

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670587

研究課題名(和文)オートファジー誘導性癌細胞基質クリアランス機能に注目した新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapies that focus on autophagy-induced cancer cell substrate clearance function

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の浸潤過程において癌関連線維芽細胞による基質クリアランスや癌細胞の上皮間葉移行が重要とされているが、今回我々は癌細胞自身が行う基質クリアランスと細胞の自己成分を分解する代謝機構であるオートファジーの関与について研究を行った。ヒトの組織では膵癌細胞におけるオートファジーが亢進しており、治療標的となり得る可能性が示唆された。オートファジー阻害薬である3-MAによって膵癌細胞の浸潤能は抑制され、オートファジー関連遺伝子であるAtg7の発現をshRNAで抑制すると、膵癌細胞の増殖能は抑制された。また膵癌でAGR2という蛋白質の下方制御は、有用な予後マーカーであることを報告した。

研究成果の概要(英文)：During invasion process of pancreatic cancer, we focused on extracellular matrix clearance by cancer-associated fibroblasts and the epithelial-mesenchymal transition of cancer cells, and we thought pancreatic cancer cells were also involved in matrix remodeling. So we studied the relationship between extracellular matrix clearance and autophagy in pancreatic cancer cells. Autophagy is a metabolic mechanism degrades self components, Autophagy of pancreatic cancer cells in human sample is enhanced, so it could be a therapeutic target. Invasion ability of pancreatic cancer cells was suppressed by autophagy inhibitor 3-MA, and proliferation of pancreatic cancer cells was also inhibited by the knock down of autophagy-related gene Atg7 using shRNA. Furthermore we reported that the downregulation of protein of AGR2 in pancreatic cancer is a useful prognostic marker induced by epithelial-mesenchymal transition.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌関連線維芽細胞 細胞外基質クリアランス 上皮間葉移行 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

癌進展の中心的プロセスである癌浸潤は、細胞外基質(Extracellular matrix; ECM)の分解と形成されたスペースへの細胞遊走から構成され、ECMリモデリングと呼ばれている。近年 ECM リモデリングの主役は癌関連線維芽細胞(CAF)であり、CAF が癌細胞の先頭に立ち浸潤している事が報告された (Gaggioli, Nat Cell Biol, 2007)。また癌の浸潤・転移の際に上皮細胞が一時的に間葉系細胞の形態・特徴を獲得する上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition; EMT)を生じるが、これと細胞外基質分解機構との関係を調べた研究は無い。オートファジーは細胞の自己成分である細胞内小器官や蛋白質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ことが古くから知られていた。近年オートファジーと癌が密接に関連している事が多く報告され、既に腫瘍を形成した細胞に対しては転移、増殖を促進する事がわかっているが (Yang, Genes Dev, 2011)詳細なメカニズムは不明である。近年、オートファジーが CAF の ECM リモデリングに関与している可能性が初めて報告された (Castello-Cros, Cell Cycle, 2011) が癌細胞の ECM リモデリングに関する報告は皆無である。

2. 研究の目的

我々はかねてから膵癌浸潤における線維芽細胞の役割につき研究しており (Ohuchida, Cancer Res, 2004; Moriyama, Cancer, 2010; Ikenaga, Gastroenterology, 2010)、線維芽細胞の持つ高い ECM 分解機能と浸潤能に注目していた。申請者は H22 年から H24 年の間に基盤研究 B および挑戦的萌芽として EMT を誘導する miRNA や線維芽細胞が分泌する成長因子に関する研究も行ってきた (Fujita, Cancer Sci, 2009; Yu, Molecular Cancer, 2010; Nakata, Surgery, 2011)。以上の知識・経験から、膵癌細胞が EMT を生じる際高い遊走能だけでなく、線維芽細胞同様に EMT 誘導癌細胞が ECM の分解に関与し、その分解には CAF 同様オートファジーが関与しているのではないかと考え、本研究を立案した。

本研究では、癌細胞外基質分解機構と膵癌浸潤、オートファジーの関係を解明するために、膵癌細胞におけるオートファジーの評価、オートファジー抑制時における膵癌細胞の変化、膵癌細胞の EMT に関わる新規分子の同定を行った。

3. 研究の方法

(1) 膵癌切除標本を用いて、免疫化学染色を行った。リソソームへの取り込みの前段階であるオートファゴソームのマーカ

る microtubular associated protein light chain-3(LC-3)に対する抗体を用いて染色した。ポジティブコントロールは同じ切片内の神経細胞を用いた。

(2) 膵癌細胞株 (Panc1, SUIT-2) にオートファジー抑制剤である 3-MA, クロロキン (CQ) を添加して、膵癌細胞の浸潤能、遊走能、増殖能を検討した。浸潤能はマトリゲルを敷いたトランスウェルチャンバーの上に膵癌細胞を撒き、トランスウェルチャンバー下に浸潤した細胞数で評価した。遊走能は、マトリゲルを用いないトランスウェルチャンバーを用いて同様に行った。増殖能は Cell titer-glo luminescent cell viability assay を用いた。

