

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293300

研究課題名(和文)新規ペプチドを用いた胆管癌治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel peptide-based therapy for cholangiocarcinoma

研究代表者

宮川 眞一 (MIYAGAWA, Shin-ichi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：80229806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌は未だ予後が悪く外科的切除を除き有効な治療法は確立されていない。われわれは、当研究室が見出した胆管癌細胞特異的結合ペプチドCop35(CCA-binding oligopeptide 35)が胆道癌細胞のオートファジー誘導に関与することに着目し、同機序を利用した胆道癌新規抗癌剤治療に関して検討した。結果、分子標的薬エベロリムスとCop35を胆道癌細胞株に同時投与することで、オートファジー抑制を介してエベロリムスの腫瘍増殖抑制作用が増強されることを確認した。本研究成果は細胞特異的結合ペプチドを用いた、難治性癌に対する新たな抗腫瘍療法コンセプトの端緒となり得る成果であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cholangiocarcinoma (CCC) is a strongly aggressive malignancy for which surgical resection is the only curative therapy. We had identified Cop35, (CCA-binding oligopeptide 35), by bacteriophage biopanning. Cop35 binds to specifically CCC cells and internalizes mediated by clathrin-mediated endocytosis, and interact with endoplasmic reticulum chaperone GRP78. Everolimus inhibits the proliferation of cancer cells via the mTORC1 pathway while at the same time increasing autophagy. In CCC, everolimus suppressed cell proliferation and co-administered Cop35 enhanced the suppression via the inhibition of autophagy associated with suppressed GRP78 activity. Being a different measure from chemicals like chloroquine, cell growth inhibition enhanced by combined therapy of Cop35 with everolimus in lesser concentration than that with 5FU may lead to a promising new approach in CCC therapy.

研究分野：肝胆膵外科学

キーワード：肝臓外科学 胆管癌 抗癌剤治療

1. 研究開始当初の背景

胆管癌は極めて予後不良な難治性の癌であるが有効な化学療法は未だ確立されておらず、治療の第一選択は外科的切除である。我々はバイオパニング法により、胆管癌に特異的に結合して細胞内に移行するペプチド、Cop35を見出し、Cop35が5FUとの同時投与により胆管癌の増殖抑制を増強することを報告した (Kitahara H, Mol Cancer Res 2011; 9(6): 688-701)。また、免疫沈降により Cop35 がクラスリンを介して GFP78 に結合することも同時に報告した。クラスリンはエンドサイトーシスにより細胞内への物質輸送を行っており、このエンドサイトーシスに GRP78 が関与している可能性が考えられた。一方、GRP78 の作用のひとつとしてオートファジーの誘導が考えられるため、Cop35 と GRP78 を介したオートファジーとの関係を推測し、研究を進めることとした。オートファジーは発癌に対して抑制的に作用する一方、癌細胞は化学療法や放射線療法による細胞死を回避するための手段としてオートファジーを亢進させることがある等複雑な働きをするが、近年オートファジーを抑制することにより抗癌剤の効果を高める報告が多々なされるようになった。オートファジーを抑制する薬剤であるクロロキシン、3-メチルアデニンとは異なり、Cop35 を用いて GRP78 を介したエンドサイトーシスを利用することで副作用がほとんど無く、既存の抗癌剤の効果を高められれば臨床応用に導入することができる。

2. 研究の目的

当研究室が見出した胆管癌細胞特異的結合ペプチド Cop35 は細胞内移行し、5FU による増殖抑制作用を増強することを報告している。このペプチドはクラスリン重鎖に結合して細胞内に取り込まれ、細胞内で、小胞体ストレスに応答して発現する分子シャペロンである GRP78 と結合することが分かっている。GRP78 は、細胞内に集積、凝集してくる異常タンパク質を細胞から除去しようとするオートファジーを誘導することから、Cop35 による抗癌剤の増殖抑制効果の増強はオートファジーの抑制によるものとの仮説をたて胆管癌細胞株を用いて検討した。併用する抗癌剤としては、以下の理由でまずソラフェニブを選択した。肝細胞癌がソラフェニブ抵抗性を獲得する1つのメカニズムとしてオートファジーの亢進が報告されており、肝細胞癌と同じ細胞起源をもつ胆道癌に対してソラフェニブが無効であるメカニズムとしてオートファジーの関与の有無を検討する必要があると考えたからである。

次に、オートファジーが胆管癌細胞の増殖に関与しているのであれば、オートファジーに関係している mTORC1 シグナル伝達系を制御するラパマイシンを抗癌剤 (エベロリムス) として用い、比較的低濃度の Cop35 との併用によりオートファジーを抑制することでエベ

ロリムスの抗癌作用が増強するか否かを検討した。これらの仮説が証明されれば、オリゴペプチドである Cop35 の臨床応用の可能性がより一層期待される。

3. 研究の方法

胆管癌細胞株 (RBE, YSCCC) および肝癌細胞株 (HLF, Huh-7) に対してソラフェニブまたはエベロリムスを投与し、Cop35 の併用効果を検討した。細胞増殖は MTT assay で、アポトーシス発現は FACS を用いて評価した。細胞内シグナル伝達における蛋白質リン酸化については Western blotting assay を用いて比較検討した。また、mTOR2 特異的抑制剤はないため、mTOR2 を構成する Rictor をターゲットとした siRNA を用いて mTORC2 を特異的に抑制し、細胞増殖における効果を検討した。オートファジーの評価は LC3-II, p62 の発現を Western blotting assay で検討することにより行った。

4. 研究成果

1) ソラフェニブ

臨床的に肝癌には有効であるが、胆管細胞癌には適応がないソラフェニブと Cop35 を併用して胆管癌細胞株である RBE に投与すると、ソラフェニブ単独投与時に較べ有意な増殖抑制効果を持つことが示された。(図1)

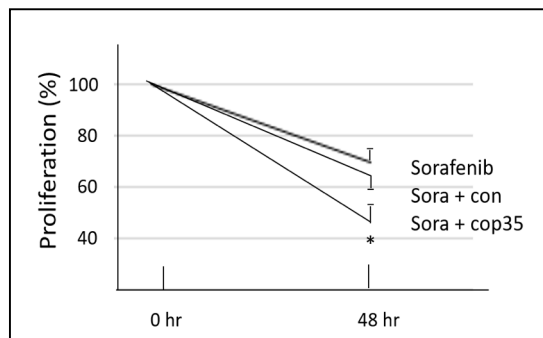


図1 ソラフェニブへの Cop35 の併用効果

胆管癌細胞では Cop35 がオートファジーを誘導する GRP78 と結合していることが分かっており、一方肝癌細胞ではソラフェニブの有効性がオートファジーの亢進で阻害されているとの報告がある。また、元来ソラフェニブの増殖抑制効果は RAF/MEK/ERK シグナル伝達経路の抑制によるものとされているが、近年、ソラフェニブ抵抗性の肝癌細胞では AKT のリン酸化が亢進していて、PI3K/AKT/mTOR のシグナル伝達経路とのクロストークがあることが報告された。オートファジーはこの PI3K/AKT/mTOR の経路の mTORC1 と逆相関するとの報告もある。これらより、胆管細胞癌におけるソラフェニブと Cop35 の併用効果の機序として、本来のソラフェニブの細胞増殖抑制能に対する阻害要素としてのオートファジー亢進を推測し、Cop35 はそのオートファジーを抑制すると考えた。

そこでまず胆管癌における、ソラフェニブ

の PI3K/AKT/mTOR のシグナル伝達経路クロストークの基礎データについて肝細胞癌と比較検討した。ソラフェニブの増殖抑制能は肝細胞癌で胆管癌より大きく、ERK のリン酸化の程度と相関していた。AKT については、Th308 リン酸化には差が無かったが、AKT Se473 リン酸化に大きな違いが見られた。即ち肝細胞癌ではソラフェニブにより AKT Se473 リン酸化は減少したが、胆管癌細胞では逆に有意な増加がみられるという結果を得、胆管癌における PI3K/AKT/mTOR 経路のクロストークが明らかになった。(図 2)

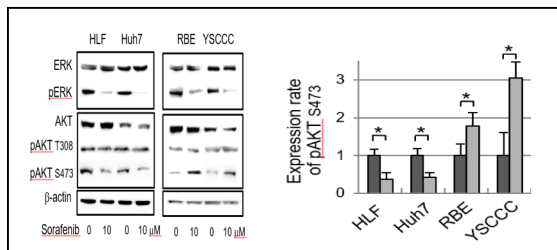


図 2 肝癌、胆管癌における AKT リン酸化

この AKT Se473 リン酸化を阻害するために、胆管癌細胞株 RBE に対し、AKT 阻害剤を 2 剤、アロステリック阻害剤である MK2206 およびアルキルリン脂質であるペリフォシンを用いて効果をみたが、AKT Se473 リン酸化の有意な阻害を引き起こすことは容易ではなかった。そこで次に PI3K/AKT/mTOR 経路における mTOR について検討した。肝細胞癌ではソラフェニブ投与で mTORC1 は減少し、オートファジーが亢進したが、胆管癌細胞では mTORC1 は不変であった。AKT Se473 リン酸化に直接作用する mTORC2 ではその活性が亢進していたため、次に RBE 細胞株で、mTORC2 の構成要素である Rictor をターゲットにした siRNA による mTORC2 の分解を行った。その結果 AKT Se473 のリン酸化が抑制されるとともに、ソラフェニブによる細胞増殖抑制効果が増強された。AKT Se473 リン酸化抑制による FOXO1 を介したアポトーシス増強も認められた。(図 3)

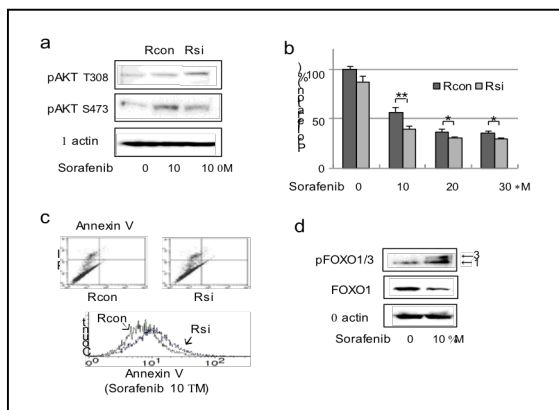


図 3 mTORC2 分解による細胞増殖の抑制

胆管癌細胞ではソラフェニブによる mTORC1 およびオートファジーの変化が見られなかったため、肝細胞癌株とは異なり胆管癌

細胞株では Cop35 の併用による増殖抑制は AKT/mTOR シグナル伝達系とは別の系の作用と思われた。

しかしながら以上の結果により、胆管癌細胞株にてソラフェニブの効果が見られないメカニズムとして、RAF/MEK/ERK のシグナル伝達系抑制による細胞死を逃れて生存に向かう系を見出し、逃避機構としての AKT/mTOR シグナル伝達系の活性化を新たに提唱した。これによりソラフェニブは、同時に mTORC2/AKTSe473 シグナル経路を抑制することでアポトーシスにつながる細胞増殖の抑制を引き起こすことが分かり、ソラフェニブを用いた胆管癌治療に対する臨床応用への可能性が示された(現在投稿中)。(図 4)

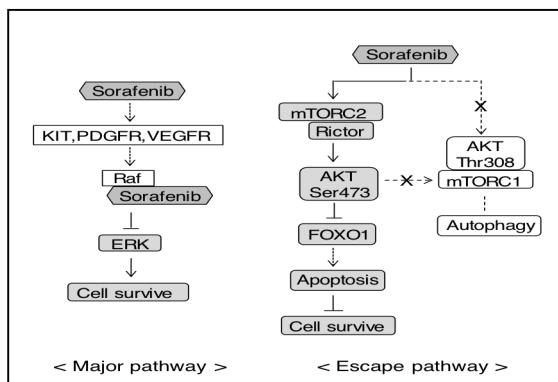


図 4 逃避機構の概要

II) ラパマイシン

Cop35 のオートファジーとの関わりを検討するために、次に mTORC1 抑制剤であり、ラパマイシンのアナログであるエベロリムスを用いた。エベロリムス単独投与でも胆管癌株 RBE の増殖は抑制されたが、エベロリムス 4 μmol/L 投与 1 時間後に 10 μmol/L の Cop35 を追加し 48 時間作用させると増殖抑制効果が有意に増強され、Cop35 の併用でより強い抑制効果が得られることが認められた。抗癌剤として 5FU を用いた前回の報告では、5FU の増殖抑制をさらに増強するのに必要であった Cop35 濃度は 500 μmol/L とかなりの高濃度であった。一方、今回のエベロリムスと Cop35 の併用では、約 1/50 の濃度である 10 μmol/L の Cop35 でほぼ同等の細胞増殖抑制効果が得られている。この点は、臨床応用を考える上で重要である。(図 5)

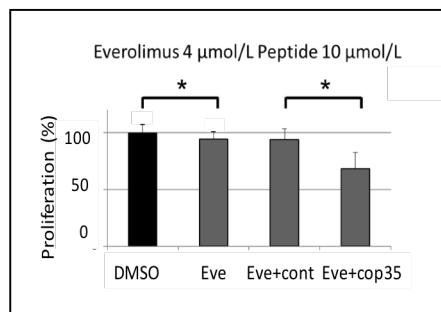


図 5 エベロリムスへの Cop35 の併用効果

そこでエベロリムスの作用を western blotting で調べたところ、mTORC1 のリン酸化が有意に減少しており、オートファジーの亢進がみられた。エベロリムスは mTORC1 の抑制剤であり、mTORC1 がオートファジーを抑制することはすでに報告されているため、エベロリムスによるオートファジーの亢進は推測できるところであった。オートファジーの指標は、オートファゴソームのマーカである LC3-II および蓄積によって肝炎や NASH から肝臓を引き起こす蛋白質である p62 である。更にエベロリムスに Cop35 を併用すると、エベロリムスで増加した LC3-II が抑制され、減少した p62 の回復が見られた。即ち Cop35 によるオートファジーの抑制が示されたわけである。(図 6)

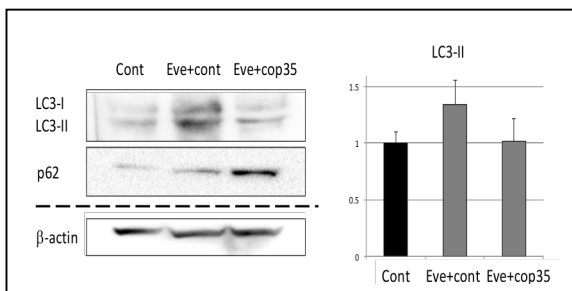


図 6 オートファジーに対するエベロリムスおよび Cop35 の併用効果

ここで、RBE において Cop35 が GRP78 と結合することが分かっているため、エベロリムスにより誘導されたオートファジーへの GRP78 の存在を検討した。オートファジーを誘導する GRP78 の作用が Cop35 の結合により抑えられることが推測されたため、Cop35 と GRP78 を解離させて細胞増殖に与える変化を検討することとした。解離には両者の結合を介在するクラスリンの欠失を考えたが、クラスリン不在では Cop35 は細胞内に移行することは不可能になる。そこで次に Cop35 の投与濃度に注目した。

Cop35 濃度が $10 \mu\text{M}$ 以下では GRP78 は Cop35 と結合しているが $20 \mu\text{M}$ 以上になると離れることが免疫沈降で確認されたため(図 7)、高濃度の Cop35 投与による Cop35 と GRP78 の解離が増殖抑制に及ぼす影響を検討した。その

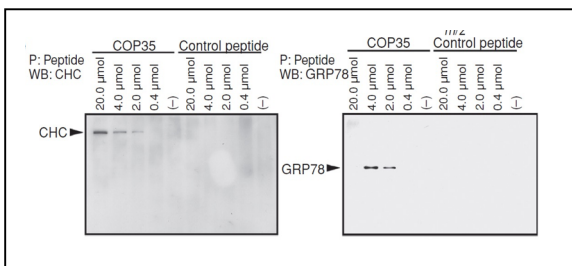


図 7 GRP78 からの Cop35 の濃度依存性解離

結果、エベロリムスの増殖抑制効果に対して、低濃度の Cop35 の併用で起きていた増強効果が $100 \mu\text{M}$ 高濃度の Cop35 併用時には消滅し

ており、解離によって GFP78 の働きが回復したことが示された。(図 8)

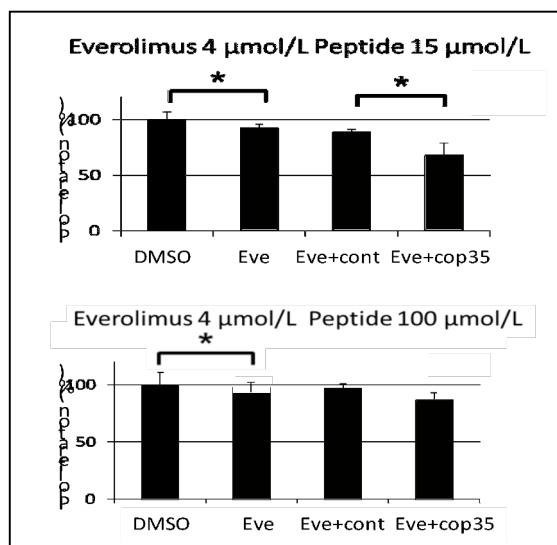


図 8 Cop35 の解離による抑制効果の消失

この結果は、proteasome の阻害剤である bortemib が myeloma に抵抗性を獲得する機序と類似している(Malek, Oncotarget 3098-, 2014, 5). 即ち、bortemib 投与により GRP78 が高発現するが、糖尿病阻害薬の metformin の併用により GRP78 が抑制され、さらにオートファジーも抑制されて細胞増殖が抑制されるというものであり、我々の結果を支持するところであった。

結語 Cop35 は胆管癌 RBE において、GRP78 と結合してその作用を抑えることでエベロリムスにより誘導されるオートファジーを抑制し、エベロリムスの増殖抑制効果を増強させることが明らかになった。以上より、chloroquine や 3MA の合成薬品ではなく、比較的 low 濃度の Cop35 とエベロリムスの併用で、エンドサイトを介したオートファジーが抑制され、胆管癌に対するエベロリムスの効果が増強されることが示され、臨床応用の可能性がさらに示唆された。

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 20 件 全て査読あり)

1. Nomogram predicting long-term survival after the diagnosis of intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma following an initial liver resection. Notake T, Kobayashi A, Shinkawa H, Kawahara T, Shimizu A, Miyagawa SI. Int J Clin Oncol. 2017 doi: 10.1007/s10147-017-1114-1.
2. ASC induces apoptosis via activation of caspase-9 by enhancing gap junction-mediated intercellular

- communication. Kitazawa M, Hida S, Fujii C, Taniguchi S, -- Kobayashi A, Takeoka M, Miyagawa S. Plos One 2017 Jan 5;12(1):e0169340.
3. Surgery for chronic mesh infection occurred 10 years after sacrectomy - Mesh resection and mesenteric leaf repair: A case report. Koyama M, Miyagawa Y, Yamamoto Y, Kitazawa M, Suzuki A, Ishizone S, Miyagawa S. Int J Surg Case Rep. 2016 Oct 26;30:215-217. doi:
 4. Adjuvant Oral Uracil-Tegafur with Leucovorin for Colorectal Cancer Liver Metastases: A Randomized Controlled Trial. Hasegawa K, Saiura A, Takayama T, Miyagawa S, et al. PLoS One. 2016 Sep 2;11(9): e0162400. doi: 10.1371/journal.pone.0162400. eCollection 2016.
 5. Correlation between the serum levels of type IV collagen 7s domain and the risk of intractable ascites following liver resection for hepatocellular carcinoma: A propensity score-matched analysis. Shimizu A, Kobayashi A, Yokoyama T, Motoyama H, Sakai H, Kitagawa N, Notake T, Shirota T, Fukushima K, Miyagawa S. Surgery. 2016 Aug 5. pii: S0039-6060(16)30299-9. doi: 10.1016/j.surg.2016.06.024.
 6. Clinicopathological characteristics of non-B non-C hepatocellular carcinoma without past hepatitis B virus infection. Kimura T, Kobayashi A, Tanaka N, Sano K, Komatsu M, Fujimori N, Yamazaki T, Shibata S, Ichikawa Y, Joshita S, Umemura T, Matsumoto A, Horiuchi A, Mori H, Wada S, Kiyosawa K, Miyagawa S, Tanaka E. Hepatol Res. 2016 Jun 11. doi: 10.1111/hepr.12762
 7. Neuroendocrine tumor of the common bile duct. Hosoda K, Kobayashi A, Shimizu A, Kitagawa N, Ito T, Yamada A, Miyagawa S. Surgery. 2016;160(2):525-6.
 8. Contrast-enhancement ratio on multiphase enhanced computed tomography predicts recurrence of pancreatic neuroendocrine tumor after curative resection. Arai T, Kobayashi A, Fujinaga Y, Yokoyama T, Shimizu A, Motoyama H, Kitagawa N, Notake T, Shirota T, Fukushima K, Masuo H, Kadoya M, Miyagawa S. Pancreatology. 2016;16(3):397-402.
 9. Living-Donor Liver Transplantation for Hepatic Metastasis From Meningeal Hemangiopericytoma: A Case Report. Urata K, Ikegami T, Nakazawa Y, Ohno Y, Kobayashi A, Mita A, Sano K, Kurozumi M, Miyagawa S. Transplant Proc. 2015;47(7):2274-7.
 10. Genomic spectra of biliary tract cancer. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Hiraoka N, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T. Nat Genet. 2015;47(9):1003-10.
 11. Heat Shock Protein 90 Is a Potential Therapeutic Target in Cholangiocarcinoma. Shirota T, Ojima H, Hiraoka N, Shimada K, Rokutan H, Arai Y, Kanai Y, Miyagawa S, Shibata T. Mol Cancer Ther. 2015;14(9):1985-93.
 12. Signal intensity of the pancreas on magnetic resonance imaging: Prediction of postoperative pancreatic fistula after a distal pancreatectomy using a triple-row stapler. Arai T, Kobayashi A, Yokoyama T, Ohya A, Fujinaga Y, Shimizu A, Motoyama H, Furusawa N, Sakai H, Uehara T, Kadoya M, Miyagawa S. Pancreatology. 2015;15(4):380-6.
 13. Multicenter comparative study of laparoscopic and open distal pancreatectomy using propensity score-matching. Nakamura M, Wakabayashi G, Miyasaka Y, Tanaka M, Morikawa T, Unno M, Tajima H, Kumamoto Y, Satoi S, Kwon M, Toyama H, Ku Y, Yoshitomi H, Nara S, Shimada K, Yokoyama T, Miyagawa S, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2015;22(10):731-6.
 14. Postoperative complications in elderly patients with gastric cancer. Takeuchi D, Koide N, Suzuki A, Ishizone S, Shimizu F, Tsuchiya T, Kumeda S, Miyagawa S. J Surg Res. 2015;198(2):317-26.
 15. Successful living donor liver transplantation for acute liver failure after acetylsalicylic acid overdose. Shirota T, Ikegami T, Sugiyama S, Kubota K, Shimizu A, Ohno Y, Mita A, Urata K, Nakazawa Y, Kobayashi A, Iwaya M, Miyagawa S. Clin J Gastroenterol. 2015;8(2):97-102.
 16. Biliary tract variations of the left liver with special reference to the left medial sectional bile duct in 500 patients. Furusawa N, Kobayashi A, Yokoyama T, Shimizu A, Motoyama H, Kanai K, Arakura N, Yamada A, Kitou Y, Miyagawa S. Am J Surg. 2015;210(2):351-6.
 17. Features of acute liver congestion on gadoxetate disodium-enhanced MRI in a rat model: Role of organic anion-

- transporting polypeptide 1A1. Shimizu A, Kobayashi A, Motoyama H, Sakai H, Yamada A, Yoshizawa A, Momose M, Kadoya M, Miyagawa S. J Magn Reson Imaging. 2015;42(3):828-36.
18. Impact of advanced age on the short- and long-term outcomes in patients undergoing hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a single-center analysis over a 20-year period. Motoyama H, Kobayashi A, Yokoyama T, Shimizu A, Sakai H, Furusawa N, Notake T, Kitagawa N, Arai T, Yokoi K, Okubo Y, Miyagawa S. Am J Surg. 2015;209(4):733-41.
19. Laparoscopic repair for a previously unreported form of ventral hernia on the right iliac fossa in an elderly emaciated woman. Yokoyama T, Kobayashi A, Shimizu A, Motoyama H, Miyagawa S. Hernia. 2015; 19(5): 841-3
20. Liver failure after hepatocellular carcinoma surgery. Motoyama H, Kobayashi A, Yokoyama T, Shimizu A, Furusawa N, Sakai H, Kitagawa N, Ohkubo Y, Tsukahara T, Miyagawa S. Langenbecks Arch Surg. 2014 Dec;399(8):1047-55.

[学会発表] (計 4 件)

1. 横井謙太、小林 聡、北沢将人、本山博章、清水 明、竹岡みち子、宮川眞一 胆管癌細胞特異的結合ペプチドによるオートファジーを介した胆道癌抗腫瘍効果の検討 第 117 回日本外科学会定期学術集会 (2017. 4. 27-29 横浜)
2. 横井謙太、小林 聡、本山博章、北沢将人、清水 明、竹岡みち子、宮川眞一 胆道癌における AKT/mTOR シグナル経路を介したソラフェニブ耐性メカニズム 第103回日本消化器病学会総会 (2017. 4. 20-22 東京)
3. 横井謙太、小林 聡、北沢将人、本山博章、清水 明、宮川眞一 胆道癌と肝細胞癌におけるソラフェニブ感受性の差異に関する基礎研究 第 59 回消化器病学会 甲信越支部例会 (2016. 11. 19-20 山梨)
4. 横井 謙太、小林 聡、竹岡みち子、宮川眞一 胆道癌細胞株と肝細胞癌細胞株におけるオートファジー と細胞増殖の検討 第 53 回日本癌治療学会学術集 (2015. 10. 29-31 京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 眞一 (MIYAGAWA, Shin-ichi)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号: 80229806

(2) 研究分担者

小林 聡 (KOBAYASHI, Akira)

信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号: 90334903

清水 明 (SHIMIZU, Akira)
信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・講師
研究者番号: 00447773

本山 博章 (MOTOYAMA, Hiroaki)
信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・助教
研究者番号: 20569587