

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293287

研究課題名(和文)オートファジー制御に基づく癌微小環境因子解明と新規DDSを用いた難治癌治療開発

研究課題名(英文) Refractory cancer therapy development by cancer microenvironment elucidation and new drug delivery system based on autophagy

研究代表者

永井 英司 (NAGAI, Eishi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30264021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌において、線維芽細胞や細胞外マトリックスから構成される癌微小環境は癌の浸潤、転移、薬剤治療抵抗性に重要な役割を果たしている。発癌や癌の進展に大きく関与していることが示されてきたオートファジーと癌微小環境の関与を研究した。膵癌切除切片から樹立した膵星細胞のオートファジーが正常線維芽細胞と比較して亢進していることを発見した。また、膵星細胞のオートファジーを抑制すると、間接共培養下の膵癌細胞の浸潤能と遊走能が低下することを報告した。さらにオートファジーの主要な誘導因子の一つである低酸素環境が、膵星細胞の産生する細胞外基質のリモデリングを通して、膵癌細胞の遊走を促進することを報告した。

研究成果の概要(英文)：In pancreatic cancer, cancer microenvironment composed of fibroblasts and extracellular matrix play an important role in invasion, metastasis, and anti-cancer drug resistant. We studied relationship of cancer microenvironment and autophagy that has been shown greatly involved in the carcinogenesis and progress of cancer.

We found that autophagy of pancreatic stellate cells established from pancreatic cancer resections are enhanced compared to normal fibroblasts. Further, we reported that suppressing autophagy of pancreatic stellate cells decreased invasion and migration ability of pancreatic cancer cells in the indirect co-culture with pancreatic stellate cells. In addition, we reported that hypoxia, which is one of the major inducer of autophagy, promoted the migration of pancreatic cancer cells through the remodeling of extracellular matrix produced by pancreatic stellate cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オートファジー 癌微小環境 膵臓癌

#### 1. 研究開始当初の背景

膵癌において、線維芽細胞、細胞外マトリックスから構成される癌微小環境は癌の浸潤、転移、薬剤治療抵抗性に重要な役割を果たしている。

オートファジーは細胞の自己成分である細胞内小器官をリソソーム内に取り込み、分解する細胞代謝機構に重要な役割を果たしている。発癌や癌の進展にも大きく関与していることが示されてきたが、これまでのオートファジーと癌の研究は癌細胞に着目しているものが殆どであり、癌微小環境との関連に関する報告は殆どない。

#### 2. 研究の目的

本研究では、オートファジーと癌微小環境の関係を調べ、新規癌微小環境制御システムに基づいた治療法を開発する事である。

#### 3. 研究の方法

(1) 膵癌患者より得られる手術切除標本を用いて、Bachem や Apte らにより報告された方法(Bachem, Gastroenterology, 1998, Apte, Gut, 1998)によりヒト膵星細胞株を作成する。また作成した細胞株が、膵星細胞の特徴とされる Myofibroblast 様の形態を呈し、 $\alpha$ -SMA が陽性であることを確認する。さらに Vimentin や CD90 が陽性であること、CK19 が陰性であることを免疫染色で確認する。

(2) 膵癌切除切片から樹立した膵星細胞と癌疾患ではない切除膵から樹立した膵星細胞のオートファジー活性を比較する。オートファジー活性は、Microtubule-associated protein light chain 3(LC3)抗体を用いた Western blotting を用いて比較を行う。

(3) 膵星細胞との共培養によって、膵癌細胞の浸潤能や遊走能が亢進することを我々は報告してきた。膵星細胞のオートファジーを抑制した時に、この膵星細胞が膵癌細胞に与える影響がどのように変化するかをオートファジー抑制薬のクロロキンをを用いて検討する。

(4) オートファジー必須遺伝子である Atg5 や Atg7 を膵星細胞でノックダウンし、その影響を検討する。クロロキンを行った膵癌細胞の浸潤能や遊走能へ膵星細胞が与える影響がどのように変化するかを検討する。

(5) オートファジーの主要な誘導因子の一つである低酸素環境を検討する。膵星細胞が作り出す細胞外基質は、低酸素状態によってどのように変化するかを、膵星細胞の 3D 培養によって得られた細胞外基質の蛍光免疫染色によって検討する。

