

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09036

研究課題名（和文）膵星細胞活性化遺伝子に着目した小胞体由来のオートファゴソーム膜起源の解明

研究課題名（英文）The origin of autophagosome derived from the endoplasmic reticulum with a focus on pancreatic stellate cell activation genes

研究代表者

坂井 寛 (SAKAI, Hiroshi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80611665

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）：膵癌は豊富な間質が特徴であり、膵癌細胞の増殖、転移、浸潤に重要な役割を果たしている膵星細胞（PSC）の活性化にオートファジーが関与しており、これを抑制すると膵癌の転移、浸潤が劇的に抑制されると考えられている。オートファジーの起源である隔離膜が小胞体から発生することが報告され、オートファジーと小胞体の関係が注目されている。本研究ではPSC活性化遺伝子のうち小胞体に関わる遺伝子ERAP2が小胞体のunfolded protein responseシグナル経路を介したオートファジー経路に関与し、ERAP2をノックアウトしたPSCが腫瘍増殖効果を抑制し、ゲムシタピンの抗腫瘍効果を増強することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は非常に予後不良な癌の1つであり、その浸潤、転移のメカニズムを解明することは新たな治療方法の開発に必須の課題である。本研究では小胞体関連遺伝子ERAP2がERストレス由来のオートファジーを介してPSCの活性化を制御していることを示し、ERAP2ノックアウトPSCの腫瘍抑制効果及びゲムシタピンの併用効果を示した。ERAP2がPSCの活性化を阻害する新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer is characterized by abundant stroma, of which pancreatic stellate cells (PSCs) are one component. Autophagy is involved in the activation of PSCs, which play an important role in the growth, metastasis, and invasion of pancreatic cancer cells. It has been reported that the isolation membrane, the origin of autophagy, originates from the endoplasmic reticulum (ER), and the relationship between autophagy and the ER has attracted attention. In this study, we showed that ERAP2, an endoplasmic reticulum-related gene among PSC activating genes, is involved in the autophagy pathway via the unfolded protein response signaling pathway in the endoplasmic reticulum, and that ERAP2 knockout PSCs suppress tumor growth effects and enhance the antitumor effect of gemcitabine. The results showed that ERAP2 knockout PSCs suppressed the tumor growth effect and enhanced the antitumor effect of gemcitabine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 膵星細胞 オートファジー 小胞体 隔離膜 新規治療薬 ERAP2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌では正常膵組織では活性化が抑制されている膵星細胞 (PSC) は癌組織内で活性化し、癌間質相互作用を介して癌細胞の浸潤、転移、さらには抗癌剤治療抵抗性を亢進している。オートファジーは代謝ストレスに対して細胞内の恒常性を維持するために必要なプロセスである。膵癌では、オートファジーの亢進は予後の悪化と相関しており、膵癌細胞に対するオートファジーの阻害はその増殖を抑制すると報告されている。我々は PSC の活性化にオートファジーが関与していることを解明し、PSC のオートファジー抑制が PSC の活性化を抑制し、膵癌の肝転移、腹膜播種を顕著に抑制することを報告した。オートファジーは隔離膜の形成に始まりオートファゴソームが形成される、この隔離膜がどこから発生するのかわからない。近年、隔離膜が小胞体とミトコンドリアの接触部位より形成され、小胞体から隔離膜が発生すると報告されており、オートファジーと小胞体との関係が注目されている。

2. 研究の目的

PSC 活性化に関わる遺伝子の中から小胞体関連遺伝子に着目し、隔離膜の発生、伸長に關与するオートファジー制御遺伝子を明らかにすることで、オートファジーにおける隔離膜の形成に小胞体がどのように關与するのかわかり、隔離膜形成を阻害する新たなオートファジー抑制剤を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

正常組織由来 PSC と膵癌由来 PSC との遺伝子発現を比較し、その中から小胞体に関わる遺伝子の同定

膵癌患者、慢性膵炎患者より得られる手術切除標本からそれぞれ膵癌由来の活性化ヒト PSC (M-PSC)、非癌組織由来の活性化ヒト PSC (N-PSC) を作成し、これらをマイクロアレイに提出し両者の遺伝子発現の違いを確認する。

