

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462076

研究課題名(和文) マイクロアレイを用いた膵癌進展におけるヒアルロン酸ネットワークの役割解析

研究課題名(英文) Functional analysis of hyaluronan network during pancreatic cancer progression using microarrays

研究代表者

佐藤 典宏 (Sato, Norihiro)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：20423527

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)：膵癌におけるヒアルロン酸ネットワークの発現およびその機能的役割について研究を行い、以下の知見を得た。1) ヒアルロン酸分解酵素HYAL1が高発現していた。2) ヒアルロン酸レセプターRHAMMの発現が膵癌で亢進しており、高発現群は予後不良であった。3) ヒアルロン酸を膵癌細胞に直接加えたところ、遊走能が亢進した。4) ヒアルロン酸の新規分解酵素KIAA1199が膵癌で発現が亢進していた。以上の所見より、膵癌ではヒアルロン酸の産生、分解、およびレセプターへの結合によるシグナル伝達が亢進しており、この一連のプロセスは膵癌の進展に重要な役割を果たしていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression and functional relevance of hyaluronan (HA) network in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). The following findings were obtained: 1) One of the hyaluronidases, HYAL1, is overexpressed in PDAC; 2) RHAMM, a specific receptor for HA, is overexpressed in PDAC and correlates with its prognosis; 3) Addition of HA to the conditioned medium of PDAC cells stimulates their migration; 4) KIAA1199, a novel HA degrading enzyme, is overexpressed in PDAC. KIAA1199 in PDAC cells is induced by inflammation and enhances malignant behaviors (proliferation, migration, and invasion). These findings suggest that the whole process of HA metabolism is activated in PDAC and may play a critical role in malignant progression.

研究分野：膵癌分子生物学

キーワード：ヒアルロン酸 膵癌 浸潤 遊走 KIAA1199

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌は豊富な間質 (desmoplasia) に特徴づけられる腫瘍であり、実際に膵癌組織の約 80 ~ 90% は間質から構成されている。その間質を構成する細胞外マトリックスの中心的なコンポーネントはヒアルロン酸であり、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸とが交互に結合した巨大な高分子化合物である。癌とヒアルロン酸との関係については以前より注目されており、種々の癌組織におけるヒアルロン酸合成の著明な増加が報告されている。ヒアルロン酸リッチな間質は癌にとって好都合であることが知られており、実際にヒアルロン酸は癌の増殖能、運動能、浸潤能、転移、血管新生を促進することが証明されている。

(2) 我々は、膵癌組織 70 例について免疫化学染色法にてヒアルロン酸の発現解析を行った。その結果、ヒアルロン酸は約 80% の膵癌において、腫瘍細胞および周囲の間質に高発現しており、またヒアルロン酸の過剰発現は膵癌患者の予後不良因子であることを見出した。すなわち、膵癌においてヒアルロン酸は浸潤能などの悪性形質獲得に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「マイクロアレイを用いた膵癌進展におけるヒアルロン酸ネットワークの役割解析」であり、以下の 3 つのテーマに沿って実験を進める。

- (1) ヒアルロン酸による膵癌細胞のフェノタイプの変化を、増殖、遊走、浸潤能に注目して調べる。
- (2) ヒアルロン酸によって導入される膵癌の遺伝子発現の変化を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析する。
- (3) マイクロアレイにて同定された遺伝子 / シグナル経路について機能的役割を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) 膵癌細胞のヒアルロン酸に対するフェノタイプの変化

膵癌の培養細胞株 10 種 (AsPC1, BxPC3, CFPAC1, Capan1, Capan2, MiaPaCa2, NOR-P1, Panc1, SW1990, SUI T2) を用い、培養液中にヒアルロン酸を添加し、増殖能、遊走能、および浸潤能の変化について調べる。正常コントロールとして不死化した正常膵管上皮細胞 HPDE を用いる。これまでの予備実験では、ヒアルロン酸を添加することにより、膵癌の増殖、遊走、および浸潤能が増加されることが判明している。

