

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713050

研究課題名(和文)オートファジーによる癌幹細胞静止期維持機構の解明及び人工ウイルス治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of G0 phase maintenance mechanism by autophagy in cancer stem cells and development of artificial virus therapy method

研究代表者

仲田 興平 (NAKATA, Kohei)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30419569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞は細胞周期を静止期(G0)に維持しているため既存の化学療法は効果が無い。そのため、癌の再発を予防するために癌幹細胞の静止期維持機構を解明し、癌幹細胞の治療抵抗性を改善する方法を開発することを目的とした。オートファジー抑制剤によってマウス同所移植膵癌モデルの腫瘍成長が抑制される事を報告した。さらにこの腫瘍切片では増殖期の癌細胞が減少していることを報告し、休止期の細胞が増加している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Traditional chemotherapy is ineffective to cancer stem cells, because these cells maintain the cell cycle in G0 phase. Therefore, we aimed to elucidate the G0 phase maintenance mechanism of cancer stem cells and to develop a method to improve the treatment resistance of cancer stem cells, in order to prevent recurrence of cancer. We reported that the autophagy inhibitor suppressed tumor growth in mice orthotopically transplanted pancreatic cancer models. Furthermore, we reported that cancer cells in the proliferation phase decreased in these tumor section, suggesting the possibility that cells in the G0 phase are increasing.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オートファジー 癌幹細胞 膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌を代表とする難治性固形腫瘍は、早期から浸潤、転移を生じ、発見時に既に治療切除が困難である事が多い。しかしその多くが放射線照射、化学療法抵抗性であり治療抵抗性である。特に膵癌は5年生存率はここ30年間でほとんど改善が無く、治療法の開発は社会的緊急性・重要度が高い。近年、乳癌、膵臓癌、脳腫瘍などの固形癌において血液腫瘍同様に、癌幹細胞の存在の可能性が示唆され、注目を集めている。癌幹細胞は正常幹細胞同様に細胞周期を静止期(G0)に維持する事により癌組織を維持しているが、現在使用されている抗癌剤の多くは、細胞分裂中のDNAに入り込み、DNA合成阻害により癌細胞の増殖を抑えているため静止期に留まっている癌幹細胞に対して既存の化学療法は効果が無い。そのため、癌細胞の再発を防ぐには癌幹細胞の静止期維持機構を解明し、癌幹細胞の治療抵抗性を改善する方法の開発が急務である。

オートファジーは細胞内の代謝に不可欠なシステムであるが、発癌から転移、浸潤、化学療法抵抗性まで癌の様々な局面に重要な役割を果たしていることが明らかになった (Autophagy 2012, Zou et al.)。近年、血液幹細胞の維持にオートファジーの関与が初めて報告され、幹細胞の静止期維持機構に関与している可能性が示唆されたが、固形癌幹細胞静止期維持機構とオートファジーに関する報告は皆無である。

一方、化学療法の問題点として、正常組織への影響は避けられない問題である。癌種によっては長期間抗癌剤を投与する必要があり、副作用にも焦点を当てた治療法の開発が急務である。近年、Drug Delivery System (DDS)の開発が盛んであるが効果的なDDSの開発は立ち後れている。

2. 研究の目的

幹細胞が静止期から増殖期へ脱分化する際にどのようなメカニズムが関わっているかはこれまで全く不明であった。近年、血液幹細胞維持とオートファジーの関係が初めて報告されたが (JEM 2011, Mortensen et al.)、固形癌における報告は国内外にもない。癌幹細胞を静止期から細胞周期に移行させる点は癌細胞を一時的に増殖させる危険性を伴う。そのため、本研究では抗癌剤を併用する事による対策まで含む。本研究の遂行からオートファジーを抑制する事により抗癌剤耐性幹細胞が抗癌剤に効果のある癌細胞へと脱分化する事により、抗癌剤に対する治療効果の劇的な改善が予想される。本研究では癌幹細胞維持に必要な静止期維持機構にオートファジーが関与している事を確認することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵癌切除標本や膵癌自然発生マウ

スの膵腫瘍から膵癌幹細胞を純化する。具体的には、豊富な間質を含んだ膵癌切除標本から抗CK19抗体によるセルソートによって膵癌細胞を純化し、その細胞からオルガノイドを作成することで、腫瘍形成能を持った膵癌幹細胞の純化を行う。