遺伝子抑制による PSC 活性抑制の確認

スクリーニングで同定された PSC の遺伝子を抑制することで PSC の活性化が抑制されるかを評価する。PSC 活性化抑制の確認には活性化の指標である α -SMA 発現の抑制、脂肪滴の発現増加で行う。同定遺伝子はオートファジーも抑制する可能性があるためオートファジーの活性は LC-3 発現で行う。

遺伝子が隔離膜に与える影響の確認

PSC に対して遺伝子の抑制を行い、電子顕微鏡を用いて隔離膜を観察する。遺伝子抑制が隔離膜の発生に關与している場合、隔離膜の減少もしくはオートファゴソーム形成が減少すると考えられる。

遺伝子が PSC 及び膵癌の浸潤、転移に与える影響の確認

PSC に対して遺伝子の抑制を行い、PSC の機能低下および癌間質相互作用において膵癌細胞に与える影響を評価する。PSC が抑制されると FN や Collagen の分泌が抑制される。また、我々は過去に PSC の活性を抑制すると、IL6 の分泌が抑制され膵癌細胞の悪性度が低下することを報告しており、IL-6、FN、Collagen の低下がみられるかを検討する。また、PSC の増殖能の変化を評価、さらに癌細胞単独培養時に比べて PSC と癌細胞の共培養時に増強される癌細胞の浸潤能が抑制されるかを評価する。

膵臓癌マウスモデルを用いた PSC に対する遺伝子の抑制効果の検討

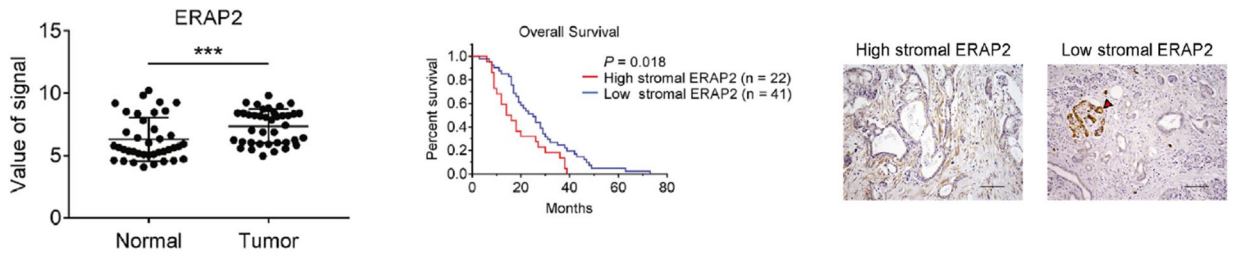
我々は免疫不全マウスに膵癌細胞、PSC の同所同時移植を行い、腫瘍の増殖、転移を確認するモデルを確立している。ルシフェラーゼ発現 SUIIT-2 膵癌細胞及び不死化 PSC を用いて、PSC+SUIIT-2 細胞、遺伝子抑制 PSC+SUIIT-2 細胞を膵に同所移植を行いその効果を検討する。なお、膵癌の増殖転移判定には癌細胞のみルシフェラーゼを発現していることを利用し、Ivis imaging system を利用する。これにより生きたまま癌細胞の挙動を体外からモニタリングをすることが可能である。

4. 研究成果

(1) 癌関連 PSC 特異的遺伝子の解析

手術切除標本から得られた膵癌組織由来の活性化ヒト PSC (M-PSC) と非膵癌組織由来の非活性化ヒト PSC (N-PSC) をマイクロアレイに提出し、遺伝子発現を比較した。M-PSC 特異的に発現する遺