### (2) ヒアルロン酸によって導入される遺伝子解析: マイクロアレイを用いた網羅的発現解

## 析

ヒアルロン酸添加によって生物学的振る舞い (フェノタイプ) の変化が大きな膵癌セルライン 3 種を選択し、ヒアルロン酸添加の前後における遺伝子発現の変化を遺伝子発現マイクロアレイ (アフィメトリクス社、U133 シリーズ) にて解析する。

ヒアルロン酸添加によって遺伝子発現量が有意に増加するもの (増加群) と有意に減少するもの (低下群) に分類し、上位 100 遺伝子をリストアップする。同時に、得られたマイクロアレイのデータから遺伝子機能解析ソフト (Gene Ontology: GO 解析) を用いて細胞増殖、遊走、浸潤、転移、血管新生、薬剤耐性に関する遺伝子群・シグナル伝達経路を調べ、リストアップした遺伝子から機能的に重要と判断される 20 の遺伝子をピックアップする。

### (3) ヒアルロン酸関連遺伝子の機能解析

マイクロアレイにて同定したヒアルロン酸関連遺伝子のうち、膵癌の発育・進展 (特に浸潤能) に重要な役割を果たしている可能性の高い遺伝子群 (20 の候補遺伝子) を同定し、その機能的意義について以下の 2 つのモデルを作成して解析する。

#### 強制発現モデル

ターゲットとなるヒアルロン酸関連遺伝子の発現ベクターを作成し、トランスフェクション法にて発現消失細胞に遺伝子導入を行う。コントロールベクターを導入した対照クローンとターゲット遺伝子強制発現クローンをピックアップし、増殖能 (コロニー形成アッセイ)、遊走能 (トランスウェル遊走アッセイ)、浸潤能 (マトリジェル浸潤アッセイ) およびヌードマウスにおける癌進展 (膵癌同所性移植モデル) を比較する。

#### ノックダウンモデル

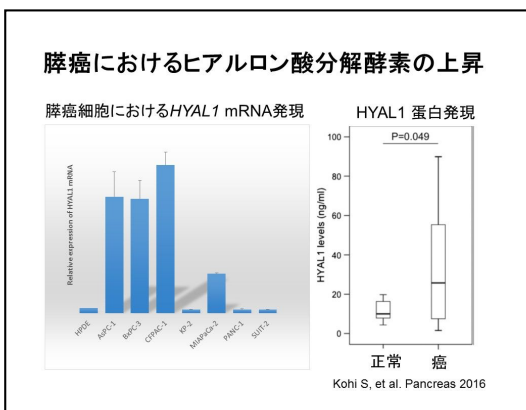
逆に、ターゲット遺伝子が維持されている膵癌細胞に対してはショートヘアピン (sh) RNA によるノックダウンモデルを作成する。作成した shRNA をベクターに組み込み、トランスフェクション法にて細胞に導入する。コントロールベクター導入クローンとターゲット遺伝子 shRNA 導入クローンをピックアップし、上記強制発現モデルと同様に増殖能、遊走能、浸潤能、および同所性移植モデルでの腫瘍増殖・転移を比較する。

