

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462127

研究課題名(和文) 膵癌におけるNestinのリン酸化制御による抗腫瘍効果の検討

研究課題名(英文) Inhibition of nestin phosphorylation in pancreatic cancer cells

研究代表者

松田 陽子 (Matsuda, Yoko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：20363187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸化nestinの発現を分裂期の膵癌細胞に認め、その発現は細胞増殖と関連した。2カ所のリン酸化部位について1カ所ずつあるいは両方のリン酸化を阻害するベクターを膵癌細胞に遺伝子導入した。その結果、それぞれ1カ所ずつのリン酸化を抑制すると細胞増殖が抑制され、細胞遊走、浸潤は亢進した。一方、両方のリン酸化を抑制すると、細胞遊走、浸潤が抑制され、マウス肝転移が抑制された。Nestinのリン酸化を制御するタンパク質として、cyclin dependent kinases, AKT, Auroraが同定された。以上より、リン酸化nestinの制御は膵癌の治療標的として有用な可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the roles of phosphorylated nestin in pancreatic cancer cells. We found nestin phosphorylation in mitotic phase of human pancreatic cancer cells. Nestin phosphorylation was correlated with MIB-1 index in human pancreatic cancer tissues. Transfection of pancreatic cancer cells with nestin mutated at one phosphorylation site inhibited cell growth. Transfecting cells with wild-type nestin or with nestin mutated at one site increased migration and invasion. In addition, transfection with nestin mutated at two phosphorylation sites inhibited migration, invasion, and liver metastases. Nestin phosphorylation at these two sites was decreased upon treatment with inhibitors for cyclin dependent kinases, AKT, and Aurora. Inhibiting nestin phosphorylation at these two sites may represent a novel therapeutic strategy for pancreatic cancer.

研究分野：消化器病理

キーワード：膵癌 nestin 幹細胞 細胞骨格 リン酸化 浸潤 転移 増殖

1. 研究開始当初の背景

膵癌は5年生存率が約6%と極めて予後不良の疾患である。その原因として診断時にはすでに遠隔転移をきたしており外科的切除が不能な症例が多く、そのような切除不能例に対する有効な治療法がないことが挙げられる。そのため、現在、膵癌の新規治療法の開発が世界的に待ち望まれている。これまでに我々は、中間径フィラメントタンパク質である nestin について、膵癌の治療標的としての有用性を検討してきた。Nestin は、神経上皮幹細胞で発現が報告された Class VI に分類される中間径フィラメントの一つで、現在では神経幹細胞のマーカーとして広く知られるようになった。Nestin の発現は神経系だけでなく、筋肉、精巣、歯、膵臓、心臓、血管の前駆細胞での発現が確認されており、膵臓では膵外分泌細胞の幹細胞マーカーである。

腫瘍分野では、中枢神経系腫瘍、特に神経膠芽腫や、皮膚の悪性黒色腫、消化管間質腫瘍、乳癌、前立腺癌での nestin 発現が報告され、nestin 発現と悪性度、遊走、浸潤、転移との関連が報告されている。これまでに我々は、浸潤性膵管癌の約30%の症例で nestin の発現を認め、その発現が膵癌の神経浸潤、及び切除断端浸潤と関連することを報告した (Kawamoto M, et al., Human Pathol, 2009)。さらに、膵癌転移モデルを用いた動物実験において nestin 発現を抑制することで、著明に膵癌の浸潤、転移を抑制することが可能なことを明らかにした(Matsuda Y, et al., Cancer Biol Ther, 2011)。

悪性黒色腫および神経膠芽腫において、nestin は癌幹細胞マーカーの一つとして報告されている。癌幹細胞を培養する方法として一般的に用いられているスフェア形成法を行ったところ、膵癌細胞のスフェアにおいて非スフェア細胞と比べて nestin の発現の亢進を認めた。さらに short hairpin RNA

(shRNA)を用いて nestin の発現を抑制した膵癌細胞ではスフェア形成能が抑制され、マウス皮下移植における腫瘍形成能も抑制されることが明らかとなった(Matsuda Y, et al., 2012, American Association for Cancer Research, AACR)。近年の報告で、癌幹細胞は癌の上皮間葉転換 (EMT) において中心的な役割を担っていることが明らかにされていることから、nestin は膵癌において癌幹細胞の機能性制御を介して、それによって癌の浸潤・転移を抑制する可能性がある。