(3) オートファジー必須遺伝子である Atg7 を標的とした shRNA を、レンチウイルスを用いて SUIT-2 に導入し、SUIT-2 の増殖を観察した。

(4) 膵癌切除組織を用いて、癌の進展を促進するとされている Anterior gradient 2 (AGR2) および EMT のマーカーとして E-cadherin, vimentin による免疫化学染色を行った。

(5) 膵癌細胞を膵星細胞と共培養し、AGR2 と EMT マーカーの発現を qRT-PCR, western blotting で評価する。また TGF- β 添加による AGR2 の発現を qRT-PCR で評価する。

4. 研究成果

(1) 膵癌切除組織の LC3 染色では、膵癌細胞において LC3 陽性であった (図 1)。LC3 はオートファゴソームのマーカーとして広く使用されており、膵癌細胞の細胞質に多くオートファゴソームが存在することが示され、これは膵癌細胞でオートファジーが亢進していることを強く支持するものであった。またオートファジーが膵癌細胞の治療標的となることを示すものであった。

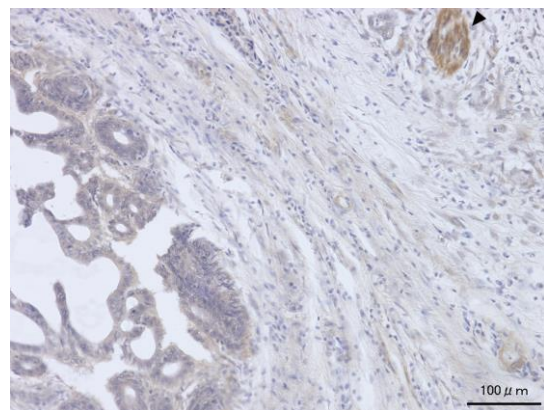


図 1:膵癌切除標本の LC3 による免疫染色。右上の矢頭はポジティブコントロールの神経。左下の膵癌細胞は LC3 陽性であった。

(2) Panc1 に 3-MA を投与したところ、遊走細胞数と浸潤細胞数の著明な減少を認めた。一方、CQ を投与してもあまり変化はなかった(図 2)。

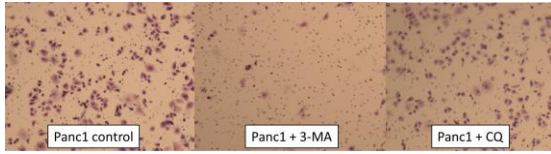


図 2 : オートファジー抑制薬 (3-MA, CQ) による Panc1 の遊走細胞数の変化。

3-MA は Panc-1 の増殖も著明に抑制し、この影響は否定できなかった。CQ による Panc1 の増殖能の変化に関しては、添加 3 日後より増殖抑制効果が得られ、緩徐であった(図 3)。この緩徐な効果のために、添加後すぐに評価した浸潤能・遊走能に著明な変化が見られなかったことが推測された。

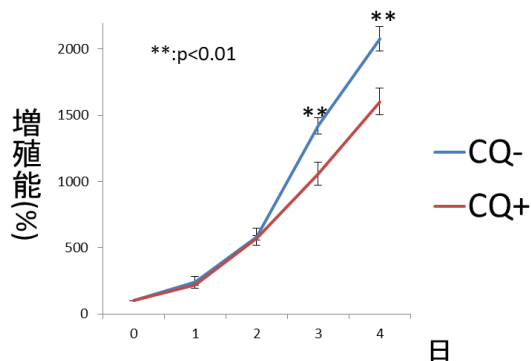


図 3 : オートファジー抑制薬 CQ による Panc1 の増殖能の変化。

増殖能の変化が緩徐であったため、CQ 添加後のオートファジーの抑制効果に関しても経時的な検討を行った。Western blotting によって、膜結合型の LC3 である LC3-II およびオートファジーで特異的に分解されるたんぱく質として知られる p62 の変化を検討した。CQ はオートファゴソームとリソソームの融合を阻害するとされており、LC3-II の蓄積によって CQ のオートファジー抑制を評価した。CQ 投与直後より LC3-II の上昇は認められたが、その後も徐々に上昇傾向で、投与後 48 時間がピークであった(図 4)。この結果は、CQ 投与 3 日後より増殖能の低下を認めた前述の結果と矛盾しなかった。CQ は抗マalaria薬として使用されており、現在は全身性エリトマトーデスなどに使用されているため、ヒトへの臨床応用に適しており、この緩徐な作用は興味深いものであった。また、膵癌関連線維芽細胞への CQ 投与も行ったが、膵癌細胞と比較して、オートファジーの抑制および増殖能の低下が早期より出現した。この機序は現時点では不明であるが、間質増生を特徴とし、間質を含め治療選択の必要性が言われている膵癌において、新たな可能性をもたらす結

