

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08792

研究課題名（和文）肝胆膵領域癌におけるIRG1を介した抗炎症作用に基づく新規治療戦略

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategy based on IRG1-mediated anti-inflammatory effects in hepato-biliary-pancreatic cancer

研究代表者

吉住 有人 (Yoshizumi, Arihito)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：90895856

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）：肝内胆管癌においてTSPAN15高発現例では血管侵襲、リンパ節転移、血行性転移再発が増加しており、TSPAN15高発現は独立した予後不良因子であった。細胞実験ではTSPAN15はADAM10を細胞膜表面へ輸送してADAM10を活性化させ、ADAM10の働きによりNOTCH1の細胞内ドメインを分離することでNOTCH1を活性化し、癌幹細胞能を高めることが明らかになった。以上より、肝内胆管癌において、TSPAN15-ADAM10-NOTCH1シグナルは、腫瘍進展を促進する予後不良因子であり、同シグナルを標的とした新規治療の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NOTCH1の活性化により肝内胆管癌の悪性度が増強し、癌幹細胞能が高まり化学療法抵抗性が誘導されるが、NOTCH1を標的とした治療法はその重篤な副作用のために臨床応用に至っていない。今までTSPAN15はADAM10の作用を高めること、ADAM10はNOTCH1活性を亢進することが報告されていたが、肝内胆管癌におけるTSPAN15発現の意義は明らかではなかった。本研究によりTSPAN15がADAM10を介してNOTCH1を活性化し腫瘍進展を促進することが示されたためNOTCH1を標的とした新たな治療の発展が期待される

研究成果の概要（英文）：In intrahepatic cholangiocarcinoma, high TSPAN15 expression was an independent poor prognostic factor, as vascular invasion, lymph node metastasis, and hematogenous metastatic recurrence were increased in cases with high TSPAN15 expression. Cellular experiments revealed that TSPAN15 activates ADAM10 by transporting ADAM10 to the plasma membrane surface, and that ADAM10 activates NOTCH1 by separating the intracellular domain of NOTCH1, thereby enhancing cancer stem cell-like property. These results suggest that TSPAN15-ADAM10-NOTCH1 signaling is a poor prognostic factor that promotes tumor progression in intrahepatic cholangiocarcinoma, and that novel therapies targeting this signaling may be useful.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：TSPAN15 ADAM10 NOTCH1 EMT CSC-like property

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝胆膵領域癌は未だ予後不良であり、新たな分子標的治療の開発が急務である。我々は様々な肝胆膵領域癌において **STAT3**・**NF- κ B**・サイトカイン・ケモカインなどの炎症性シグナルは互いに連動して癌の増殖・転移・**stemness** に関与して悪性度を高めると報告してきたが、**STAT3** や **NF- κ B** などの炎症性転写因子シグナルは **cell survival** に必須であり、その完全抑制は個体死を惹起するため、これらの炎症関連因子を標的とした癌治療は臨床応用に至っていない。そこで炎症性シグナルを調節する新規標的因子として **Immune-responsive gene1 (IRG1)** に着目した。**IRG1** はイタコン酸や **ROS (Reactive Oxygen Species)** を介して抗炎症効果や抗菌効果をもたらすとされている。肝胆膵領域癌において **IRG1** と腫瘍悪性度の関連を評価した研究は存在せず、肝胆膵領域癌における **IRG1** 発現の意義を解明し、難治癌である肝胆膵領域癌に対する新規分子標的治療の開発を期待し研究を開始した。肝細胞癌において **IRG1** の発現と予後との相関性について研究を進めたが、発現の高低で予後に有意差は認められなかった。また、**IRG1** は **KEAP1-Nrf2** 経路や **NF- κ B** を介して抗炎症作用をもたらすと想定していたが、凍結保存検体 20 例の検討では **IRG1** 発現の高低と **Nrf2** や **NF- κ B** との相関は認めなかった。以上より、**IRG1** の抗炎症作用については、過去に報告は散見されるが、原発性肝がんの中では悪性度が高いとは言えない肝細胞癌においては有意な結果は認めなかった。

そこで次に、肝細胞癌と同様に原発性肝癌であるが、より悪性度が高いと考えられている肝内胆管癌について検討を行う方針とした。肝内胆管癌において我々は **Wnt-catenin** 系や **NF- κ B**、**NOTCH1** が抗炎症作用や腫瘍促進に働くことを過去に報告している。今回、**catenin** や **NF- κ B**、**NOTCH1** を介して抗炎症作用や腫瘍促進に働く可能性のある蛋白として **tetraspanin15 (TSPAN15)** に注目した。

2. 研究の目的

NOTCH1 の活性化により肝内胆管癌の悪性度が増強し、化学療法抵抗性が誘導されるが、**NOTCH1** を標的とした治療法はその重篤な副作用のために臨床応用に至っていない。**TSPAN15** は **ADAM10** の作用を高めること、**ADAM10** は **NOTCH1** 活性を亢進することが報告されているが、肝内胆管癌における **TSPAN15** 発現の意義は明らかではない。本研究は肝内胆管癌における **TSPAN15** 発現の意義および新規治療標的因子としての可能性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

2003 年から 2019 年の間に当施設で肝切除術を受けた 80 名の肝内胆管癌患者を対象とし、**TSPAN15**、**ADAM10** の発現を免疫組織化学染色・**western blot** にて評価した。腫瘍の