一方で、nestin は様々な腫瘍組織の新生血管、特に高い増殖能を有する血管内皮細胞において高発現を示す (Matsuda Y, et al., World J Gastroenterol, Review, 2013)。腫瘍新生血管は癌の増殖、浸潤、転移を直接的に制御する重要な微小環境を構成すると考えられており、ベバシズマブ等の vascular endothelial growth factor モノクローナル抗体が腫瘍新生血管を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することが臨床的に明らかとなっている。これまでに我々は、増殖能が高く、血管径の細い膵癌の新生血管においても nestin が高発現し、マウス皮下腫瘍モデルを用いて nestin に対する small interfering RNA (siRNA)を投与すると腫瘍新生血管の形成が抑制されるとともに、皮下腫瘍の腫瘍体積が抑制されることを報告した (Yamahatsu K, et al., Int J Incol, 2012)。

これらの結果より、nestin を抑制することで、膵癌の癌幹細胞および新生血管形成を抑制することが可能であり、膵癌の治療標的として有用であると考えた。Nestin は vimentin, cyclin dependent kinase 5 (cdk5), cdc2 と直接結合してこれらのタンパク質のリン酸化を調節し、細胞周期を制御する (Sahlgren CM, et al., Mol Cell Biol, 2003)。さらに、cdk5, cdc2 は、ラット nestin タンパク質のアミノ酸 316 および 1495 をリン酸化させ、nestin の活性化を制御することが報告され

ている。以上より、膵癌における nestin のリン酸化を抑制することで nestin の活性化、および機能を効果的に抑制することが可能になるのではないかと仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、nestin のリン酸化制御による新たな膵癌治療法の開発の基礎的情報の獲得である。

ラットの神経細胞や筋細胞において nestin のリン酸化が報告されているが、腫瘍における nestin リン酸化の意義は報告がない。様々な腫瘍や癌幹細胞で高発現する nestin におけるリン酸化が癌幹細胞の機能にどのような影響を与えるのか解明できれば、新たな分子標的治療の開発、特に癌幹細胞を標的とした治療に応用出来る可能性があり、その影響は広範囲に波及する。

また、グリベックやイレッサ等のリン酸化酵素阻害剤は癌の分子標的治療薬として、臨床効果が実証済みであるが、臨床応用可能な nestin の阻害方法は確立していない。本研究で、様々な細胞内シグナル系に対する阻害剤の影響をスクリーニングすることで、nestin の機能を阻害するための新たな方法の開発につながるものと考えられる。本研究成果を難治性の膵癌における新規分子標的治療に応用することを目指す。

3. 研究の方法

(1) Nestin 及びそのリン酸化タンパク質の細胞内局在性と細胞周期との関連の解明: 2ヶ所の nestin リン酸化部位を標識可能な抗体を用いた。ヒト膵癌培養細胞株 PANC-1, MIAPaCa-2, KLM-1, PK-8 を用い、蛍光染色にて、nestin タンパク質、及びリン酸化 nestin の発現の細胞内局在を確認した。次に、nestin 発現と細胞周期との関連をリン酸化ヒストンタンパク質等の細胞分裂期タンパク質との二重染色によって解析した。また、

フローサイトメトリー法にて、細胞周期とリン酸化 nestin の発現を解析した。

(2) ヒト膵癌組織におけるリン酸化 nestin の発現と細胞増殖との関連の解明: ヒト膵癌手術検体 30 例のパラフィンブロックを用い、免疫染色にて Nestin、リン酸化 nestin、及び細胞増殖マーカーである MIB1 の発現を解析した。

(3) ヒト膵癌培養細胞における nestin リン酸化抑制の in vitro での検討: DSRed-Express2-N1 vector を用い、ヒト nestin のリン酸化部位の塩基配列のそれぞれ 1ヶ所と両方を変異させ、該当箇所のリン酸化しない変異 nestin を組み込んだ発現ベクター、及び wild type の nestin 発現ベクターを作成した。変異のない通常の nestin 発現ベクターと、変異 nestin 発現ベクターを、nestin 発現の少ない膵癌培養細胞に遺伝子導入し、リン酸化を抑制した際の細胞増殖、遊走、浸潤、細胞形態の変化について比較検討した。