## 4. 研究成果

まず代表的なヒアルロン酸関連分子について、その発現および機能的役割を解析し、以下の所見を得た。

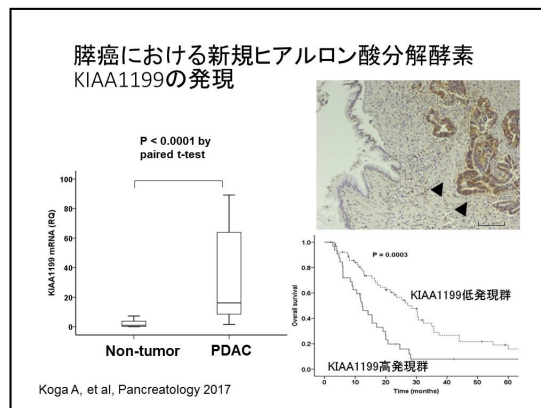
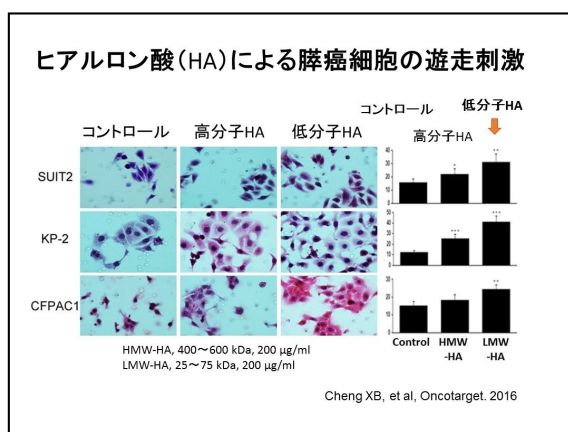
- (1) 膵癌におけるヒアルロン酸分解酵素 (ヒ

アルロニダーゼ、HYAL1、HYAL2、HYAL3)の発現を検討し、このうちHYAL1が高発現していることを見いだした。また硫酸デキストランを用いてヒアルロニダーゼを阻害したところ、膵癌細胞の遊走能が低下した (Kohi et al. Pancreas 2016)。



(2)ヒアルロン酸の特異的レセプターRHAMMの発現が膵癌で亢進しており、高発現群は予後不良であった (Cheng et al, J Cancer 2016)。

(3)膵癌細胞に対するヒアルロン酸の役割を解析するために、ヒアルロン酸を膵癌細胞の培養上清中に直接加えたところ、(特に低分子ヒアルロン酸は)細胞の遊走能が増加した。一方でヒアルロン酸の阻害剤を投与すると、膵癌細胞の遊走は阻害された。また膵癌細胞と線維芽細胞を共培養したところ、培養上清中のヒアルロン酸が著明に増加し、同時に膵癌の遊走能が増加した (Cheng et al. Oncotarget 2016)。



(4)ヒアルロン酸の新規分解酵素として最近発見された KIAA1199 (CEMIP/HYBID) が膵癌で発現が亢進しており、発現が高い患者の予後は不良であった (Koga et al, Pancreatology 2017)。

(5)膵癌細胞において KIAA1199 の発現は炎症によって誘導され、膵癌細胞の増殖、遊走、浸潤能と関連していた (Kohi et al. Oncotarget 2017)。

以上の所見より、膵癌ではヒアルロン酸の産生、分解、およびレセプターへの結合によるシグナル伝達が亢進しており、この一連のプロセスは膵癌の進展に重要な役割を果たしていることが考えられた。

## 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9件)

1. Kohi S, Sato N, Koga A, Matayoshi N, Hirata K. KIAA1199 is induced by inflammation and enhances malignant phenotype in pancreatic cancer. *Oncotarget* 2017;**8**: 17156-63. (査読有)

2. Koga A, Sato N, Kohi S, Yabuki K, Cheng XB, Hisaoka M, Hirata K. KIAA1199/CEMIP/HYBID overexpression predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* 2017;**17**: 115-22. (査読有)

3. 佐藤 典宏. ヒアルロン酸をターゲットにした膵癌治療の最前線. *膵臓* 2016;**31**: 128-34. (査読有)

4. Sato N, Kohi S, Hirata K, Goggins M.

Role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy: Once again in the spotlight. *Cancer Sci* 2016;**107**: 569-75. (査読有)

5. Sato N, Cheng XB, Kohi S, Koga A, Hirata K. Targeting hyaluronan for the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Acta Pharm Sin B* 2016;**6**: 101-5. (査読有)

