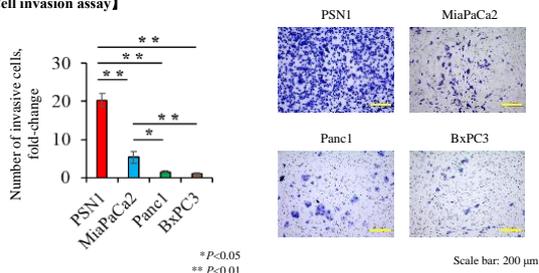


次に当科で保有する膵癌細胞株 (PSN1、MiaPaCa2、Panc1、BxPC3) を用いて、HDAC1 発現と活性を qRT-PCR 及び ELISA で測定し、浸潤能及び EMT 関連因子発現との関連を解析した。HDAC1 発現および活性が高い膵癌細胞株 (PSN1) では、浸潤能の亢進と Vimentin の発現上昇、CK19 の発現低下を認めた (図 2)。

図 2

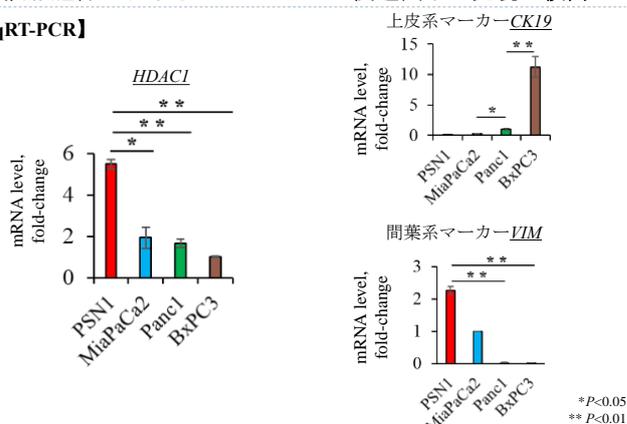
膵癌細胞株における浸潤能の検討

【Cell invasion assay】



膵癌細胞株におけるHDAC1とEMT関連因子の発現の検討

【qRT-PCR】

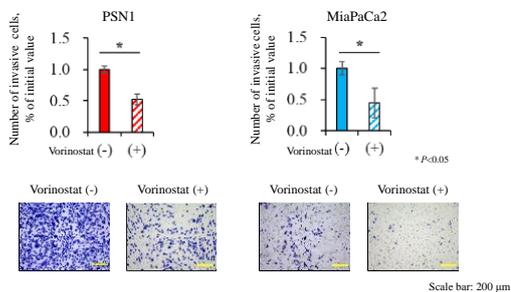


続いて HDAC 阻害薬 (Vorinostat) による膵癌細胞株の浸潤能および EMT 関連因子の発現変化について解析した。膵癌細胞株 (PSN1、MiaPaCa2) を Vorinostat:500nmol/L 存在下に培養し、先と同様 HDAC1 発現と活性を qRT-PCR 及び ELISA で測定し、浸潤能及び EMT 関連因子発現との関連を解析した。HDAC1 高発現の膵癌細胞株において、HDAC 阻害薬の使用により、浸潤能低下と EMT 関連因子の変化を認めた (図 3)。

図 3

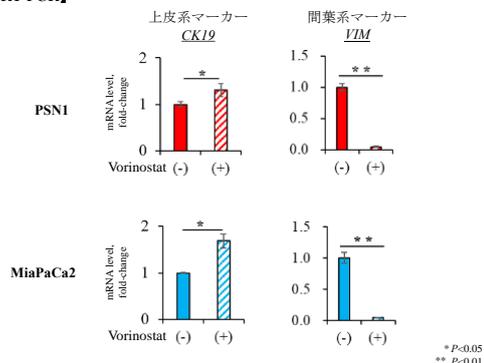
HDAC阻害薬 (Vorinostat) による浸潤能の変化

【Cell invasion assay】



HDAC阻害薬 (Vorinostat) によるEMT関連因子の発現変化

【qRT-PCR】

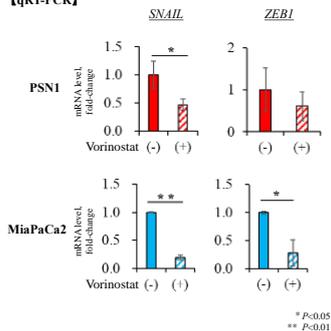


最後に HDAC1 発現に関わる EMT 関連の転写因子に関する検討を行なった。膵癌細胞株 (PSN1、MiaPaCa2、Panc1、BxPC3) における EMT 関連遺伝子の発現を qRT-PCR で測定し、HDAC1 高発現細胞株である PSN1 において SNAIL 及び ZEB1 発現が亢進していた。HDAC1 阻害剤存在下では PSN1 における SNAIL 発現は qRT-PCR, Western blotting, 免疫組織化学染色のいずれにおいても低下していた。siSNAIL in lipofectamine RNAiMAX 存在下では PSN1 における Vimentin の発現低下, CD19 発現上昇が認められ、EMT 関連転写因子の内 SNAIL が HDAC1 発現に関連していた (図 4)。

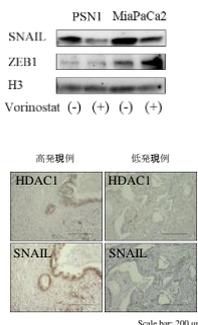
図 4

HDAC阻害薬 (Vorinostat) によるEMT関連の転写因子の発現変化

【qRT-PCR】

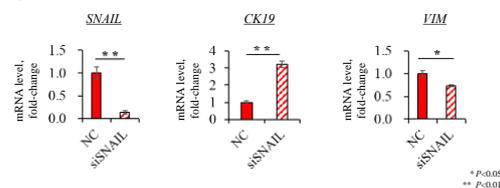


【Western blotting】



SNAIL遺伝子の抑制によるEMT関連因子の変化

【qRT-PCR】



膀胱癌において、HDAC1 高発現は遠隔転移再発のリスク因子であり、HDAC1 を阻害することにより、EMT を抑制できる可能性が示唆された。

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

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