(6) さらに膵星細胞の 3D 培養によって得られた細胞外基質の低酸素状態による変化が、膵癌細胞の運動能に与える影響を、タイムラプスイメージングとその統計解析によって検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 膵癌患者より得られる手術切除標本を用いて、30 種類以上のヒト膵星細胞株を作成した。また作成した細胞株が、膵星細胞の特徴とされる Myofibroblast 様の形態を呈し、 $\alpha$ -SMA が陽性であることを確認した。さらに Vimentin や CD90 が陽性であること、CK19 が陰性であることを免疫染色で確認した。

$\alpha$ -SMA や Vimentin, CD90 はネガティブコントロールとして膵癌細胞株を用いた。同様に CK19 のポジティブコントロールとして、膵癌細胞株を用いた。

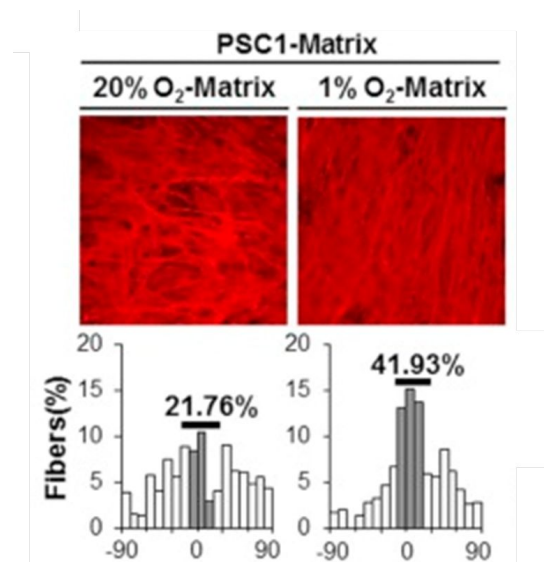
(2) 膵癌切除切片から樹立した膵星細胞を 6 種類、慢性膵炎の切除膵から樹立した膵星細胞を 2 種類、正常ヒト線維芽細胞として MRC-5 細胞(ヒト胎児肺線維芽細胞)の計 9 種類の細胞から、蛋白質を採取して、オートファジー活性を比較した。オートファジー活性は、Microtubule-associated protein light chain 3(LC3)抗体を用いた Western blotting を用いて比較した。比較検討は、ホスファチジルエタノールアミンが付加された膜結合型である LC3- のタンパク量で行った。膵癌切除切片から樹立した膵星細胞は、慢性膵炎切除組織から樹立した膵星細胞やヒト胎児肺線維芽細胞と比較して、LC3- 蛋白質のレベルが著明に高かった。この結果から、膵癌周囲の活性化された膵星細胞は、慢性膵炎や正常組織に存在する線維芽細胞と比較して、オートファジー活性が高いことが示唆された。

(3) いままで我々が報告してきた、膵星細胞との共培養によって、膵癌細胞の浸潤能や遊走能が亢進することは、今回の検討でも確認された。膵星細胞のオートファジーを抑制した時に、この膵星細胞が膵癌細胞に与える影響がどのように変化するかをオートファジー抑制薬のクロロキンをを用いた。膵星細胞との間接共培養で著明に亢進した膵癌細胞の浸潤能・遊走能は、クロロキン投与によって有意に減弱した。さらに膵癌細胞単独での浸潤能・遊走能にクロロキンをどのように作用するかも検討した。我々が行った膵星細胞との間接共培養の実験と同じ細胞数や観察時間での検討では、膵癌細胞の浸潤能・遊走能にクロロキンは影響しなかった。

(4) RNA 干渉によって、オートファジー必須遺伝子である Atg5 や Atg7 を膵星細胞でノックダウンし、標的遺伝子のノックダウンを mRNA および蛋白質のレベルで確認した。またホスファチジルエタノールアミンが付加された膜結合型である LC3- のタンパク量が低下していることを western blotting で確かめ、膵星細胞のオートファジーが抑制されていることを確認した。クロロキン添加による実験と同様に、膵星細胞との間接共培養で著明に亢進した膵癌細胞の浸潤能・遊走能は、膵星細胞のオートファジー抑制によって有意に減弱した。これらの結果から、膵星細胞のオートファジーは、癌間質相互作用を介し