(4) ヒト膵癌細胞における nestin リン酸化抑制の in vivo での検討: リン酸化しない変異 nestin を導入した膵癌細胞の腫瘍形成能、転移能について検討した。6 週令の NOD/Shi-scid, IL-2R^{null} (NOG) マウスを用い、 1×10^5 cells のヒト膵癌細胞を脾臓内に注射した。その後形成された肝転移病巣の程度について、それぞれのベクターを導入した細胞で比較検討した。

(5) 膵癌細胞における nestin リン酸化機構の解明: 細胞内シグナル阻害剤キット (化学療法基盤支援活動供与) を用いて、nestin のリン酸化を抑制する細胞内シグナル伝達系を検討した。今回用いた阻害剤キットは EGFR, TGF, CDK, MAPK, FGFR, VEGFR と

いった主要な癌関連シグナルを阻害するものである。

(6) 統計解析：StatView J version 5.0 を用い、データを統計解析した。P < 0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) Nestin 及びそのリン酸化タンパク質の細胞内局在性と細胞周期との関連の解明：蛍光染色にて、ヒト膵癌培養細胞におけるリン酸化 nestin の発現の局在を検討した。Nestin は細線維状構造を示し、細胞質内にびまん性に発現を認め、核における発現は明らかでなかった。一方、リン酸化 nestin は、核に強い発現を認めた。リン酸化ヒストンタンパク質との二重染色により、これらのリン酸化 nestin は細胞分裂期の癌細胞の核に強い発現を認めることが明らかになった。

また、フローサイトメトリーによる検討でも同様に、リン酸化 nestin は細胞分裂期の細胞に強く発現することが確認できた。

(2) ヒト膵癌組織におけるリン酸化 nestin の発現と細胞増殖との関連の解明：ヒト膵癌組織検体で、リン酸化 nestin の発現を確認したところ、同様に癌細胞の核に発現を認めた。一方、nestin タンパク質は癌細胞の細胞質に発現を認めた。リン酸化 nestin の膵癌組織での発現は細胞増殖マーカーである MIB1 index と正の相関を示した。リン酸化 nestin の発現の程度は、膵癌の組織型や進行度とは関連を示さなかった。

(3) ヒト膵癌培養細胞における nestin リン酸化抑制の in vitro での検討：ヒト膵癌培養細胞株を用いて、リン酸化 nestin 過剰発現細胞およびリン酸化部位変異 nestin 発現細胞を作成した。その結果、リン酸化 nestin 過剰発現細胞株では、癌細胞の遊走、

浸潤が亢進した。リン酸化部位変異 nestin 発現細胞では、変異箇所数の違いにより、異なる結果を示した。1 ヲ所のリン酸化を抑制すると、細胞増殖の抑制と細胞遊走、浸潤の亢進を認めた。Nestin の 2 ヲ所のリン酸化を抑制すると、癌細胞の増殖、遊走、浸潤が著明に抑制され、形態的に多核の細胞の数が増加した。

(4) ヒト膵癌細胞における nestin リン酸化抑制の in vivo での検討：マウス肝転移モデルを用いた検討では、nestin の 2 ヲ所のリン酸化を抑制すると癌細胞の肝転移が有意に抑制された。

また、nestin に対する siRNA をマウス尾静脈から注射すると、マウスでの肝転移が抑制された。

(5) 膵癌細胞における nestin リン酸化機構の解明：阻害剤ライブラリーを用い、リン酸化 nestin の上流を制御する上流の細胞内シグナル系を網羅的に検討した。その結果、cyclin dependent kinase, AKT, Aurora の阻害剤にて膵癌細胞の nestin のリン酸化が抑制された。

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9件)

(1) Matsuda Y, Ishiwata T, Yachida S, Suzuki A, Hamashima Y, Hamayasu H, Yoshimura H, Honma N, Aida J, Takubo K, Arai T. Clinicopathological features of 15 occult and 178 clinical pancreatic ductal adenocarcinomas in 8339 autopsied elderly patients. *Pancreas*. 2016 45:234-40. 査読あり

(2) Matsuda Y, Yoshimura H, Ishiwata

I, Sumiyoshi H, Matsushita A, Nakamura Y, Aida J, Uchida E, Takubo K, Arai T. Mitotic index and multipolar mitosis in routine histologic sections as prognostic markers of pancreatic cancers: A clinicopathological study. *Pancreatology*. 2016 16:127-32. 査読あり