6. Kohi S, Sato N, Koga A, Hirata K, Harunari E, Igarashi Y. Hyaluromycin, a Novel Hyaluronidase Inhibitor, Attenuates Pancreatic Cancer Cell Migration and Proliferation. *J Oncol* 2016;**2016**: 9063087. (査読有)

7. Kohi S, Sato N, Cheng XB, Koga A, Hirata K. Increased Expression of HYAL1 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* 2016;**45**(10):1467-1473. (査読有)

8. Kohi S, Sato N, Cheng XB, Koga A, Higure A, Hirata K. A novel epigenetic mechanism regulating hyaluronan production in pancreatic cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2016;**33**: 225-30. (査読有)

9. Cheng XB, Kohi S, Koga A, Hirata K, Sato N. Hyaluronan stimulates pancreatic cancer cell motility. *Oncotarget* 2016;**7**: 4829-40. (査読有)

[学会発表](計 11 件)

1. 厚井 志郎, 佐藤 典宏, 古賀 敦大, 柴尾 和徳, 平田 敬治: 膵癌での KIAA1199 の発現および機能解析. 第 75 回 日本癌学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016 年 10 月 6 日

2. 古賀 敦大, 佐藤 典宏, 厚井 志郎, 又吉 信貴, 柴尾 和徳, 平田 敬治: 膵癌における KIAA1199/CEMP の発現は予後不良のマーカーとなる. 第 75 回 日本癌学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2016 年 10 月 6 日

3. 佐藤 典宏, 厚井 志郎, 古賀 敦大, 平田 敬治: 膵癌の生物学的特徴および治療におけるヒアルロン酸の役割. 第 75 回 日本癌学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016 年 10 月 6 日

4. Sato N, Kohi S, Koga A, Hirata K: The role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy. The 20th meeting of the International Association of Pancreatology (IAP), 仙台国際センター(宮城県仙台市) 2016 年 8 月 6 日

5. Koga A, Sato N, Kohi S, Cheng XB, Hirata K. Overexpression of KIAA1199 predicts poor prognosis in pancreatic cancer. The 20th meeting of the International Association of Pancreatology (IAP), 仙台国際センター(宮城県仙台市) 2016 年 8 月 4 日

6. Kohi S, Sato N, Koga A, Cheng XB, Shibao K, Hirata K. Increased expression of hyaluronan degrading enzymes contributes to the aggressive phenotype in pancreatic cancer. The 20th meeting of the International Association of Pancreatology (IAP), 仙台国際センター(宮城県仙台市) 2016 年 8 月 6 日

7. 厚井 志郎, 佐藤 典宏, 古賀 敦大, 柴尾 和徳, 平田 敬治: 膵癌細胞における新規ヒアルロン酸分解酵素 KIAA1199 の発現および機能解析. 第 71 回 日本消化器外科学会総会、アスティとくしま(徳島県徳島市) 2016 年 7 月 15 日

8. 厚井 志郎, 佐藤 典宏, Cheng Xiao-Bo, 古賀 敦大, 平田 敬治: 膵癌におけるヒアルロン酸分解酵素(HYAL)の発現および機能解析. 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) 2016 年 4 月 14 日

9. 厚井 志郎, 佐藤 典宏, 程 曉博, 日暮

愛一郎：DNA メチル化阻害剤は膵癌のヒアルロン酸合成を促進する. 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）、2015 年 4 月 16 日

10. 厚井 志郎, 佐藤 典宏：膵癌細胞におけるヒアルロン酸合成はエピジェネティックな制御を受ける. 第 74 回 日本癌学会総会、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）、2015 年 10 月 9 日

11. 佐藤 典宏, 厚井 志郎, 程 暁博, 田村 利尚, 日暮 愛一郎：浸潤性膵管癌におけるヒアルロン酸の調節機構および機能的役割. 第 27 回 日本肝胆膵外科学会、ホテルグランパシフィック LE DAIBA(東京都港区)、2015 年 6 月 12 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 典宏 (SATO, Norihiro)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20423527