

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18126

研究課題名(和文)膵癌におけるクラスリンアダプターの発現解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of clathrin adaptor expression and development of novel therapies for pancreatic cancer

研究代表者

武藤 亮 (Muto, Makoto)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：10791478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞内小胞輸送に関連する分子である、クラスリンアダプター分子の膵癌における機能解析を目的として行われた。本研究ではクラスリンアダプター分子の1つであるAP-1に注目し、膵癌切除症例について免疫染色で発現強度と予後の関連について解析を行った。その結果AP-1の高発現群では5年生存率が不良であった。膵癌細胞株に対してAP-1のサブユニットであるAP1G1(-adaplin)のノックダウンを行ったところ、Western blottingで上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)の発現低下を認めた。本研究の結果からAP-1はEGFRの発現を介して、膵癌の増殖に関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

膵癌は最も予後不良な癌のひとつであり、新規治療薬の開発は急務である。本研究ではAP-1がEGFRの発現と関連して、膵癌の予後不良因子である可能性が示唆された。この結果は、膵癌の腫瘍増殖の病態理解を深めるとともに、新規治療薬開発の一助となる可能性がある。このように本研究が膵癌研究に与える影響は大きく、その学術的・社会的意義は重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the function of clathrin adaptor, which is associated with intracellular vesicle trafficking, in pancreatic cancer. In this study, we focused on AP-1, and immunohistochemical staining was performed to analyze the association between prognosis and AP-1 expression. As a result, 5-year survival rate was worse in high AP-1 expression group, and AP-1 expression was showed as a poor prognostic factor of pancreatic cancer. We knock-downed AP1G1(-adaplin), subunit of AP-1, in pancreatic cancer cell lines, and western blotting was performed to analyzed the change of protein expression which is associated with tumor progression. As a result, EGFR expression was suppressed. This study showed that AP-1 was associated with tumor growth of pancreatic cancer via EGFR expression.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 クラスリンアダプター スーパーアパタイトナノ粒子法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の増殖には様々な増殖因子と受容体を介した細胞内シグナルの伝達が関与しているが、中でも Epidermal growth factor(EGF)の受容体である EGFR は代表的なチロシンキナーゼレセプターであり、その発現異常は発癌に深く関わっている。正常細胞では細胞膜上で結合した EGF-EGFR 複合体はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、リソソームで分解されたり、再び細胞膜へ輸送されて再利用されたりすることで、正常な細胞内シグナル伝達が制御されている。

細胞内小胞輸送に関しては、トランスゴルジネットワークやエンドサイトーシスに関わる小胞を被覆する Golgi-localized, gamma-adaptin ear containing, ADP-ribosylation factor binding protein-2(GGA2)や Adaptor proteins(APs)などのクラスリンアダプター分子群が、オルガネラ間の小胞輸送を制御していることが明らかとなってきた。

siRNA による発現制御は、配列特異的に mRNA を切断し、RNA interference(RNAi)を起こすので、単一分子のみの制御を可能とした。しかしながら、siRNA は易分解性で不安定であり、生体内へ投与した場合には十分な効果を発揮できず、in vivo の実験には適していなかった。今回注目したスーパアパタイトナノ粒子法は、カルシウム、リン酸、重炭酸からなる 50~300nm の炭酸アパタイト粒子に、超音波刺激を加えることで 10~30nm に細粒化され、経静脈的な全身投与が可能となった。

一方、これまで膵癌においてクラスリンアダプター分子の機能解析やこれをターゲットとした抗腫瘍効果の研究は皆無であった。膵癌は最も予後不良な癌であり、現状の抗癌剤治療では十分な効果を得ることができていない現状であり、新たな治療法の開発が待たれている。

2. 研究の目的

本研究では、膵癌治療の新規ターゲットとなり得るクラスリンアダプター分子に着目し、その抗腫瘍効果を解析する。さらに、革新的な Drug delivery system であるスーパアパタイトナノ粒子法を用いた siRNA の生体内投与により、in vivo での抗腫瘍効果を解析し、従来の癌治療における化学療法や分子標的薬とは全く異なる抗腫瘍メカニズムを利用した新規治療薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