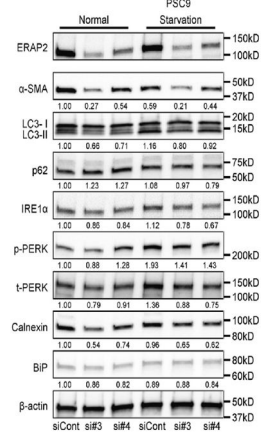
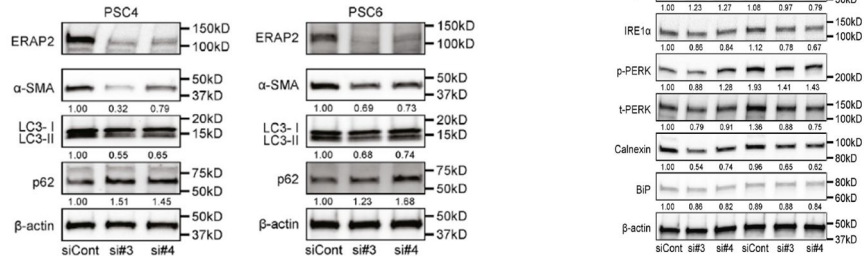
伝子を複数同定し、その中で小胞体関連遺伝子 ERAP2 に着目した。ERAP2 は腫瘍部で発現が亢進し、予後と相関がみられた。



(2) ERAP とオートファジーの関係

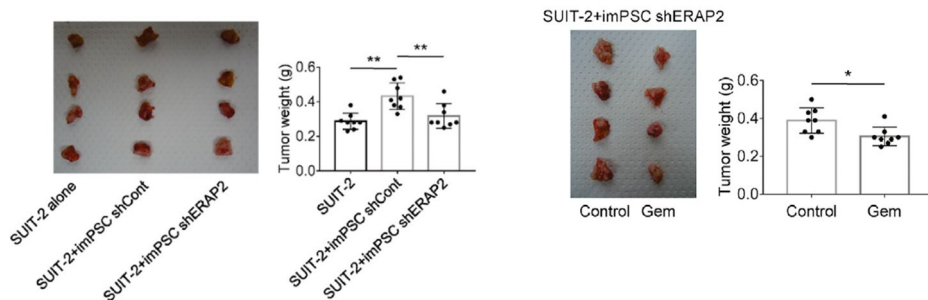
PSC と膵癌細胞 (PCC) の両者において、小胞体関連遺伝子の 1 つである遺伝子 ERAP2 を、siRNA のトランスフェクションを用いてノックダウンすると、LC3 の減少、p62 の増加を認め、PSC および PCC のオートファジーが阻害された。

また PSC において ERAP2 のノックダウンにより SMA の低下、脂肪滴の増加を確認し、ERAP2 のノックダウンが PSC の不活性化につながり、腫瘍と間質の相互作用が减弱したと考えられた。さらに小胞体ストレス誘導剤 tunicamycin を投与すると、ERAP2 をノックダウンした PSC では unfolded protein response (UPR) シグナル経路の IRE1 および PERK が減少したため、ERAP2 は小胞体の UPR シグナル経路を介したオートファジー制御に関与している可能性が示唆された。



(3) ERAP2 ノックダウン PSC は腫瘍増殖を抑制し、ゲムシタピンの効果を促進する

免疫不全マウスを用いた PSC と PCC の同所移植モデルにおいて、ERAP2 をノックダウンした PSC を PCC と共移植した場合、通常の PSC を共移植したコントロール群と比較して、腫瘍の形成が有意に抑制された。さらにゲムシタピンを投与すると ERAP2 のノックダウン群で腫瘍の増殖が有意に抑制され、ERAP2 のノックダウンにより膵癌組織の線維化を抑制し、ゲムシタピンの抗腫瘍活性を増強したと考えられた。



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 Guan Weiyu, Nakata Kohei, Sagara Akiko, Iwamoto Chika, Endo Sho, Matsuda Ryota, Matsumoto Sokichi, Ikenaga Naoki, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Onishi Hideya, Ohuchida Kenoki, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 22
2. 論文標題 ERAP2 is a novel target involved in autophagy and activation of pancreatic stellate cells via UPR signaling pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 9~19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pan.2021.09.012	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
研究分担者	江上 拓哉 (EGAMI Takuya) (40507787)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	久保 真 (KUBO Makoto) (60403961)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	中山 宏道 (NAKAYAMA Hiromichi) (80866773)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

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