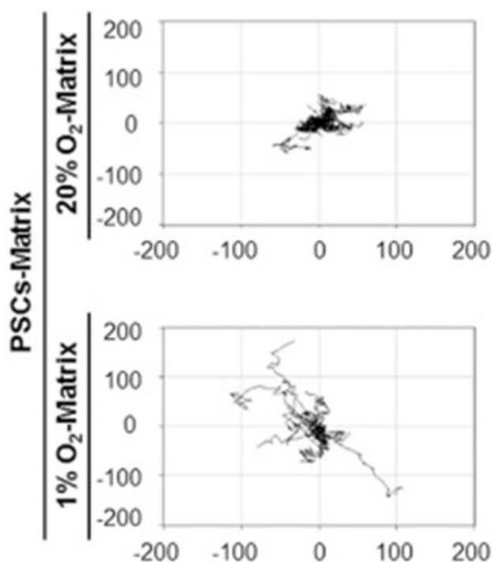
て、膵癌の浸潤や遊走に關与している可能性が示唆された。

(5) 膵星細胞の3D培養によって得られた細胞外基質をフィブロネクチンの蛍光免疫染色によって評価した。オートファジーの主要な誘導因子の一つである低酸素環境によって、膵星細胞が作り出す細胞外基質は、より平行に変化した。(図1)



**図1：膵星細胞の3D培養によって得られた細胞外基質。低酸素環境での培養によって、線維方向がより平行となった。**

(6) 膵星細胞の3D培養によって得られた細胞外基質の低酸素状態による変化が、膵癌細胞の運動能に与える影響を、タイムラプスイメージングとその統計解析によって検討した。低酸素環境での3D培養から得られた細胞外基質では、正常酸素下と比較して、膵癌細胞の移動距離が有意に長くなった。(図2) 膵癌細胞の移動速度自体は変化していないことから、この移動距離の増加は移動方向の影響によるものであると考えられた。



**図2：細胞外基質内での膵癌細胞の運動軌跡。低酸素環境で膵星細胞に産生された細胞外基質の方が、膵癌細胞の移動距離が長くなった。**

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Aishima S, Oda Y, Nagai E, Tanaka M, Micro RNA-373 is Down-regulated in Pancreatic Cancer and Inhibits Cancer Cell Invasion, *Ann Surg Oncol*, 査読有, 21, S564-S574, 2014, DOI: 10.1245/s10434-014-3676-8.

〔学会発表〕(計 13件)

肥川和寛, 大内田研宙, 佐田政史, 阿部俊也, 遠藤翔, 奥村隆志, 堀岡宏平, 森山大樹, 宮坂義浩, 真鍋達也, 大塚隆生, 大内田理一, 植木隆, 永井英司, 水元一博, 中村雅史, 膵星細胞を標的とした治療薬に関するスクリーニングの系の構築をすすめる, 第116回日本外科学会定期学術集会, 2016.4.16、大阪市

堀岡宏平, 大内田研宙, 佐田政史, 鄭彪, 千々岩芳朗, 吉田真樹, 奥村隆志, 遠藤翔, 阿部俊也, 肥川和寛, 大塚隆生, 植木隆, 永井英司, 水元一博, 小田義直, 中村雅史, 膵癌におけるCD51発現は予後と相関する, 第116回日本外科学会定期学術集会, 2016.4.16、大阪市

吉田真樹, 宮坂義浩, 大内田研宙, 遠藤翔, 阿部俊也, 肥川和寛, 巖子龍, 千々岩芳朗, 奥村隆志, 佐田政史, 堀岡宏平, 鄭彪, 森山大樹, 真鍋達也, 大塚隆生, 植木隆, 永井英司, 水元一博, 中村雅史, 癌と間質を同時に標的とするカルパイン阻害薬カルペプチンの膵癌に対する治療効果の検討, 第116回日本外科学会定期学術集会, 2016.4.16、大阪市