膵癌におけるクラスリンアダプター分子の発現解析

膵癌切除標本および膵癌細胞株を用いて、免疫染色、Western blot によりクラスリンアダプター(GGA1,2,3 AP-1,2,3,4)と、増殖因子受容体(EGFR)、細胞内シグナル伝達関連分子(K-RAS、RAF、MAPK) の発現解析を行い、膵癌で高発現のクラスリンアダプターおよび関連分子の同定を行う。同定されたクラスリンアダプターと臨床病理学的因子との関連性を解析する。

膵癌細胞株における抗腫瘍効果の解析(リポフェクション法によるin vitroでの解析)

膵癌細胞株を培養し、siRNA によるクラスリンアダプター分子の発現抑制を行う。Proliferation assay、Invasion assay により、in vitro でのクラスリンアダプター分子が膵癌の腫瘍の増殖能、浸潤能に与える影響を解析する。またフローサイトメトリーによる Cell cycle assay、Apoptosis assay によって、細胞周期、アポトーシスに与える影響を解析する。

膵癌担癌マウスにおけるクラスリンアダプターの機能解析(スーパアパタイトナノ粒子法によるin vivoでの解析)

培養した膵癌細胞株をマウスの皮下に注入し膵癌担癌マウスモデルを作成し、スーパアパタイトナノ粒子法を用いて siRNA を全身投与する。マウスから腫瘍を摘出し、腫瘍体積・重量を測定し、免疫染色や RT-qPCR、Western blotting により、腫瘍の組織学的変化や、関連分子の mRNA、タンパク発現について解析する。

4. 研究成果

(1) 膵癌手術症例におけるクラスリンアダプターの解析

膵癌手術症例 150 例について、クラスリンアダプター分子のひとつである AP-1 の発現を免疫組織染色で評価した(図 1)。免疫染色は AP-1 を構成するサブユニットの 1 つである - adaptin(AP1G1)に対する抗体を用いて染色した。症例を AP-1 の染色強度により 2 群に分け、生存率を含む臨床病理学的因子との関連を解析した。

その結果、AP-1 高発現群において、5 年全生存率が不良であった(生存期間中央値: 20.6 か月 vs 27.3 か月、 $p=0.016$ 、log-rank test)(図 2)。

