

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15101
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2022
課題番号：21K16421
研究課題名（和文）細胞極性シグナルの破綻に伴うYAP/TAZ経路の活性化を介した膵癌進展機構の解明

研究課題名（英文）Disruption of cell polarity signaling promotes pancreatic cancer progression via activation of the YAP/TAZ pathway

研究代表者
花木 武彦（HANAKI, Takehiko）

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30788592
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：極めて難治癌である膵癌において、高血糖刺激による細胞極性制御蛋白(aPKC)の活性化と癌遺伝子であるYAP/TAZ経路の活性化を介した癌促進的な作用を検証することが本研究課題の目的である。膵癌の危険因子となっている肥満や糖尿病の癌に対する作用として、高血糖に注目し膵癌の進展との関連性を調べた報告は過去ないが、本研究課題によるメカニズム解明により、aPKCが膵癌制御における新たな分子標的となる可能性が示された。また、本研究課題で得られた知見は、膵癌以外の癌腫における進展機構の分子基盤の理解の深化につながることも期待され、臨床応用につながる可能性があるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題により、難治性膵癌における高血糖刺激による細胞極性制御蛋白の一つであるaPKCの異常な活性化と、これに伴うYAP/TAZシグナル経路を介した膵癌進展制御機構の一端を示した。高血糖刺激の持続、即ち糖尿病は、種々の癌の危険因子であることが知られているが、その詳細な関連は不明な点も多いというのが実際である。しかし、本研究課題で解明した知見は、今後の癌診療、研究の深化に寄与するものと思われる。またさらに研究が進むことで、aPKCを標的分子とする膵癌制御方法が見出されれば、膵癌の発生や進展に対する新たな予防・治療法の分子基盤の確立に貢献でき、医学界への波及効果も期待されるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：There are no previous reports about the effects of obesity and diabetes (risk factors for pancreatic cancer) on cancer -- focusing on hyperglycemia -- and exploring its relationship with the progression of pancreatic cancer. In the present study, we demonstrated a cancer-promoting effect of hyperglycemic stimulation on pancreatic cancer cells by activating the cell polarity control protein and the YAP/TAZ pathway. Other than pancreatic cancer, the findings are expected to contribute to a better understanding of the molecular basis of the carcinoma progression mechanism and may have the potential for clinical application.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 高血糖 糖尿病 aPKC 細胞極性 YAP/TAZ経路

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでに膵癌細胞で細胞極性制御蛋白の一つであるaPKC活性化によって細胞の増殖、浸潤・転移が惹起されることを報告した(Biochim Biophys Acta. 2016;1860:2404-2415)。ヒトの膵癌患者でのaPKC発現上昇は、予後不良因子であることが分かっており、その分子基盤の一つとしてaPKC活性化が関わると考えられている(Pancreatology.2013;13:360-8)。一方、膵癌の危険因子である、喫煙・肥満・糖尿病などの生活習慣が生体に対する共通した影響として「高血糖状態が持続」する点が挙げられるが、高血糖状態の持続と膵癌の発生・進展への関与、膵癌における高血糖状態の持続と

aPKCの活性化を介した膵癌進展の分子機構の解析は過去行われていなかった。高血糖刺激によって細胞極性の乱れが生じ細胞運動が亢進(Dev Cell.2010;17:35-48)するという報告や、aPKC活性化によって細胞極性の異常が惹起されるという報告(Am J Pathol.2015;185:958-68)と、予備的な実験から高血糖刺激により膵癌細胞でのaPKCの異常活性化が誘導されること、そして、この活性化と連動しEMTに関わるSnailの発現上昇が確認されること、

EMTの促進に関わるYAP/TAZ経路の活性化が確認されることを確認していたことから、これらの知見を考え合わせ、「膵癌細胞への高血糖刺激はaPKC活性化を誘導し、YAP/TAZ経路の活性化を介して膵癌の進展を惹起する(図1)」という作業仮説を想定した。

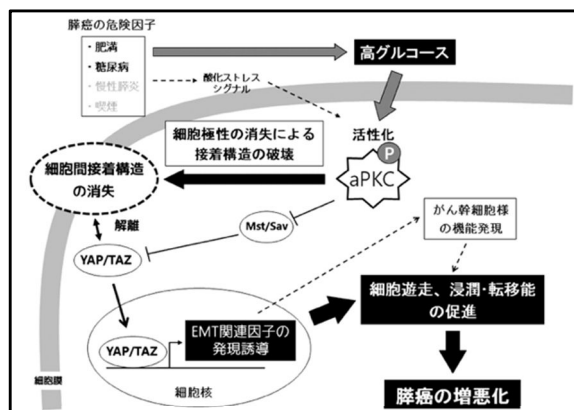


図1. 本研究課題で想定する膵癌進展機構シエーマ

2. 研究の目的

本研究課題は、「高血糖環境下で起こる aPKC の異常な活性化は、癌遺伝子 YAP/TAZ の活性化を介して膵癌細胞の進展を促進する」のか明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高血糖刺激による膵癌細胞株の表現系変化の検討

