

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861089

研究課題名(和文)オートファジー抑制による新たな膵癌治療法の開発

研究課題名(英文)New treatment strategy via autophagy for pancreatic adenocarcinoma.

## 研究代表者

橋本 大輔 (HASHIMOTO, Daisuke)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80508507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー(Autophagy)は、細胞が持っている、細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つである。細胞内での異常なタンパク質の蓄積を防いだり、栄養環境が悪化したときにタンパク質のリサイクルを行う。

研究機関中約50例の通常型膵癌に対して切除手術を行った。この切除検体のオートファジーの発現を解析した。通常膵実質部に比べて癌部でオートファジーが亢進している傾向があり、臨床病理学的特徴とともに解析し進行度、予後との関連を解析している。また膵癌細胞株においてオートファジーは抗癌剤の細胞毒性に対する抵抗性を有していることが示された。これはEur J Cancerに論文発表を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a regulated process of degradation and recycling of cellular constituents. The role of autophagy in pancreatic cancer is still not clear. The aim of this study was to investigate the role of autophagy in pancreatic cancer, and to provide insights into new strategies for treatment.

During study period, about 50 patients with pancreatic cancer underwent pancreatic resection. Autophagy was significantly induced in pancreatic ductal adenocarcinoma compared to healthy pancreatic tissue in these patients. The association of autophagy status with long-term survival has been analyzed.

In pancreatic cancer cell lines, autophagy contributes to pancreatic cancer cell growth, and has a cytoprotective effect against anti-cancer drug. These data were published in Euro J Cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：オートファジー 膵癌 ゲムシタピン フルオロウラシル

1. 研究開始当初の背景

1) オートファジーについて

オートファジーとは細胞が自身をリソソームで分解する系の総称である。細胞がストレスに晒されると、細胞質成分やオルガネラなどを取り囲んだオートファゴソームが形成される(図1)。オートファゴソームは細胞内のリソソームと膜融合しオートリソソームとなりこの中で分解が起こる。

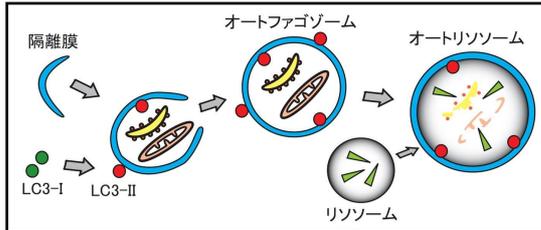


図1 オートファジーの模式図

このようにオートファジーは異常タンパク質の蓄積を防いだり、栄養飢餓時に細胞内コンポーネントのリサイクルを行い恒常性維持に参与している (Mizushima N and Komatsu M. Cell. 2011, 147, 728-41.)。

我々はこれまで遺伝子改変マウスを用いた実験的急性膵炎において、トリプシンがオートファジーの過程を介して活性化されることを明らかにするなど膵臓におけるオートファジーの役割について新たな知見を示してきた (Hashimoto D et al. J Cell Biol 2008,181,1065-1072) (図2)。

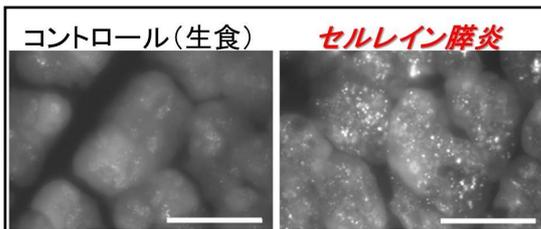


図2 急性膵炎でのオートファゴソームの誘導 (Hashimoto D. J Cell Biol 2008)

2) 膵癌とオートファジー

オートファジーは発癌や癌の発育において、重要な役割を担うことが分かってきた (Kimmelman A. Genes Dev 2011, 25, 1999-2010)。正常組織では、オートファジーは細胞内ホメオスタシスを保っているが、なんらかの原因で機能低下をきたしたときに malignant transformation が促進されてしまうと考えられている (Yang AR et al. Genes Dev 2009, 23, 798-803) (図3)。