(2) 膵癌幹細胞の静止期維持機構を解明するために、細胞周期を評価する系を確立する。

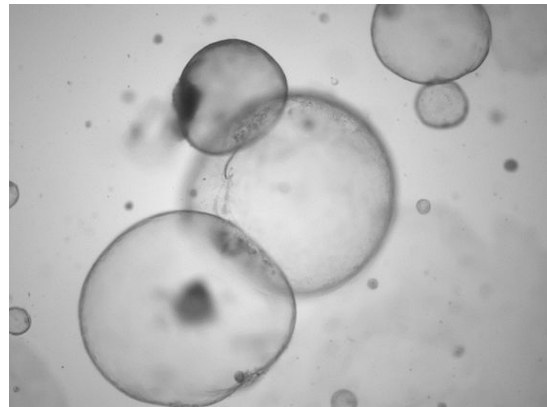
(3) 膵癌幹細胞におけるオートファジー活性、オートファジー抑制による膵癌幹細胞への影響を検討するために、オートファジーの評価系を確立する。

(4) 膵癌マウスモデルを用いてオートファジー抑制剤の効果を検討する。

(5) 膵癌細胞の中でも膵癌幹細胞をより特異的に抑制する薬剤を同定し、その薬剤の作用におけるオートファジーの役割を検討する。

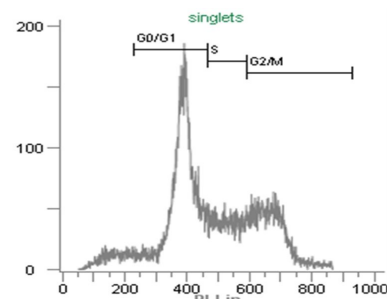
4. 研究成果

(1) ヒト膵癌切除標本および膵癌自然発生マウス (KPCマウス) の膵腫瘍を抗CK19抗体によってセルソートを行い、豊富な間質成分を含む膵癌切除標本から膵癌細胞のみを純化した。さらに、純化した膵癌細胞をマトリゲル内での3次元培養することによってオルガノイドを作成し、幹細胞の性質をもった細胞が含有されていることを確認した (下図)。

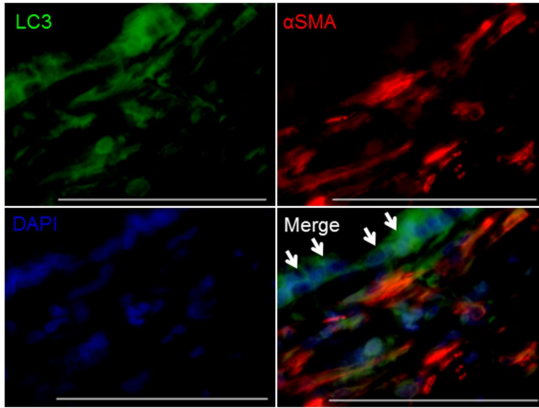


KPCマウスの膵癌組織由来のオルガノイド

(2) 膵癌幹細胞の静止期維持機構を解明するために、細胞周期を評価する系を確立した。具体的にはフローサイトメトリーを用いたCell cycle assayを確立した。この系を用いて、膵癌自然発生マウス (KPCマウス) の膵腫瘍から樹立した膵癌細胞株の細胞周期を評価することに成功した (下図)。

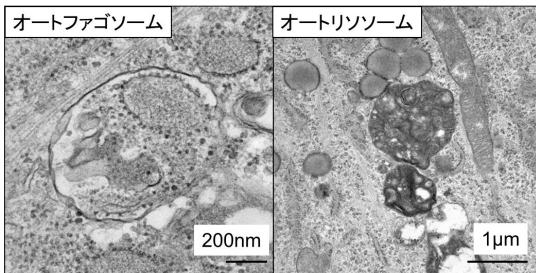


KPCマウス由来膵癌細胞株を用いたCell cycle assay.



膵癌切除切片の蛍光免疫染色。矢印はオートファジーが亢進した癌細胞。(Gastroenterology 2017, Endo et al.より一部改変。)

(3) ヒト膵癌切除切片を用いた蛍光免疫染色を行い、膵癌細胞においてオートファジーが活性化していることを確認した(上図)。In vitro で抗 LC3 抗体によって蛍光免疫染色を行い、細胞内の LC3 dot を観察することで、オートファゴソーム/オートリソソームを観察した。autophagy detection kit によるオートファゴソーム/オートリソソームの染色後のフローサイトメトリーでのオートファジーの評価も行った。また、ウェスタンブロット法で LC3 タンパク質を評価し、LC3- および LC3- のタンパクレベルからオートファジーの評価を行った。オートファジーによって特異的に分解されるタンパク質である p62 タンパク質によるオートファジーの評価も行った。さらに、透過型電子顕微鏡によるオートファゴソームとオートリソソームの観察を行うことで細胞内のオートファジーを直接観察した(下図)。オートファジーの



