

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293289

研究課題名(和文)新規Hedgehogシグナル系制御療法開発のためのSmo転写活性化経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of the pathway of Smo transcription for development of new therapeutic strategy inhibiting Hedgehog signaling

研究代表者

大西 秀哉 (ONISHI, HIDEYA)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30553276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素環境でSMO発現が亢進する機序として、転写因子 recombination signal binding protein for immunoglobulin-kappa-J region (RBPJ)および転写共役因子mastermind like-3 (MAML3)が関与していること、そして、RBPJ/MAML3を抑制することにより実際に膵癌の増殖、浸潤、腫瘍形成といった悪性形質の誘導が抑制されることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：We found that transcriptional factor, recombination signal binding protein for immunoglobulin-kappa-J region (RBPJ) and transcriptional coactivator, mastermind like-3 (MAML3) contribute to the mechanism of upregulation of Smo transcription under hypoxia, and that inhibition of RBPJ/MAML3 signaling suppress the inducing of malignant phenotype such as proliferation, invasion and tumorigenesis in pancreatic cancer.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：膵癌 Hedgehogシグナル Smo 低酸素環境 悪性形質誘導 増殖能 浸潤能 転写活性

1. 研究開始当初の背景

Hh シグナル系はリガンドである SHH 蛋白、抑制性受容体 PATCHED 蛋白、起動分子 SMO 蛋白、および転写を制御する GLI 蛋白で構成される。現在は、SMO 蛋白を中心とした各種構成蛋白の機能阻害剤開発がなされている。特に、SMO 阻害剤は、2009 年に有効性を支持する臨床試験の成果が報告された(Von Hoff et al, N Engl J Med, 2009)。一方、大腸癌や膵癌などでは期待された程の効果が得られていない(Personal communication)。また標的蛋白の mutation により阻害剤の効果が認められなくなる症例も報告された(Yauch et al, Science, 2009)。我々は、Hh 阻害剤の治療効果増強のために Hh シグナル系とクロストークする経路を解析し、その制御法を開発中だが、その研究の中で、低酸素環境が Smo の転写活性を亢進させるという結果を得た(Onishi H et al, Cancer Sci, 2011)。上述のように、SMO 蛋白の機能阻害では Hh 経路の抑制(細胞浸潤)は不十分だが、SMO 発現を遺伝子レベルで抑制すると非常に強い Hh 経路抑制が得られる事も分かっている(Matsushita S et al, Cancer Sci, 2014)。これらは、SMO を蛋白レベルではなく転写レベルで制御することの重要性を示している。しかし、Smo 転写活性化機序の詳細は不明である。

2. 研究の目的

我々は乳癌における Hedgehog(Hh)シグナル系の再活性化を報告以来(Kubo, Katano et al. Cancer Res, 2004) 各種固形癌における Hh シグナル系の生物学的機能を解析してきた。その研究の過程で、現在治療法として開発中の各種 Hh 経路構成蛋白(SHH, SMO, GLI)の機能阻害だけでは癌に対する効果は不十分であることが分かってきた。最近我々は、低酸素環境が Hh シグナル系の起動蛋白である Smo の転写活性を有意に亢進することを見いだした(Onishi H et al, Cancer Sci, 2011)。従って、本研究の主目的は、「Smo 転写活性化機序を解析し、分子レベルではなく転写レベルで Smo の発現を制御するという新たな視点に立った Hh シグナル系制御療法を開発する」ことである。

3. 研究の方法

(1) Smo 転写活性制御関連候補遺伝子(分子)の同定：膵癌細胞株(ASPC-1 および SUIT-2)を標的細胞として、低酸素環境により変動する遺伝子、蛋白を DNA マイクロアレイ法により、網羅的に解析する。

(2) 候補遺伝子(分子)による SMO 発現と機能変化の解析：候補遺伝子の遺伝子導入、候補遺伝子の阻害(シグナル阻害剤、低分子 RNA 干渉、遺伝子導入)を基本として SMO 発現と機能変化(増殖能・浸潤能・造腫瘍能)を MTT assay、コロニー増殖試験、マトリゲル浸潤試験などで解析し、治療標的になりう