TSPAN15 の発現と臨床病理学的因子や予後との関連を検討した。**EMT** や浸潤能への影響を **Vimentin**・**E-cadherin** の発現にて評価した。さらには **CD133**・**CD44** 発現などを評価することで **TSPAN15** の **cancer stem cell-like property** やがん転移への関与を評価した。また、代表的な肝内胆管癌細胞株 (**HuCC1**・**HuH28**) を用いて **TSPAN15** を **siRNA knockdown** して、**cell lysate** 及び **nuclear extract** を抽出し、**western blot** にて前述の各因子を評価することで、**EMT** や **cancer stem cell-like property** への影響を評価した。さらには **western blot** や **flow cytometry** を用いて、**TSPAN15** を **siRNA knockdown** した際の細胞表面の **ADAM10** や **NOTCH1** の発現を評価した。また、肝内胆管癌において標準的な薬剤であるゲムシタピン、シスプラチンを用いて **Proliferation assay** を行い化学療法抵抗性について検討した。

そして **ADAM10 inhibitor** を用いた際にも **TSPAN15-ADAM10-NOTCH1** シグナルが抑制され化学療法抵抗性が改善することを示し、**TSPAN15-ADAM10-NOTCH1** シグナル抑制の分子標的治療としての可能性を追求した。

4. 研究成果

肝内胆管癌における **TSPAN15** 高発現症例では血管侵襲、リンパ節転移、血行性転移再発が増加しており、全生存率と無再発生存率共に有意に不良であった。多変量解析では、**TSPAN15** 高発現は独立した予後不良因子であった。臨床検体の免疫染色において **TSPAN15** 発現は代表的な間葉系のマーカーである **Vimentin** と正の相関を認め、上皮系のマーカーである **E-cadherin** とは負の相関を認めた。肝内胆管癌細胞株の **cell lysate** を用いて **western blot** を行うと、上記と同様に **Vimentin** は **Tspan15** 発現と正の相関を、**E-cadherin** は負の相関を示し、**scratch assay** や **3D culture** においても **TSPAN15** 高発現が遊走能増強や **EMT** の促進と関連していることが示された。また臨床検体の免疫染色において癌幹細胞能の代表的なマーカーである **CD133**、**CD44** の発現は **TSPAN15** 発現と正の相関を認めた。肝内胆管癌細胞株の **cell lysate** を用いた **western blot** でも同様に **CD133**、**CD44** の発現は **TSPAN15** 発現と正の相関を示し、**anoikis assay** においても **TSPAN15** 高発現が **anoikis** 抵抗性を増強して **apoptosis** を抑制して肝内胆管癌細胞の悪性度を高めていることが明らかとなった。

次に **TSPAN15** を **overexpression** または **knockdown** した際の **ADAM10** 発現を **western blot** および **flow cytometry** を用いて評価すると、**TSPAN15** の発現が変化しても **pro-ADAM10** (非活性型の **ADAM10**) 発現は変化しなかったが、細胞表面の **ADAM10** (活性型の **ADAM10**) の発現は、**TSPAN15 overexpression** で有意に増加、**knockdown** で有意に減少した。さらに肝内胆管癌細胞株において **TSPAN15** や **ADAM10** の **knockdown** を行った際の **NOTCH1** 発現を **western blot** を用いて評価すると、**NOTCH1** 活性と相関する核内の **NOTCH1** 細胞内ドメインの発現が有意に減少した一方で、**NOTCH1** 全体の発現は変化していなかった。

また、肝内胆管癌において標準的な薬剤であるゲムシタビン、シスプラチン（GC療法）に対する化学療法抵抗性を検討すると、**TSPAN15** を **knockdown** した肝内胆管癌細胞株において **GC** 療法の抗癌作用が増強していた。そして **ADAM10 inhibitor** を用いた際にも同様に **GC** 療法の抗癌作用が増強していた。

以上より、**TSPAN15** は **ADAM10** を細胞膜表面へ輸送して **ADAM10** を活性化させ、**ADAM10** の働きにより **NOTCH1** の細胞内ドメインを分離することで **NOTCH1** を活性化し、癌幹細胞能を高めることが明らかになった。**TSPAN15** の **knockdown** により **ADAM10** を介して **NOTCH1** の活性が低下することで、癌幹細胞能が減弱しゲムシタビンやシスプラチンに対する化学療法抵抗性が低下し、抗癌作用が増強された。同様の変化は **ADAM10** 阻害剤を用いた際にも観察された。**TSPAN15-ADAM10-NOTCH1** シグナルが抑制され化学療法抵抗性が改善することを示し、同シグナル抑制の分子標的治療としての可能性が示唆された。

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 Yoshizumi Arihito, Kuboki Satoshi, Takayashiki Tsukasa, Takano Shigetsugu, Takayanagi Ryosuke, Sonoda Itaru, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 43
2. 論文標題 Tspan15 ADAM10 signalling enhances cancer stem cell like properties and induces chemoresistance via Notch1 activation in ICC	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Liver International	6. 最初と最後の頁 2275 ~ 2291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/liv.15691	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉住有人, 久保木知, 高屋敷史, 高野重紹, 鈴木大亮, 酒井望, 細川勇, 三島敬, 小西孝宜, 西野仁恵, 仲田真一郎, 大塚将之
2. 発表標題 Tspan15は肝内胆管癌の予後不良因子であり, 化学療法抵抗性を誘導する
3. 学会等名 第21回消化器外科学会大会
4. 発表年 2023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	高屋敷 史 (Takayashiki Tsukasa) (30456024)	千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501)	
研究分担者	久保木 知 (Kuboki Satoshi) (50571410)	千葉大学・大学院医学研究院・特任教授 (12501)	
研究分担者	細川 勇 (Hosokawa Isamu) (60623676)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	酒井 望 (Sakai Nozomu) (70436385)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	
研究分担者	大塚 将之 (Ohtsuka Masayuki) (90334185)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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