ヒト膵癌細胞株(Mia-PaCa2、Panc-1)を用いて、高血糖刺激(10mM,20mM)に伴う細胞の表現系変化として、「増殖」「遊走」「浸潤」能の変化を、それぞれ MTT assay・BrdU assay、Wound healing assay、Boyden chamber assay で評価、検討する。

(2) 高血糖刺激に伴う細胞内シグナル(PI3K-Akt系、YAP/TAZ系)活性化状況の検討

高血糖刺激に伴う細胞内シグナル経路(PI3K-Akt系)の変化と、その下流にあると想定している細胞極性制御タンパク aPKC の活性化状況、YAP/TAZ 経路の活性化状況を、Western blot にて検討する。加えて、高血糖刺激に伴う YAP/TAZ 経路の活性化を、YAP の定量およびリン酸化状況の評価、核内移行の状況を、核画分を作成した上で Western blot 法を用いて評価する。YAP の核内移行については、共焦点顕微鏡を使用して評価する。

(3) 高血糖刺激に伴う aPKC の活性化に対する抑制実験

上記(2)で評価する aPKC に対し、siRNA を用いた Knock-down を行なった上で、一連の表現系、細胞内シグナルの活性化状況の変化を解析、検討する。

4. 研究成果

(1) 高血糖刺激は、PI3K-Akt 経路活性化、aPKC 活性化、YAP の核内移行を惹起し、膵癌細胞の増殖、遊走、浸潤能を亢進させる

ヒト膵癌細胞株(Mia-PaCa2、Panc-1)に対する高血糖刺激(10mM, 20mM)の結果、有意な細胞増殖の亢進(MTT assay、BrdU assay)、遊走能の亢進(Wound healing assay)、浸潤能の亢進(Boyden chamber assay)が確認された。また、これらの変化の背景に、高血糖刺激依存的な PI3K-Akt 系の活性化(リン酸化 Akt の増多)、aPKC の活性化(リン酸化 aPKC の増多)が伴っていることが明らかとなった(図2、Western blot 法)。

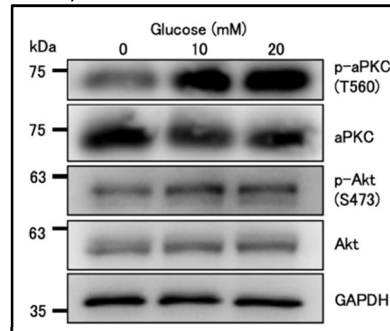


図2.高血糖刺激により PI3K-Akt 系と aPKC が活性化する

加えて、これらの細胞に対する高血糖刺激後に核分画のタンパク発現を解析したところ、がん遺伝子 YAP の核内移行が有意に促進されていることが確認され (図3、核分画に対する Western blot 法)、共焦点顕微鏡でも YAP の核内移行が促進されていることが明らかとなった。

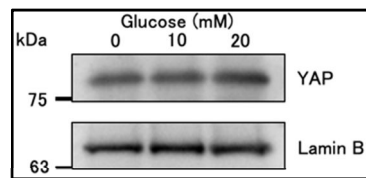


図3.高血糖刺激により YAP の核内移行が促進される

(2) 高血糖刺激は、aPKC の活性化を介して膵癌細胞の増殖、遊走、浸潤能を亢進させる

高血糖刺激による一連の変化が、aPKC の活性化を介して生じたものかを確認するため、siRNA 法による aPKC の Knock-down を行なった。aPKC を siRNA した膵癌細胞株に対して高血糖刺激を与えたところ、PI3K-Akt 系の活性化は確認できたものの、高血糖刺激で誘導された細胞増殖、遊走、浸潤能の亢進が、有意に抑制されることがわかった。また、高血糖刺激により促進された YAP の核内移行も有意に抑制されることが判明した(図4、蛍光免疫染色、共焦点顕微鏡観察)。