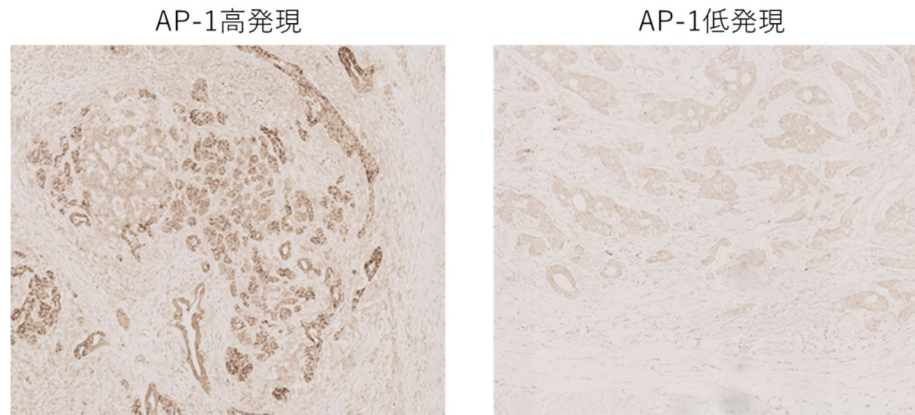


図 1. AP-1(γ -adaptin)の免疫組織染色
症例により AP-1 の染色強度に違いが見られた

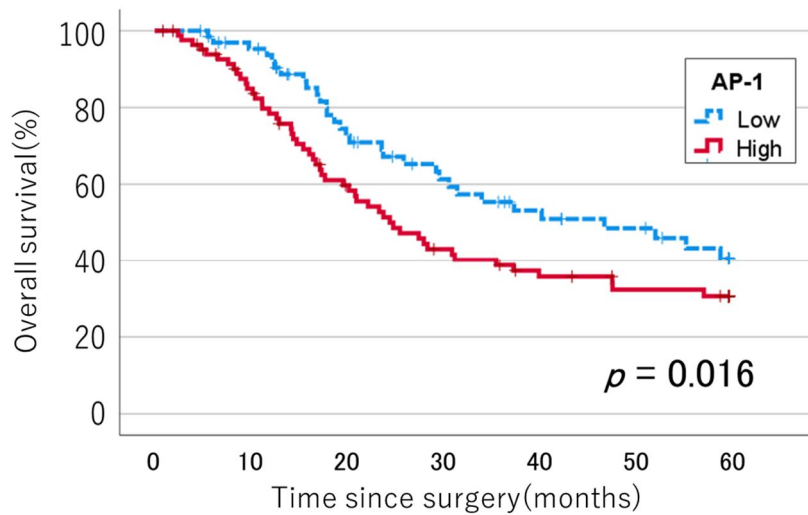


図 2. 生存曲線 (全生存率 : AP-1 高発現群 vs AP-1 低発現群)
AP-1 高発現群において全生存率は不良であった

(2) 膵癌細胞株における siRNA を用いた AP-1 の発現抑制と関連分子の発現解析

膵癌細胞株 (PANC-1、MIA PaCa2、PK-1、PK-45H、SUIT-2) に対して siRNA を用いた γ -adaptin の発現抑制を行い、Western blotting により関連分子の発現解析を行った。その結果、いずれの細胞株においても siRNA により γ -adaptin の発現が抑制され、EGFR の発現低下を認めた (図 3)。

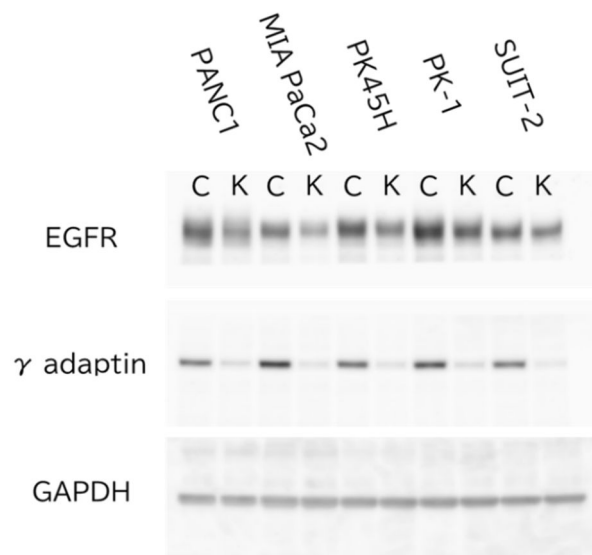


図 3. Western blotting によるタンパクの発現解析
膵癌細胞株において AP-1(γ -adaptin)の発現抑制により、EGFR の発現低下が認められた
C:Control, K:Knock down

(3) 今後の展望

本研究により、膵癌において AP-1 の発現が予後不良因子であり、また細胞株において AP-1 の発現抑制により EGFR の発現低下を引き起こすことが明らかとなった。このことから AP-1 は EGFR を介した腫瘍増殖に関連している可能性が示唆された。

今後は AP-1 の安定的な発現抑制のために、sgRNA を用いた CRISPR Cas9 技術による *-adatin* のノックアウトを行う。*-adaptin* のノックアウト細胞を Single cell cloning し、その細胞株を用いて *in vitro* で腫瘍特性の解析を行う。続いて同細胞株をマウスに移植し、*in vivo* での腫瘍増殖を解析する。一連の実験により AP-1 の発現低下と抗腫瘍効果が確認された場合、膵癌モデルマウスに対してスーパーアパタイトナノ粒子法を用いた siRNA の投与を行い、抗腫瘍効果の解析を行う予定である。

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