る候補遺伝子(分子)の絞り込みを行う。

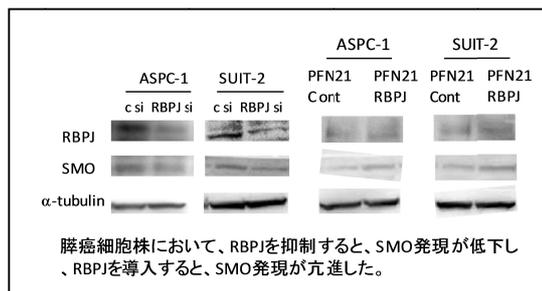
(3) Smo 遺伝子プロモーター解析：Smo プロモーター領域における選別した候補分子の DNA 結合活性を EMSA 法で解析する。さらに、選別した候補分子による Smo 遺伝子の転写活性化をルシフェラーゼ法により確認する。

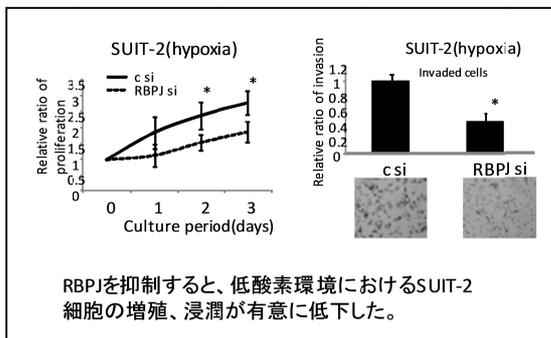
(4) 選別した候補遺伝子(分子)を制御する二次的臓器特異的シグナルの探索：より臓器特異性の高い治療法を開発するために、選別した候補遺伝子(分子)を制御する二次的臓器特異的シグナルの探索を行う。すなわち、同一のシグナル活性化であっても、そのシグナルの発現を制御するシグナルに臓器特異性があれば、このシグナルも臓器特異的治療標的として利用できる。方法としては、癌組織間質細胞(線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症細胞など)における選別した候補遺伝子(分子)の発現あるいは、内分泌系因子等の、選別した候補遺伝子(分子)へ及ぼす影響を解析する。

(5) Smo 転写制御療法の治療効果の検証：免疫不全マウス移植系を用いて、前年度に選別した候補遺伝子(分子)の阻害(シグナル阻害剤、低分子 RNA 干渉、遺伝子導入)による治療効果(増殖抑制、造腫瘍能抑制、浸潤抑制、転移抑制、生存期間)を検証する。

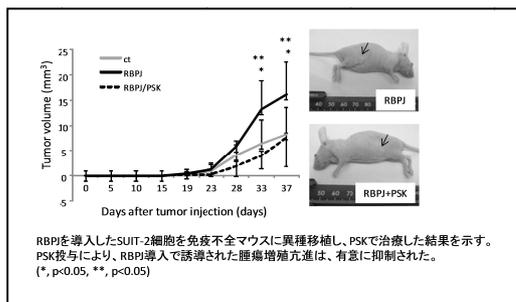
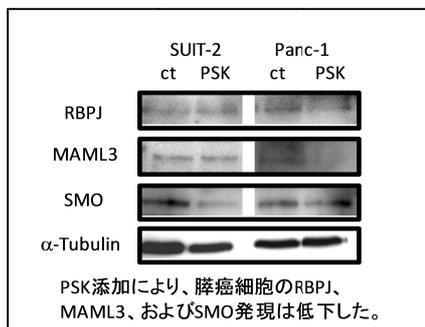
4. 研究成果

(1) 転写因子 Recombination signal binding protein for immunoglobulin-kappa-J region (RBPJ)および転写共役因子 Mastermind like-3 (MAML3)が、Smo 転写活性化亢進に関与していること、および、RBPJ/MAML3 が膵癌の増殖(In vitro および In vivo) 浸潤、腫瘍形成に関与し、膵癌の新規治療標的となるという本研究の最終目的である因子を見出した(業績 8)。現在、Smo 遺伝子プロモーター解析を実施中である(論文作成中)。下図は、RBPJ を抑制あるいは導入したときの、SMO 発現を、また、次頁図は、RBPJ を抑制したときの膵癌細胞の増殖能、浸潤能を評価した結果である。