佐田政史, 大内田研宙, 阿部俊也, 遠藤翔, 肥川和寛, 奥村隆志, 千々岩芳朗, 吉田真樹, 堀岡宏平, 森山大樹, 宮坂義浩, 大塚隆生, 植木隆, 永井英司, 水元一博, 小田義直, 中村雅史, 低酸素下膵星細胞による癌間質マトリックス・リモデリングは膵癌浸潤能を増強する, 第116回日本外科学会定期学術集会, 2016.4.16、大阪市

遠藤翔, 仲田興平, 大内田研宙, 阿部俊也, 肥川和寛, 奥村隆志, 佐田政史, 堀岡宏平, 水内祐介, 大塚隆生, 植木隆, 永井英司, 水元一博, 小田義直, 中村雅

史、膵癌の癌関連線維芽細胞におけるオートファジーの役割、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016.4.16、大阪市

阿部俊也、大内田研宙、遠藤翔、肥川和寛、千々岩芳朗、吉田真樹、奥村隆志、堀岡宏平、佐田政史、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、膵癌腹膜播種形成を導く腹膜中皮細胞の新たな役割～防御から促進へ～、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016.4.16、大阪市

奥村隆志、大内田研宙、武居晋、中山宏道、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、千々岩芳朗、吉田真樹、鄭彪、佐田政史、堀岡宏平、森山大樹、三好圭、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、膵周囲脂肪組織は膵癌細胞の遊走・浸潤能を増強し、局所浸潤に関与する、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016.4.16、大阪市

巖子龍、大内田研宙、鄭彪、堀岡宏平、佐田政史、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、遠藤翔、肥川和寛、阿部俊也、中山宏道、武居晋、森山大樹、宮坂義浩、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、膵癌における CD110 の臨床的意義と癌進展におけるその役割、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016.4.16、大阪市

Koikawa K, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Horioka K, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Ohuchida R, Ueki T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M, Pancreatic Stellate Cells Lead and Promote the Local Invasion of Cancer Cells, by Physically Remodeling the Extracellular Matrix with Collagen Fiber Alignment in Pancreatic Cancer. American Pancreatic Association 46th Annual Meeting, 2015.11.4, San Diego (USA)

Horioka K, Ohuchida K, Sada M, Zheng B, Ohtsuka T, Ueki T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Suppression of CD51 in Pancreatic Stellate Cells Inhibits Tumor Growth by Reducing Stroma and Altering Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer, American Pancreatic Association 46th Annual Meeting., 2015.11.4, San Diego(USA)

佐田政史、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、堀岡宏平、水内祐介、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、高畑俊一、植

木隆、永井英司、水元一博、小田義直、中村雅史、田中雅夫、低酸素誘導性 LOX による癌間質リモデリングが膵癌浸潤能に与える影響の検討、JDDW2015 第 23 回 消化器関連学会週間 2015.10、東京都

奥村隆志、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、千々岩芳朗、吉田真樹、佐田政史、堀岡宏平、真鍋達也、大塚隆生、高畑俊一、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、田中雅夫、脂肪組織由来幹細胞は膵癌細胞の遊走・浸潤を促進し悪性度に関与する、JDDW2015 第 23 回 消化器関連学会週間 2015.10、東京都

肥川和寛、佐田政史、大内田研宙、阿部俊也、遠藤翔、真鍋達也、大塚隆生、高畑俊一、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、田中雅夫、膵癌細胞の浸潤機序-浸潤を先導する leading cells の同定・解析-、JDDW2015 第 23 回 消化器関連学会週間 2015.10、東京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永井 英司 (NAGAI, Eishi)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：30264021

### (2) 研究分担者

田中 雅夫 (TANAKA, Masao)  
九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30163570  
(2013年度)

前山 良 (MAEYAMA, Ryo)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：10611668

大内田 研宙 (OHUCHIDA, Kenoki)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：20452708

仲田 興平 (NAKATA, Kohei)  
九州大学・大学病院・特別教員  
研究者番号：30419569

宮坂 義浩 (MIYASAKA, Yoshihiro)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号：40507795

当間 宏樹 (TOMA, Hiroki)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：80437780

(3)連携研究者

なし