一方進行癌においても、興味ある報告がなされている。Fujii らはヒト膵癌標本を、オートファゴソーム 関連タンパクである LC3 (図1) に対する免疫染色で解析し、膵癌組織でオートファジーが誘導されていることを示した (Fujii S et al. Cancer Sci 2008, 99, 1813-1819)。また retrospective な解析でオートファジーの程度と予後は有意に負の相関を示したと述べ、オートファジーは膵癌の発育・進展に貢献しているとした(図4)。つま

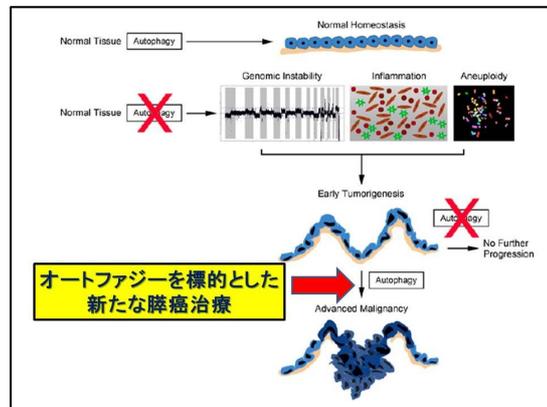


図3 Kimmelman A. Genes Dev 2011 より

り癌組織は低酸素、低栄養といったストレスにオートファジーを用いて適応していると考えた。Yang らは膵癌細胞株において生理的培養条件下でオートファジーが発現しており、オートファジー阻害薬を膵癌細胞株に投与すると、細胞増殖が阻害されたと述べた。つまり、膵癌は増殖、発育・進展のためにオートファジーを必要としていると示した。(Yang S et al. Genes Dev 2011, 25, 717-729)。

つまりオートファジーは膵癌治療における新たなターゲットとなると考えられる(図3)。本研究においては、in vivo および in vitro においてこれを証明し、あらたな膵癌治療法を開発することを目的とする。

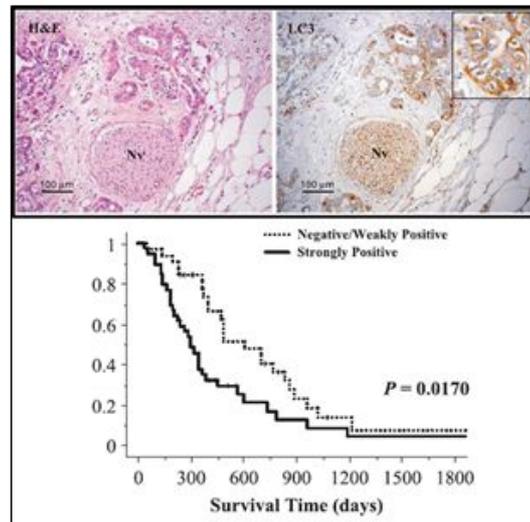


図4 ヒト膵癌におけるオートファジー (Fujii S et al. Cancer Sci 2008 より)

2. 研究の目的

膵癌は難治癌であり、抗癌剤治療の奏成功率も他の癌腫に比べて低い。本研究ではこれを発展させ以下の検証を行う。

- 1) 膵癌患者におけるオートファジーの発現と予後を解析し両者の関係を明らかにする。
- 2) 複数の膵癌細胞株を用いて、膵癌細胞にオートファジーが誘導される際のシグナル伝達系やオートファジーの意義(エネルギー代謝や DNA 修復に与える影響)を明らかにす

る。

3) 我々はこれまで膵特異的遺伝子改変マウスを作成し報告してきた(Ohmuraya M et al. Gastroenterol 2005,129,696-70, Hashimoto D et al. J Cell Biol 2008,181,1065-1072 など)。この遺伝子改変技術を用いて、新たに膵癌モデルマウスを樹立する。同マウスの膵腫瘍でオートファジーが発現することを確認する。