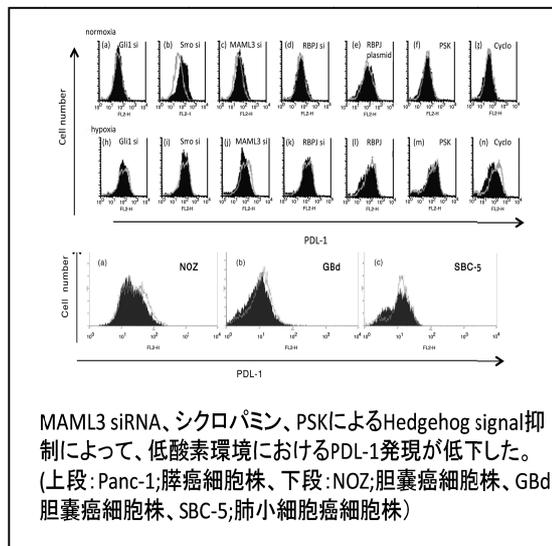




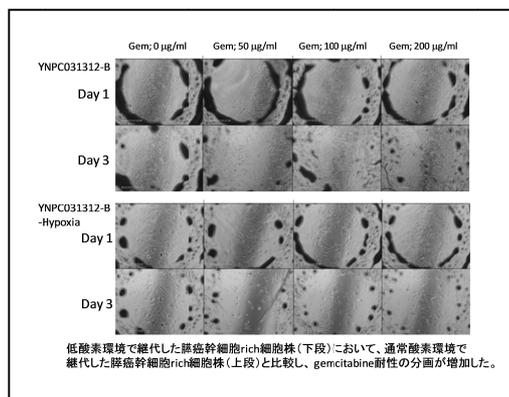
(2) 臨床薬剤である蛋白多糖体 (PSK) が、低酸素環境では RBPJ および MAML3 の発現を低下させ、Smo 発現を抑制し、低酸素環境における膵癌悪性化 (増殖、浸潤) の誘導抑制に寄与することを見出した (業績 4)。下図 (上段) は、PSK を添加した時の RBPJ、MAML3 および SMO 発現を western blot で解析した結果を示す。また、下図 (下段) は、RBPJ を導入した SUIT-2 細胞を免疫不全マウスに異種移植し、PSK で治療した結果を示す。



(3) 本研究により、低酸素環境での Hedgehog signal 活性化と膵癌細胞の生物学的変化の解析を続けた結果として、低酸素による Hedgehog signal の活性化が、癌の PDL-1 発現亢進に関与し、これにより、T リンパ球の抗腫瘍効果を抑制している可能性を見出した (業績 3)。図は、Hedgehog signal を抑制する薬剤あるいは、siRNA を導入して、各種難治性癌における PDL-1 の発現を FACS で解析した結果である。



(4) 本研究により、低酸素環境での膵癌細胞の生物学的変化の解析を続けた結果として、低酸素環境が膵癌幹細胞 rich 細胞株において、gemcitabine 耐性を促進する可能性があることを新たに見出した (業績 6)。図は、低酸素環境で継代した膵癌幹細胞 rich 細胞株に gemcitabine を投与した時の細胞の写真である。



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 8 件)

Onishi H, Suyama K, Yamasaki A, Oyama Y, Fujimura A, Kawamoto M, Imaizumi A, CD24 Modulates Chemoresistance of MCF-7 Breast Cancer cells. Anticancer Res 査読有, 37(2), 2017, 561-565. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28179302>

Onishi H, Future prospect of gallbladder therapy using Hedgehog signaling inhibitor. Chin Clin Oncol 査読有, 6(1), 2017, 11. DOI: 10.21037/cco.2016.05.05.

Onishi H, Fujimura A, Oyama Y, Yamasaki A, Imaizumi A, Kawamoto M, Katano M,

Umebayashi M, Morisaki T, Hedgehog signaling regulates PDL-1 expression in cancer cells to induce anti-tumor activity by activated lymphocytes. *Cell Immunol* 査読有, 310, 2016, 199-204.
DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.08.003.

Yamasaki A, Onishi H, Imaizumi A, Kawamoto M, Fujimura A, Oyama Y, Katano M, Protein-bound polysaccharide-K inhibits Hedgehog signaling through down-regulation of MAML3 and RBPJ transcription under hypoxia, suppressing the malignant phenotype in pancreatic cancer. *Anticancer Res* 査読有, 36(8), 2016, 3945-3952.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27466498>

Shinkai K, Nakano K, Cui L, Mizuuchi Y, Onishi H, Oda Y, Obika S, Tanaka M, Katano M, Nuclear expression of Y-box binding protein-1 is associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer and its knockdown inhibits tumor growth and metastasis in mice tumor models. *Int J Cancer* 査読有, 139(2), 2016, 433-445.
DOI: 10.1002/ijc.30075.