果であった。

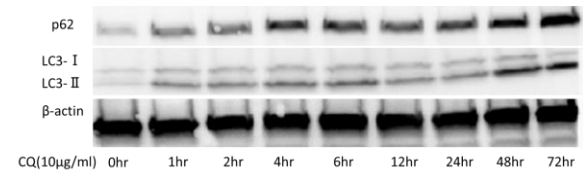


図 4 : オートファジー抑制薬 CQ による Panc1 のオートファジーの経時的変化。

(3) shRNA を用いて、オートファジー必須遺伝子である Atg7 を安定的に抑制した膵癌細胞株 SUIT-2 を作成した。shRNA はレンチウイルスで導入し、抗生剤の Puromycin でセレクションを行った。コントロールの shRNA を導入した SUIT-2 と比較して、Atg7 をノックダウンした SUIT-2 の増殖能は低下傾向であった。

(4) AGR2 による膵切除切片の免疫化学染色では、正常膵で AGR2 の発現はなく、前癌病変である PanIN で AGR2 が陽性であったが(図 5)、膵癌細胞では発現が低下した。

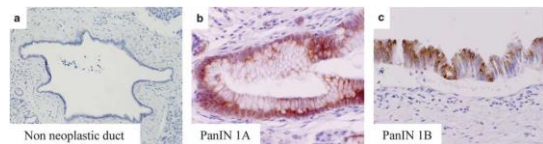


図 5 : (a) 正常膵上皮, (b) PanIN 1A, (c) PanIN 1B の AGR2 免疫化学染色。

この発現低下は、EMT のマーカーと関連し、AGR2 発現低下に伴って vimentin の発現上昇と E-cadherin の発現低下を認めた。

(5) 膵星細胞との共培養によって、膵癌細胞単独と比較して AGR2 の発現が低下した(図 6)。

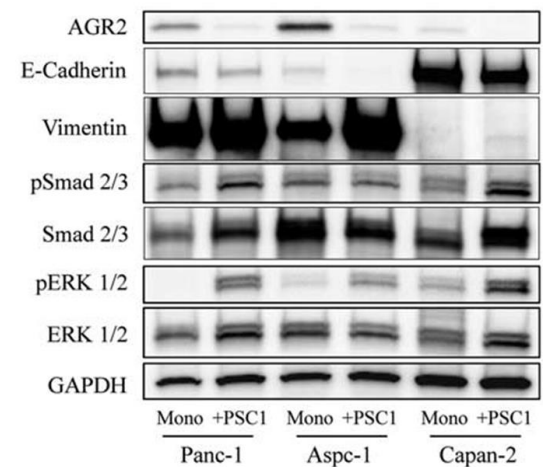


図 6 : 単培養もしくは膵星細胞との共による、膵癌細胞の AGR2, EMT マーカーの変化。

また TGF- β 添加によって、膵癌細胞の AGR2 の発現が低下した。これらから、AGR2 の下方制御は、EMT を含めた癌進展促進の二次的効果として認められると考えられ (図 7)、膵癌において AGR2 の下方制御は、有用な予後マーカーのひとつに挙げられた。

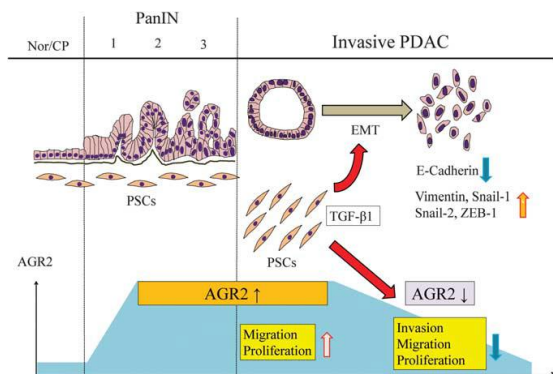


図 7 : 膵癌の EMT と AGR2 の下方制御の機序

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)

- ① 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, 2014, 564-574
DOI: 10.1245/s10434-014-3676-8

[学会発表] (計 1 件)

- ① Nakata K, Zhao M, Ohuchida K, Miyasaka Y, Maeyama R, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Tanaka M. Salinomycin induced autophagy and is related with its killing effect for pancreatic cells, American Pancreatic Association 44th annual meeting, 2013. 10. 31, Miami (America)

[図書] (計 0 件)

[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

仲田 興平 (NAKATA Kohei)
九州大学・医学研究院・共同研究員

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

(3) 連携研究者

なし