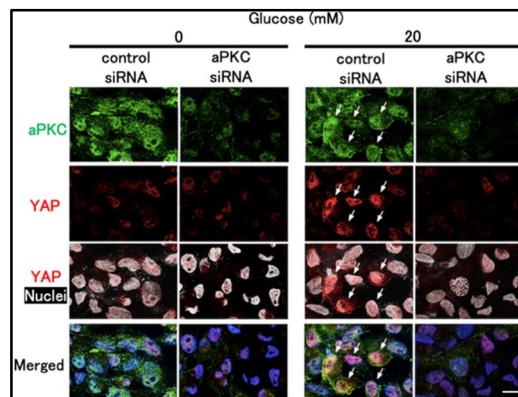


図4.高血糖刺激による YAP の核内移行は、aPKC の knockdown で抑制される

以上の結果から、難治性膵癌における高血糖刺激による細胞極性制御蛋白の一つである aPKC

の異常な活性化と、これに伴うがん遺伝子 YAP の活性化を介した膵癌進展制御機構のメカニズムの一端を示すことができた。高血糖刺激の持続、即ち糖尿病は、種々の癌の危険因子であるが、その詳細な関連は不明な点も多い。本研究課題で解明した知見は、今後の癌診療、研究の深化に寄与するものと思われ、またさらに研究が進むことで、aPKC を標的分子とする膵癌制御方法が見出されれば、膵癌の発生や進展に対する新たな予防・治療法の分子基盤の確立に貢献でき、医学界への波及効果も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takehiko Hanaki, Teppei Sunaguchi, Keisuke Goto, Masaki Morimoto, Yuki Murakami, Yuji Shishido, Kozo Miyatani, Kyoichi Kihara, Tomoyuki Matsunaga, Manabu Yamamoto, Naruo Tokuyasu, Teruhisa Sakamoto, Toshimichi Hasegawa, Yoshiyuki Fujiwara	4. 巻 42(4)
2. 論文標題 The Significance of Surgical Intervention for Metasynchronous Liver Metastasis in Gastric Cancer: A Single-centre Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2177-2184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15700	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 Takuki Yagyu, Takahito Ohira, Ryutaro Shimizu, Masaki Morimoto, Yuki Murakami, Takehiko Hanaki, Kyoichi Kihara, Tomoyuki Matsunaga, Manabu Yamamoto, Naruo Tokuyasu, Teruhisa Sakamoto, Yoshiyuki Fujiwara, Hiroyuki Kugoh	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Human chromosome 3p21.3 carries TERT transcriptional regulators in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 15355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94711-6.	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 EI Uchinaka, Tomohiko Sakabe, Takehiko Hanaki, Naruo Tokuyasu, Teruhisa Sakamoto, Soichiro Honjo, Yoshiyuki Fujiwara, Yoshihisa Umekita	4. 巻 41(5)
2. 論文標題 Cytoplasmic-only Expression of Maspin Predicts Unfavorable Prognosis in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2543-2552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15032.	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 Takehiko Hanaki, Teruhisa Sakamoto, Shinsaku Yata, Yuki Murakami, Yoshiyuki Fujiwara	4. 巻 13(2)
2. 論文標題 Successful Interventional Radiology for Acute Median Arcuate Ligament Syndrome After Pancreaticoduodenectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e13540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7759/cureus.13540.	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 Hanaki Takehiko, Sunaguchi Teppei, Goto Keisuke, Morimoto Masaki, Murakami Yuki, Tokuyasu Naruo, Takano Shuichi, Sakamoto Teruhisa, Hasegawa Toshimichi, Fujiwara Yoshiyuki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Laparoscopic cholecystectomy after percutaneous transhepatic gallbladder drainage for acute cholecystitis in a patient with a left ventricle assist device: a case report and brief review of the literature (with video)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Case Report	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/ccr3.5800	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 花木 武彦, 本城 総一郎, 砂口 天兵, 後藤 圭佑, 森本 昌樹, 村上 裕樹, 徳安 成郎, 坂本 照尚, 長谷川 利路, 藤原 義之
2. 発表標題 肝膿瘍を随伴し術前診断が困難であった胆管周囲嚢胞を伴った混合型肝癌の1例
3. 学会等名 第57回 日本胆道学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花木武彦, 砂口天兵, 後藤圭佑, 森本昌樹, 村上裕樹, 徳安成郎, 高野周一, 坂本照尚, 長谷川利路, 藤原義之
2. 発表標題 ICG全身投与後の近赤外線観察による肝切除後胆汁漏出検出能の検討
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takehiko Hanaki, Teruhisa Sakamoto, Keisuke Goto, Yuki Murakami, Naruo Tokuyasu, Soichiro Honjo, Yoshiyuki Fujiwara
2. 発表標題 Successful interventional radiology for acute median arcuate ligament syndrome after pancreaticoduodenectomy
3. 学会等名 第33回 日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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