Imaizumi A, Onishi H, Yamasaki A, Kawamoto M, Umebayashi M, Morisaki T, Hasumi K, Hypoxic Conditions Promote Gemcitabine Sensitivity in a Pancreatic Cancer Stem Cell Line. *Anticancer Res* 査読有, 36(2), 2016, 653-657.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26851020>

Suyama K, Onishi H, Imaizumi A, Shinkai K, Umebayashi M, Kubo M, Mizuuchi Y, Oda Y, Tanaka M, Nakamura M, Katano M, CD24 suppresses malignant phenotype by downregulation of SHH transcription through STAT1 inhibition in breast cancer cells. *Cancer Lett* 査読有, 374(1), 2016, 44-53.
DOI: 10.1016/j.canlet.2015.12.013.

Onishi H, Yamasaki A, Kawamoto M, Imaizumi A, Katano M, Hypoxia but not normoxia promotes Smoothed transcription through upregulation of RBPJ and Mastermind-like 3 in pancreatic cancer. *Cancer Lett* 査読有, 371(2), 2016, 143-150.
DOI: 10.1016/j.canlet.2015.11.012.

[学会発表](計 25 件)

大西 秀哉. 患者さんを見据えた全人的膵癌治療:低酸素環境とHedgehog signal、2017年5月26日、第38回 癌免疫外科研究

会、倉敷アイビースクエア(岡山県・倉敷市)

山崎 章生、大西 秀哉、大山 康博、川元 真、中村 雅史. 転写因子RBPJ発現制御を介した膵癌に対する新規Hedgehogシグナル制御療法の開発、2017年4月28日、第117回 日本外科学会定期学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

大西 秀哉、大山 康博、川元 真、山崎 章生、森崎 隆、中村 雅史. 難治癌に対する新たなPDL-1発現制御療法の開発: Hedgehog signal 制御療法、2017年4月28日、第117回 日本外科学会定期学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

A. Yamasaki, H. Onishi, M. Nakamura, Recombination signal binding protein for immunoglobulin-kappa-J region (RBPJ) and Mastermind-like 3 (MAML3) are potential therapeutic targets for pancreatic cancer, 2016年12月16日、ESMO ASIA 2016, Singapore, Singapore

大西 秀哉、藤村 晶子、大山 康博、川元 真、山崎 章生、今泉 晃、中村 雅史、森崎 隆. 低酸素環境下、活性化リンパ球および樹状細胞における Hedgehog シグナルの生物学的役割の解析、2016年12月1日、第29回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、久留米シティプラザ(福岡県・久留米市)

山崎 章生、大西 秀哉、川元 真、大山 康博、藤村 晶子、今泉 晃、中村 雅史. PSK は転写因子 RBPJ および転写共因子 MAML3 発現制御により低酸素環境における膵癌悪性を制御する、2016年12月1日、第29回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、久留米シティプラザ(福岡県・久留米市)

山崎 章生、大西 秀哉、川元 真、片野 光男、中村 雅史. 低酸素環境で活性化する Hedgehog 経路を標的とした新規膵癌治療法開発、2016年7月14日、第71回 日本消化器外科学会総会、アスティ徳島(徳島県・徳島市)

大西 秀哉、近沢 信人、田坂 健彦、山崎 章生、川元 真、片野 光男. 形態形成シグナルを標的とした新規癌治療法開発、2016年7月14日、第71回 日本消化器外科学会総会、アスティ徳島(徳島県・徳島市)

大西 秀哉、森崎 隆、山崎 章生、川元 真、中村 雅史. 活性化リンパ球における Hedgehog signal の生物学的意義の解

析、2016年5月12日、第37回 癌免疫外科研究会、川越プリンスホテル(埼玉県・川越市)

山崎 章生、大西 秀哉、川元 真、片野 光男、transcriptional regulator; RBPJ および transcriptional co-activator; MAML3 の膵癌新規治療標的としての意義の検証、2016年4月14日、第116回 日本外科学会定期学術集会、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

巢山 久実、大西 秀哉、今泉 晃、片野 光男、Hh 経路制御による乳癌幹細胞制御療法の開発、2016年4月14日、第116回 日本外科学会定期学術集会、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

山崎 章生、大西 秀哉、川元 真、今泉 晃、片野 光男、転写因子 RBPJ と転写共役因子 MAML3 は低酸素環境における膵癌治療標的となる、2015年12月3日、第28回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、川越東武ホテル(埼玉県・川越市)