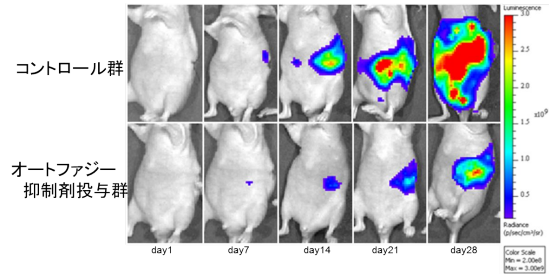
オートファゴソーム、オートリソソームの電子顕微鏡像。(Gastroenterology 2017, Endo et al.より一部改変。)

抑制は、オートファジー必須遺伝子である Atg5 や Atg7 を標的とした siRNA, Atg7 を標的とした shRNA を用いて行った。

(4) 膵癌マウスモデルを用いてオートファジー抑制剤の効果を検討した。具体的には、ヌードマウスの膵同所移植モデルを用いた。これまで報告されている膵癌細胞株のみの移植モデルではなく、ヒト膵癌における豊富な間質成分により近い、ヒト膵癌細胞株とヒト膵癌切除切片から樹立した膵星細胞を共移植するモデルを我々は用いた。さらに、移植する膵癌細胞株にルシフェラーゼを発現させることで、マウスが生存したまま継続的に癌細胞のみの増殖を評価できるマウスモデルとした。オートファジー抑制剤は、抗マラリア薬としてヒトへの安全な投与が長期

間確認されているクロロキンをを用いた。クロロキンによってマウス同所移植モデルの膵腫瘍の成長は著明に抑制され、肝転移や腹腔播種も抑制された(下図)。

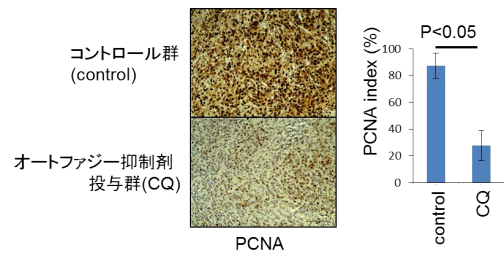
さらに、これらのマウスより摘出した腫瘍切



オートファジー抑制剤によって、マウス同所移植モデルの膵癌の成長が抑制された。(Gastroenterology 2017, Endo et al.より一部改変。)

片を用いて抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体による免疫染色を行った。核内に PCNA が陽性となった PCNA 陽性細胞はクロロキン投与によって有意に減少した(下図)。この結果から、オートファジー抑制剤によって増殖期の細胞が減少していることが示唆され、休止期の細胞が増加したと推測された。

(5) 乳癌において癌幹細胞を特異的に阻害



オートファジー抑制剤によって、マウス同所移植腫瘍の細胞増殖が抑制された。(Gastroenterology 2017, Endo et al.より一部改変。)

すると報告され、その後膵癌を含む多くの癌腫においても癌幹細胞阻害効果が報告されているサリノマイシンに注目した。サリノマイシンは家畜用抗生剤として広く用いられている安価な薬剤であり、イオフォノアとして働くが、癌幹細胞阻害効果を果たす機序は不詳なままである。複数の膵癌細胞株を用いて、サリノマイシンによって濃度依存的に増殖能が抑制されることを確認した。また抗 CD133 抗体を用いたフローサイトメトリーを行い、サリノマイシンによって CD133 陽性の膵癌細胞分画が減少することを確認し、サリノマイシンによる膵癌幹細胞阻害効果が示唆された。さらに前述した抗 LC3 抗体や抗 p62 抗体を用いたウェスタンブロットや autophagy detection kit を用いたフローサイトメトリーによって、サリノマイシン添加による膵癌細胞株のオートファジーの変化を検討した。サリノマイシンは濃度依存的に膵癌細胞のオートファジーを亢進させた。この結果から、サリノマイシンによる癌細胞増殖抑制効果や癌幹細胞阻害効果においてオートファジーが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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 10 件)

Okumura T, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Koikawa K, Iwamoto C, Miura D, Mizuuchi Y, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M. Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells, *Oncotarget*, 8(11)18280-18295, 2017, doi:10.18632/oncotarget.15430. 査読有

Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Mizuuchi Y, Iwamoto C, Murata M, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Autophagy is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice., *Gastroenterology*, 152(6)1492-1506, 2017, doi:10.1053/j.gastro.2017.01.010, 査読有