(3) Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Yamashita S, Ushijima T, Arai T. Systemic Administration of Small Interfering RNA Targeting Human Nestin Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Pancreas*. 2016 45:93-100. 査読あり

(4) Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Hagio M, Arai T. Inhibition of nestin suppresses stem cell phenotype of glioblastomas through the alteration of post-translational modification of heat shock protein HSPA8/HSC71. *Cancer Lett*. 2015 357:602-11. 査読あり

(5) Matsuda Y, Ishiwata T, Izumiyama-Shimomura N, Hamayasu H, Fujiwara M, Tomita K, Hiraishi N, Nakamura K, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Arai T. Gradual telomere shortening and increasing chromosomal instability among PanIN grades and normal ductal epithelia with and without cancer in the pancreas. *Plos One*. 2015 10:e0117575. 査読あり

(6) Narita K, Matsuda Y, Seike M, Naito Z, Gemma A, Ishiwata T. Nestin regulates proliferation, migration, invasion and stemness of lung adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2014 44:1118-30. 査読あり

(7) Matsuda Y, Yoshimura H, Ueda J, Naito Z, Korc M, Ishiwata T. Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid

IL2R (null) (NOG) mice. *Am J Pathol*. 2014 184:674-85. 査読あり

(8) Matsuda Y, Suzuki G, Kusano T, Kawamoto Y, Yoshimura H, Fuse A, Yokota H, Naito Z, Ishiwata T. Phosphorylation of Thr(1495) of nestin in a mouse model of cerebral ischemia and reperfusion damage. *Pathol Int*. 2013 63:448-56. 査読あり

(9) Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. Nestin is highly expressed in advanced-stage melanomas and neurotized nevi. *Oncol Rep*. 2013 29:1595-9. 査読あり

〔学会発表〕(計5件)

(1) Matsuda Y. Gradual telomere shortening and increasing chromosomal instability among PanIN grades and normal ductal epithelia with and without cancer in the pancreas. *Telomere workshop in Korea, Seoul, Korea, 2015*. 11. 11.

(2) Matsuda Y, Suzuki A, Hamashima Y, Hamayasu H, Yoshimura H, Ishiwata T, Arai T. Occult and clinical pancreatic cancers in elderly patients. *The American association for cancer research annual Meeting 2015, Pennsylvania, USA, 2015*. 4. 18-22.

(3) 松田陽子, 石渡俊行, 吉村久志, 源利成, 新井富生. 膵癌におけるリン酸化 nestin の役割と抑制効果. *日本癌学会シンポジウム・共同利用共同拠点シンポジウム, 石川県立音楽堂交流ホール(金沢, 石川県) 2015*. 1. 21-22.

(4) Matsuda Y, Yoshimura H, Naito Z, Suzuki T, Kawahara K, Kawamoto Y, Ishiwata T. Inhibition of nestin phosphorylation as a novel therapy for pancreatic cancer. *第72回日本癌学会総会, パシフィコ横浜(横浜, 神奈川県) 2013*. 10. 3-5.

(5) Matsuda Y, Yoshimura H, Suzuki T, Naito Z, Kawahara K, Yanagisawa Y, Kawamoto Y, Ishiwata T. Inhibition of phosphorylation of nestin decrease pancreatic cancer cell growth. The American association for cancer research annual Meeting 2014, Washington, DC, USA, 2013. 4. 6-13.

〔図書〕(計1件)

(1) 松田陽子, 石渡俊行, 吉村久志, 濱保英樹, 住吉宏樹, 松下晃, 中村慶春, 内田英二, 新井富生. 病理検体を用いた膵癌術前化学療法の検討, 膵癌治療 up-to-date 2015, 編集: 海野倫明、土田明彦, 医学図書出版, 146-150, 2015.

〔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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 陽子 (Matsuda, Yoko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・

東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号: 20363187

(2) 研究分担者

松下 晃 (Matsushita, Akira)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70449263

進士 誠一 (Shinji, Seiichi)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80409193

石渡 俊行 (Ishiwata, Toshiyuki)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)

東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号: 90203041

(3) 連携研究者

()

研究者番号: