

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462036

研究課題名(和文) 肝胆膵領域癌での炎症性シグナルとしてのNF-kappaB活性と癌悪性度との関連性

研究課題名(英文) Inflammation-associated NF-kappaB activation promotes tumor progression in hepato-biliary-pancreatic cancer.

研究代表者

久保木 知 (Kuboki, Satoshi)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50571410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝胆膵領域癌において、Pin1を介したNF-kappaB活性亢進は腫瘍増殖能を高め、腫瘍浸潤能を増強することにより腫瘍悪性度を増加させた。その結果、肝胆膵領域癌においてPin1高発現は独立した予後不良因子であった。また、In vivo及びanimal modelにおいて、Pin1 inhibitorであるJugloneおよびPiBによる治療は肝胆膵領域癌の腫瘍増殖を抑制し、有用な治療法となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pin1-mediated NF-kappaB activation induced tumor cell proliferation and enhanced EMT, which promoted tumor progression in hepato-biliary-pancreatic cancer. Therefore, increased Pin1 expression in cancer cells was an independent prognostic factor after curative operation. Moreover, Pin1 inhibitors, PiB and Juglone, suppressed tumor cell proliferation in vitro and in animal model. Based on these results, we concluded that Pin1 was a potentially useful therapeutic target in patients with hepato-biliary-pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：Pin1 NF-kappaB 肝胆膵領域癌

1. 研究開始当初の背景

肝胆膵領域癌は集学的治療の進歩にもかかわらず、未だ予後不良である。癌と炎症は密接な関係があり、NF- κ B の活性亢進は肝細胞癌 (HCC)、膵癌などの様々な肝胆膵領域癌で腫瘍増殖を促進する予後不良因子として報告されている。しかし一方で NF- κ B は cell survival に必須であり、その完全抑制は個体死を惹起するため、NF- κ B そのものを標的とした癌治療は臨床応用されていない。今回、peptidyl-prolyl isomerase の一種である Pin1 に注目した。Pin1 は特定蛋白の phospho (p)-Ser/Thr 残基に結合し、蛋白の分子構造を変化させる事により特定蛋白を活性化する。NF- κ B では Pin1 が NF- κ B-p65 の p-Thr254 残基に結合して NF- κ B の分子構造変化を誘導する事により Ser276 残基のリン酸化を介して DNA binding を可能とし、NF- κ B 活性を亢進させる。我々は以前、肝 I/R 障害時には肝細胞内 Pin1 発現低下に伴い Pin1-NF- κ B-p65 複合体形成が低下して NF- κ B 活性が抑制される事、Pin1 を介した NF- κ B 活性亢進は apoptosis を抑制し、cell survival を促進する事を報告した。また軽度障害肝では Pin1-NF- κ B-p65 複合体形成の促進、NF- κ B 活性の亢進を介して肝切除後の肝再生が促進される事、高度障害肝では Pin1 発現低下に伴って Pin1-NF- κ B-p65 複合体形成及び NF- κ B 活性が低下し、肝再生が抑制される事を示した。以上より、肝胆膵領域癌での Pin1 による NF- κ B 活性亢進を介した腫瘍増殖機序の詳細を解明する事を目的として、この研究を計画した。HCC における Pin1 発現増強は発癌や腫瘍増殖促進に関与するとの報告が散見されるが *in vitro* での実験が中心であり、NF- κ B 活性との関連、臨床病理学的因子や予後との関連の報告はない。また、膵癌や胆道癌における Pin1 発現を検討した報告は *in vitro* でも *in vivo* でも存在しない。よって今回、臨床検体にて根治手術を施行した HCC、膵癌、胆管癌における Pin1 発現、Pin1-NF- κ B-p65 複合体発現、NF- κ B-p65 (p-Thr254 及び p-Ser276) の核内発現、NF- κ B 活性などを評価し、Pin1 による NF- κ B 活性亢進機序を解明すると共に Pin1 の cell cycle、血管新生、apoptosis、癌浸潤能 (EMT) などへの関与を追及すること、また、肝胆膵領域癌における Pin1 発現の臨床病理学的意義や予後因子としての可能性を究明することを目的とした。続いて *in vitro* にて様々な HCC・膵癌・胆管癌細胞株における Pin1 発現を評価し、Pin1 発現が NF- κ B 活性、cell cycle、apoptosis、EMT などに及ぼす影響を検討して、Pin1 を介した腫瘍増殖促進機序の詳細を解明するとともに、Pin1 inhibitor である Juglone 投与が NF- κ B 活性を抑制し、腫瘍細胞増殖を抑制し得るかを評価し、Pin1 制御による分子標的治療の可能性を追及することを目的とした。肝胆膵領域癌において Pin1 発現を調節する因子は解明されていない。最近、乳癌において転写因子の一種である foxo1 (FOXO1) 活性亢進が Pin1 発現を増強すると報告された。*In vitro* における FOXO1 の腫瘍増殖作用の報告は様々な癌

種において散見されるが、肝胆膵領域癌における FOXO1 発現及びその作用機序を検討した報告は殆どなく、Pin1 との関連について言及した報告もない。よって今回、HCC、膵癌、胆管癌における FOXO1 発現を評価し、Pin1 発現や予後との関連を検討した。また *in vitro* にて FOXO1 knockdown が Pin1 発現低下を介して NF- κ B 活性を低下させる事により抗腫瘍効果を発揮するかを検討し、肝胆膵領域癌における新たな治療標的を探求した。さらに今回、peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) に注目した。PPAR γ は脂質代謝を調節する転写因子だが、我々は以前、肝 I/R 障害で PPAR γ 活性亢進は抗炎症作用を示し、apoptosis を抑制する事により組織障害を軽減すると報告した。これらの PPAR γ の作用は様々な悪性腫瘍において抗腫瘍効果を発揮すると予測される。また、PPAR γ 活性は NF- κ B 活性を negative regulate し得るが、肝胆膵領域癌における PPAR γ の抗腫瘍効果の詳細な機序は解明されておらず、予後との関連の報告はない。よって、肝胆膵外科領域癌における NF- κ B-PPAR γ interaction と FOXO1-Pin1-NF- κ B cascade の相互作用を解明し、両シグナルの同時制御による強力な分子標的治療の開発を目指す。

2. 研究の目的

肝胆膵領域癌における Pin1 を介した NF- κ B 活性亢進及び腫瘍増殖促進機序を解明し、Pin1 制御が有用な分子標的治療となり得るかを評価して、新たな治療薬の開発を目指す。本研究で目的とする Pin1 を介した腫瘍増殖促進機序の解明は、悪性度が高く未だ予後不良である種々の肝胆膵領域癌に対し、共通して広く、強力な効果を発揮し、また、副作用発現が少ない、画期的な新規分子標的治療薬の開発につながると期待され、多くの患者にとって大きな福音をもたらし得る、大変意義のある研究であると確信し本研究を立案した。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体を用いた HCC における Pin1 を介した NF- κ B 活性亢進機序及びその意義の検討

根治手術を施行した HCC の癌部及び非癌部肝組織を採取。コントロールとして転移性肝癌患者の正常肝組織を採取。また、術前後の HCC 患者より血清採取。Pin1 発現を免疫染色にて評価。採取組織より whole tissue lysate を抽出し、western blot で Pin1 発現を確認。HCC 内 Pin1 発現の高低で 2 群に分類し、臨床病理学的因子や根治手術後の予後を比較。HCC 癌部及び非癌部より nuclear extract を抽出。EMSA にて NF- κ B 活性を評価。Pin1 の結合部位である p-NF- κ B-p65(Thr254) やその結果にリン酸化される p-NF- κ B-p65(Ser276) の発現を評価し、Pin1 を介した NF- κ B 活性亢進機序を解明。HCC における Ki-67 発現や CD34 発現を免疫染色で評価し、Pin1 発現の cell cycle や腫瘍血管新生に及ぼす影響を検討。TUNEL 染色及び免疫染色や western blot 法による cleaved caspase-3 などの発現の評価

により、Pin と apoptosis の関連を検討。さらには、MMP-9、E-cadherin 等の癌 間質 相互反応に關する因子を評価して、Pin1 の EMT を介した浸潤能亢進作用を解明。HCC における FOXC1 発現を免疫染色、western blot で評価し、Pin1 発現、NF- κ B 活性、腫瘍増殖関連因子、臨床病理学的因子及び予後との関連を検討し、FOXC1 による Pin1 増強を介した腫瘍増殖促進の可能性を追求。

(2) HCC cell line における Pin1 抑制による腫瘍増殖抑制機序の解明

代表的 HCC cell line の HuH-7 cell と HepG2 cell において siRNA transfection で Pin1 を knockdown し、細胞増殖を評価。Cell lysate 及び nuclear extract を抽出し、NF- κ B 活性、p-NF- κ B-p65(Ser276 及び Thr254)発現、I κ B α 発現を評価。BrdU incorporation assay にて cell cycle、cleaved caspase-3 発現にて apoptosis、cell invasion assay にて浸潤能を評価し、Pin1 knockdown による抗腫瘍効果の分子生物学的機序を解明。Juglone (0-50 μ M)投与による抗腫瘍効果を検討し、Pin1 制御による分子標的治療の可能性を追求。

(3) 動物実験による Pin1 inhibitor の分子標的薬としての有用性の証明

HCC 皮下移植マウスに対して、細胞移植後 4 週間、様々な濃度の Juglone を腹腔より 1 日 2 回、連日投与。生食(control)投与と比較して腫瘍進展や NF- κ B 活性に關する因子の発現を抑制し得るかを腫瘍サイズ、H-E 染色、Ki-67 発現などで評価。また、各 HCC より whole tissue lysate 及び nuclear extract を抽出、EMSA にて NF- κ B 活性を測定。また、採血にて ALT、Cre 値などを測定すると共に、肝、腎、肺を摘出し、組織学的な障害発現の程度や各組織での NF- κ B 活性の変化を評価する事によって、Juglone の腹腔内投与における副作用発現を検討。

(4) HCC における PPAR γ 活性亢進による抗腫瘍効果発現の検討

HCC での PPAR γ 発現を免疫染色や western blot で評価し、PPAR γ 発現が PPAR γ 活性及び NF- κ B 活性に及ぼす影響や cell cycle、腫瘍血管新生、apoptosis への関与を臨床検体で評価し、PPAR γ の腫瘍増殖抑制機序を解明。PPAR γ 高発現の HuH-7 cell と PPAR γ 低発現の HepG2 cell を各々 0-50 μ M の 15d-PGJ2 (PPAR γ agonist)で刺激し、PPAR γ 発現、PPAR γ 活性、NF- κ B 活性、cell cycle シグナル、細胞死(apoptosis 及び necrosis)、細胞増殖などを評価し、15d-PGJ2 の抗腫瘍効果を分子レベルで解明。Pin1 抑制に伴う PPAR γ 活性の変化を分子生物学的に評価する事により、HCC における Pin1 を介した NF- κ B-PPAR γ interaction を証明し、治療標的としての意義を追求。

(5) 他の肝胆膵領域癌における Pin1 を介した腫瘍増殖機序及び治療標的としての可能性の追求

根治手術を施行した膵癌及び胆嚢癌における Pin1 発現などを評価し、臨床病理学的因子、予後、血管新生、cell cycle、apoptosis、EMT、NF- κ B 活性関連因子などとの関連を検討。種々の膵癌及び胆嚢癌細胞株の Pin1

発現の強弱による細胞増殖能の差異を検討。各細胞株の Pin1 を knockdown し、NF- κ B 活性関連因子や腫瘍増殖関連因子の変化を評価。In vitro で証明した Pin1 抑制による抗腫瘍効果をマウスにて証明。

4. 研究成果

当教室の 146 例の初回肝切除 HCC における Pin1 発現の腫瘍進展への影響を評価し、肝切除術後の早期再発予測因子としての精度を検討したところ、HCC における Pin1 強発現群は弱発現群と比較して根治的肝切除後の予後が不良であり、術後 3 年以内の早期再発が多かった。多変量解析にて、HCC 内 Pin1 高発現は術後の独立した予後予測因子・早期再発予測因子だった。その精度を ROC 解析で PIVKA-II や AFP などと比較すると、Pin1 が既存のバイオマーカーよりも早期再発予測因子として高精度で有用である事が示された。Pin1 による HCC 増殖促進機序として、Pin1 が HCC のリン酸化 p65(Thr276)を認識して結合し、Pin1-NF- κ B-p65 複合体形成の結果として p65(Ser276)がリン酸化され、NF- κ B 活性が亢進する経路が確認された。Pin1 による NF- κ B 活性亢進は cell cycle 亢進、腫瘍血管新生促進、apoptosis 抑制を介して HCC の腫瘍径増大・門脈腫瘍浸潤増強を促進した。In vitro で HCC cell を Pin1 inhibitor で刺激すると、NF- κ B 活性抑制を介して用量依存性に細胞増殖が抑制され、Pin1 をターゲットとした分子標的治療の可能性も示唆された。また、PPAR γ 活性は NF- κ B 活性と逆相関し、NF- κ B-PPAR γ interaction の治療標的としての可能性も示唆された。PPAR γ 高発現 HCC は有意に予後良好であった。SCID マウスを用いて肝癌細胞株の皮下移植モデルを作成し、Pin1 inhibitor である PiB で治療すると、PiB 投与群の腫瘍径は非投与群と比較し有意に小さく、腫瘍内の p-NF- κ B-p65(Ser276)発現および NF- κ B 活性が有意に抑制されていた。PiB 投与群の腫瘍内 p27(kip1)発現増強および cyclin D1 発現低下も認められ、その結果として cell cycle arrest が誘導された。さらに PiB 投与群の腫瘍細胞ではアポトーシスが亢進しており、腫瘍内 survivin 発現の低下と cleaved caspase-3 発現の増加が観察された。一方で PiB 投与マウスにおいて、体重減少や肝、肺、腎に対する障害などの明らかな副作用は認められなかった。よって、PiB は HCC に対する安全で有用な新規治療薬として期待された。

また、当院にて初回膵切除を行った浸潤性膵管癌 120 例を対象とし、抗 Pin1 抗体で免疫染色を施行し、発現の高低で 2 群に分類し臨床病理学的因子や予後を比較検討したところ、浸潤性膵管癌の約半数で Pin1 発現は増強していた。Pin1 発現は腫瘍径増大、脈管侵襲陽性、高度膵周囲浸潤、CA19-9 高値との関連が示唆され、Pin1 高発現は独立した予後不良因子であった。膵癌における vimentin と Pin1 の発現は正相関を示し、E-cadherin と Pin1 の発現は逆相関を示したことより、Pin1 は EMT 状態の

維持に關与する事が示唆された。膵癌細胞株を用いてTGFβ1刺激によるEMT誘導へのPin1の役割を評価したところ、Pin1はEMT誘導、EMT状態の維持に必要であり、転写因子であるSnailやZeb-2が關与することが示された。Pin1 knockdownやPin1 inhibitor投与は腫瘍細胞増殖を低下し、腫瘍細胞浸潤を抑制した。これらの結果より、Pin1発現はEMT亢進状態を維持する事により浸潤性膵管癌の腫瘍浸潤能を増強させ、腫瘍進展を促進することが示唆された。Pin1高発現は浸潤性膵管癌に対する根治手術後における有意な予後不良因子であった。よって、Pin1は浸潤性膵管癌において有用な治療標的因子になり得ると考えられた。

さらには胆道癌のひとつである胆嚢癌におけるPin1の意義を検討したところ、胆嚢癌においてもPin1高発現は有意な予後不良因子であった。胆嚢癌ではPin1発現とNF-kappaB活性亢進およびSTAT3活性亢進が有意に相関しており、その結果、EMTマーカー発現増強を介して腫瘍浸潤能が亢進していた。In vitroにおいて、Pin1ノックダウン及びPin1 inhibitorであるPiB刺激は、どちらもEMTマーカー発現の減弱及び浸潤能減弱を介して、胆嚢癌細胞株の悪性度を低下させた。胆嚢癌細胞株をSCIDマウスの胆嚢内に注入し、胆嚢癌を作成するモデルを確立し、同マウスをPiBで治療したところ、PiB治療群ではリンパ節転移陽性例が有意に少なく、PiBの浸潤能抑制効果を介した治療意義が示唆された。

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 3 件)

1. Maeda S, Kuboki S, Nojima H, Shimizu H, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M, Ohtsuka M.
Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) expressing in cancer cells inhibits tumor progression by suppressing CXCR2 signaling in human pancreatic ductal adenocarcinoma.
Cytokine 2017. [Epub ahead of print]
査読あり
2. Nojima H, Kuboki S, Shinoda K, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Miyazaki M.
Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits tumor growth by negatively regulating nuclear factor-κB activation in patients with hepatocellular carcinoma.
J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2016;23:574-84.
査読あり
3. Shinoda K, Kuboki S, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M.

Pin1 facilitates NF-kappaB activation and promotes tumor progression in human hepatocellular carcinoma.

Br J Surg. 2015;113:1323-31.

査読あり

[学会発表](計 8 件)

1. Kuboki S, Maeda S, Suzuki T, Nojima H, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Takano S, Suzuki D, Sakai N, Kagawa S, Miyazaki M.
Regulation of STAT3 activity by controlling the functions of Pin1 or DACR effectively inhibits tumor proliferation/invasiveness in human pancreatic ductal adenocarcinoma.
第47回日本膵臓学会大会・第20回国際膵臓学会 2016年8月4-7日 仙台国際センター(宮城県仙台市)
2. 久保木 知、篠田 公生、野島 広之、清水宏明、大塚 将之、加藤 厚、吉富 秀幸、古川 勝規、高屋敷 吏、高野 重 紹、鈴木 大亮、酒井 望、賀川 真吾、宮崎 勝.
肝細胞癌におけるPin1を介した腫瘍進展機序に基づいた系統的肝切除の有用性の検討
第25回日本癌病態治療研究会 2016年6月8-9日 三井ガーデンホテル(千葉県千葉市)
3. 久保木 知、鈴木 崇之、野島 広之、清水宏明、大塚 将之、加藤 厚、吉富 秀幸、古川 勝規、高屋敷 吏、高野 重 紹、鈴木 大亮、酒井 望、賀川 真吾、宮崎 勝.
浸潤性膵管癌の悪性度評価におけるPin1発現の有用性および治療標的因子としての可能性の検討
第116回日本外科学会定期学術集会 2016年4月14-16日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
4. Kuboki S, Shimizu H, Miyazaki M.
Pin1 promotes HCC progression and predicts poor prognosis by regulating NF-kappaB-PPAR-gamma axis.
JDDW 2015 2015年10月8日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都品川区)
5. 久保木 知、篠田 公生、野島 広之、清水宏明、大塚 将之、加藤 厚、吉富 秀幸、古川 勝規、高屋敷 吏、高野 重 紹、鈴木 大亮、酒井 望、宮崎 勝.
Pin1 inhibitorによるNF-kappaB活性抑制を介した肝細胞癌に対する分子標的治療の可能性の追求
第50回肝癌研究会 2014年6月5-6日 京都国際会館(京都府京都市)

6. 久保木 知、清水 宏明、宮崎 勝。
肝細胞癌における Pin1 発現の肝切除術後の
予後予測因子・早期再発予測因子とし
ての有用性の検討
JDDW 2014 2014年10月23-26日 神戸
国際会議場（兵庫県神戸市）
7. 鈴木 崇之、久保木 知、宮崎 勝。
浸潤性膵肝癌における Pin1 を介した腫瘍
増殖促進機序の解明及び治療標的とし
ての可能性の追求
JDDW 2014 2014年10月23-26日 神戸
国際会議場（兵庫県神戸市）
8. 久保木 知、篠田 公生、清水 宏明、
大塚 将之、加藤 厚、吉富 秀幸、宮
崎 勝。
肝胆膵領域癌における Pin1 を介した
NF-kappaB 活性亢進に伴う腫瘍増殖抑制
機序の解明及び治療標的としての可能性
の追求
第 69 回日本消化器外科学会総会 2014
年 7 月 16-18 日 ホテルハマツ（福島県
郡山市）

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保木 知 (KUBOKI, SATOSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50571410

(2)研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI, MASARU)
千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70166156

清水 宏明 (SHIMIZU, HIROAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：80272318

酒井 望 (SAKAI, NOZOMU)
千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70436385

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()