4) 膵癌モデルマウスを用いて、オートファジー阻害薬の抗腫瘍効果を検証する。また既存の抗腫瘍薬との併用療法の有用性と安全性を検証する。

本研究の結果から、オートファジーの発現をコントロールすることで、既存の抗癌剤治療と併用する全く新しい膵癌治療法が生まれると期待される。またオートファジーの発現の強さが癌の悪性度の指標として臨床上有用となる可能性がある。つまり新しい予後規定因子となる可能性がある。さらにオートファジーはすべての細胞に備わる機能であり、他の癌腫への応用も十分に期待できる。

### 3. 研究の方法

#### 1) 膵癌患者における、オートファジーの発現と予後との関連

我々は3症例の通常型膵癌患者の手術に際し、腫瘍と正常膵からそれぞれ生検を行なった。タンパクサンプルを生成し、LC3 に対するウェスタンブロットングを行なった。

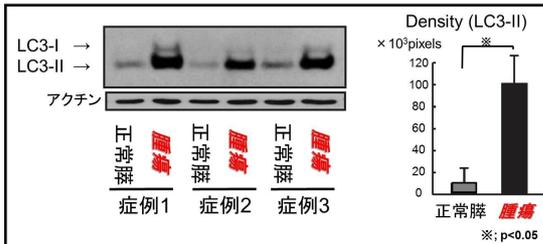


図5 ヒト膵癌組織におけるオートファジーの誘導。LC3 に対するウェスタンブロットング。

全ての症例の癌組織で、正常膵組織に比べて明らかに強く LC3-II が発現しており、オートファジーが強く誘導されていた(図 5)。当院は膵癌治療の high volume center であり、今後切除標本におけるオートファジーの誘導の程度と臨床病理学的因子や予後との関連を、retrospective に解析する。また平成 27 年度以降 prospective に解析を進める。

#### 2) 膵癌細胞にオートファジーに誘導される仕組みと、具体的な機能の解明

我々は既にフィンランドの Tampere 大学との共同研究を行い、オートファジーが生理的条件下で膵癌において活性化されていることを明らかにした(図 6)。またこれまでに膵癌細胞株 (PANC-1) に 5-fluoruracil (5-FU) またはゲムシタピン (GEM) などの抗癌剤を投与すると、強くオートファジーが誘導されることを明らかにした(図 7)。

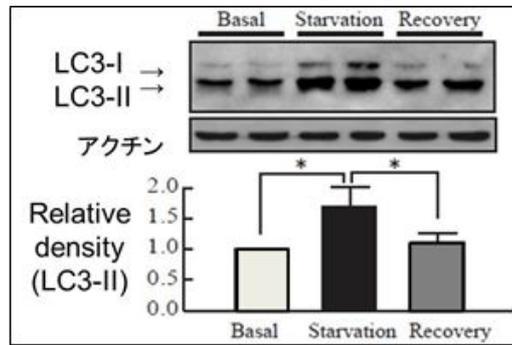


図6 膵癌細胞株 PANC-1 における生理的条件下でのオートファジー

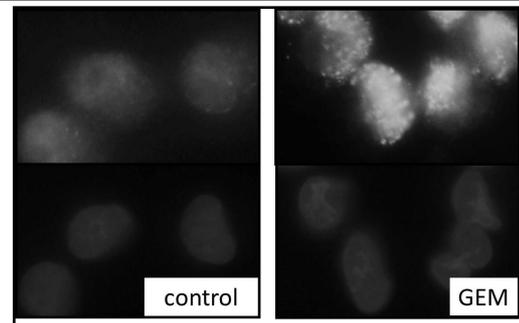
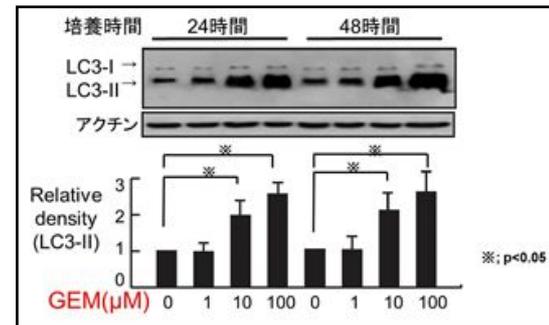