Abe T, Ohuchida K, Koikawa K, Endo S, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Cancer-associated peritoneal mesothelial cells lead the formation of pancreatic cancer peritoneal dissemination., *Int J Oncol*, 50(2) 457-467, 2017, doi:10.3892/ijo.2016.3829. 査読有

Abe T, Ohuchida K, Endo S, Ookubo F, Mori Y, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Oda Y, Nakamura M, Clinical importance of intraoperative peritoneal cytology in patients with pancreatic cancer, *Surgery*, 161(4)951-958, doi: 10.1016/j.surg.2016.10.035. 査読有

Ohtsuka T, Mori Y, Ishigami K, Fujimoto T, Miyasaka Y, Nakata K, Ohuchida K, Nagai E, Oda Y, Shimizu S, Nakamura M, Clinical significance of circumportal pancreas, a rare congenital anomaly, in pancreatectomy., *Am J Surg.*, S0002-9610(16)30861-3, doi: 10.1016/j.amjsurg.2016.11.018. 査読有
仲田興平、大内田研宙、大塚隆生、中村

雅史, 膵癌における miRNA 発現と上皮間葉転換, *胆と膵*, 36(10), 2015, 1117-1122. 査読無

Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Nakamura K, Tanaka M, Outcomes of Cervical End-to-Side Triangulating Esophagogastric Anastomosis with Minimally Invasive Esophagectomy, *World J Surg*, 39(5), 1099-1104, 2015, doi:10.1007/s00268-014-2925-0. 査読有
Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Shimizu S, Tanaka M, Technical feasibility of laparoscopic total gastrectomy with splenectomy for gastric cancer: clinical short-term and long-term outcomes. *Surg Endosc.* 29(7), 1817-22, doi:10.1007/s00464-014-3870-6. 2015, 査読有

Nagai E, Nakata K, Ohuchida K, Miyasaka Y, Shimizu S, Tanaka M, Laparoscopic total gastrectomy for remnant gastric cancer: feasibility study, *Surg Endosc.*, 28(1), 289-296, 2014, doi: 10.1007/s00464-013-3186-y., 査読有
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, *Annals of Surgical Oncology*, 21(suppl4), S564-S574, 2014, doi: 10.1245/s10434-014-3676-8. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Mizuuchi Y, Moriyama T, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Autophagy Drives Pancreatic Stellate Cells Activation and Promotes Pancreatic Cancer, 47th Annual Meeting of the American Pancreatic Association, 2016.10.26., Boston(America)

Abe T, Ohuchida K, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Sada M, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Nakamura M, Talin1 promotes tumor invasion in pancreatic cancer, The 20th meeting of the International conference of Pancreatology, 2016.8.6. 仙台市

宮坂義浩, 大塚隆生, 森泰寿, 仲田興平, 大内田研宙, 永井英司, 中村雅史, 膵癌再発に対する外科的切除は予後を改善するか?, 第71回日本消化器外科学会総会, 2016.7.16. アステイ徳島(徳島市)

遠藤翔, 仲田興平、他、膵星細胞におけ

るオートファジーは、膵癌の成長と転移を促進する，第71回日本消化器外科学会総会，2016.7.15.アスティ徳島(徳島市)

阿部俊也，大内田研宙，森泰寿，仲田興平，宮坂義浩，大塚隆生，植木隆，永井英司，小田義直，中村雅史，膵癌切除症例における術中腹腔洗浄細胞診の意義，第71回日本消化器外科学会総会，2016.7.14.アスティ徳島(徳島市)

遠藤翔，仲田興平、他サリノマイシンは膵癌細胞のオートファジーを亢進させ、癌細胞増殖を抑制する，第107回日本消化器病学会九州支部例会，2016.6.24 ホテルグランデはがくれ(佐賀市)

中山宏道、大内田研宙、遠藤翔、武居晋、阿部俊也、肥川和寛、巖子龍、奥村隆志、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史，膵癌自然発生マウスモデルKPCLの検討，第107回日本消化器病学会九州支部例会，2016.6.24，ホテルグランデはがくれ(佐賀市)

遠藤翔、仲田興平、佐田政史、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，大阪国際会議場(大阪市)

遠藤翔、仲田興平、大内田研宙、阿部俊也、肥川和寛、堀岡宏平、水内祐介、小田義直、水元一博、田中雅夫，オートファジーが膵癌の癌間質相互作用に与える影響の検討，第46回日本膵臓学会大会，2015.6.20，名古屋国際会議場(名古屋市)

()

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲田 興平 (NAKATA, Kohei)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30419569

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者