山崎 章生、大西 秀哉、新海 健太郎、巢山 久実、片野 光男、低酸素環境で活性化する Hedgehog 経路を標的とした新規膵癌治療法開発、2015年7月15日、第70回 日本消化器外科学会総会、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

大西 秀哉、田坂 健彦、近沢 信人、山崎 章生、片野 光男、中村 雅史、Development of a therapy targeting morphogenesis signaling to chemoresistant gastrointestinal cancer. 2015年7月15日、第70回 日本消化器外科学会総会、ホテルオークラ浜松(静岡県・浜松市)

山崎 章生、大西 秀哉、新海 健太郎、巢山 久実、片野 光男、低酸素環境における膵癌悪性化に対する転写因子 RBP-J と共役因子 MAML3 を標的とした治療法の開発、2015年5月14日、第36回 癌免疫外科研究会、奄美観光ホテル(鹿児島県・奄美市)

大西 秀哉、山崎 章生、片野 光男、低酸素環境を考慮した Hedgehog 経路を標的とした膵癌治療法開発、2015年4月16日、第115回 日本外科学会定期学術集会、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

巢山 久実、大西 秀哉、今泉 晃、新海 健太郎、甲斐 昌也、田中 晴生、久保 真、田中 雅夫、片野 光男、乳癌における CD24 分子発現の意義: CD24 分子発現と Hh 経路活性化の連関解析、2015年4月16日、第115回 日本外科学会定期

学術集会、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

山崎 章生、大西 秀哉、巢山 久実、新海 健太郎、今泉 晃、片野 光男、転写因子 Mastermind-like 3 (MAML3) は低酸素環境における膵癌悪性化に關与する、2014年12月4日、第27回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)

大西 秀哉、片野 光男、低酸素環境における膵癌悪性化に対する治療法開発、2014年12月4日、第27回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)

新海 健太郎、中野 賢二、大西 秀哉、田中 雅夫、片野 光男、膵癌における YB-1 高発現の生物学的意義に関する検討、2014年12月4日、第27回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)

⑲ 巢山 久実、大西 秀哉、今泉 晃、新海 健太郎、久保 真、田中 雅夫、片野 光男、乳癌細胞において Hh 経路は、CD24-/Low 分画乳癌細胞の有効な治療標的となる、2014年12月4日、第27回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)

⑳ K. Suyama, H. Onishi, M. Tanaka, M. Katano, Hedgehog signaling is a possible therapeutic target in CD24-negative breast cancer cells. 2014年9月26日、ESMO2014, Madrid, Spain

㉑ K. Shinkai, K. Nakano, H. Onishi, M. Tanaka, M. Katano, Y-box binding protein-1 is involved in tumor angiogenesis and a promising therapeutic target. 2014年9月26日、ESMO2014, Madrid, Spain

㉒ 大西 秀哉、中島 洋、亀田 千津、山崎 章生、田中 雅夫、片野 光男、癌組織の生物学的特性を基盤とした新規治療法の開発: Hedgehog シグナル系制御療法、2014年7月16日、第69回 日本消化器外科学会総会、ホテルハマツ(福島県・郡山市)

㉓ 今泉 晃、新海 健太郎、巢山 久実、森藤 良浩、松下 章次郎、永松 伊織、久保 真、大西 秀哉、森崎 隆、蓮見 賢一郎、片野 光男、Gemcitabine 耐性膵癌

の新治療法開発：Leukemia inhibitory factor
の有用性の検討、2014年5月22日、第35
回 癌免疫外科研究会、シェラトン都ホテル
大阪（大阪府・大阪市）

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院 先端医療医
学部門 腫瘍制御学分野

<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 秀哉（ONISHI, Hideya）

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30553276

(2) 研究分担者

片野 光男（KATANO, Mitsuo）

福岡女学院看護大学・看護学部・教授

研究者番号：10145203

（平成27年4月1日より削除）

中野 賢二（NAKANO, Kenji）

九州大学・先端融合医療レドックスナビ

研究拠点・教授

研究者番号：00315061

野村 政壽（NOMURA, Masatoshi）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30315080

久保 真（KUBO, Makoto）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：60403961

中村 勝也（NAKAMURA, Katsuya）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：60585743

山崎 章生（YAMASAKI, Akio）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80404440

（平成26年8月1日より追加）