図7 PANC-1 における、抗癌剤ゲムシタピン (GEM) によるオートファジーの誘導および LC3 に対するウェスタンブロットングおよび蛍光免疫染色。

クロロキン (chloroquine; CQ) は、オートリソソームにおける分解を阻害する (Yang S et al. Genes Dev 2011, 25, 717-729)。PANC-1 に抗癌剤 5-FU または GEM と CQ を同時に投与すると、抗癌剤を単独投与した場合に比べて有意に強く細胞増殖を抑制した (図 8)。また CQ は単独でも PANC-1 の細胞増殖を抑制した。つまり、オートファジーは膵癌の成長に積極的に関与しており、抗癌剤に対して細胞保護的に働いていることが明らかとなった。本研究では更に膵癌細胞にオートファジーが誘導される際のシグナル伝達系 (mTOR, Becn1 など) やオートファジーの意義 (エネルギー代謝や DNA 修復に与える影響) を明らかにする。

#### 3) 遺伝子改変技術を用いた、膵癌モデルマウスの樹立

我々は以前、熊本大学生命資源研究・支援センター准教授大村谷昌樹とともに Rat elastase I promoter/enhancer を用いて膵特

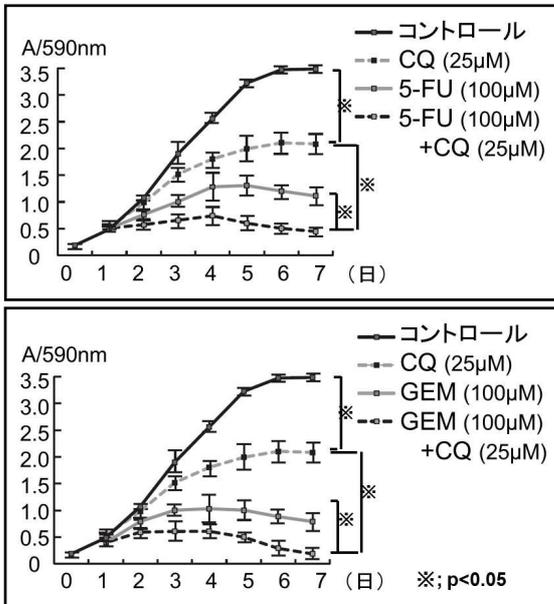


図8 PANC-1における抗癌剤5-FUおよびGEMとオートファジー阻害薬CQの併用の影響。細胞増殖曲線を示す。

異的 Cre 発現マウスを樹立した (Hashimoto D et al. J Cell Biol 2008, 181, 1065-1072)。これを用いて、膵特異的に変異型癌遺伝子 K-RasG12V を発現するマウスを作成する (Elas/K-RasG12V) (図9)。Elas/K-RasG12V マウスを p16/p19 ノックアウトマウス (Serrano M et al. Cell 1996, 85, 27-37) と交配することで膵癌モデルマウスを樹立する。

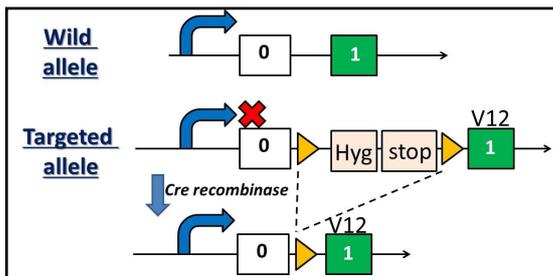


図9 変異型 K-Ras 発現マウス

膵癌モデルマウスの膵腫瘍においてオートファジーが発現することを、LC3 の免疫染色およびウェスタンブロッティングを用いて in vivo で確認する。

#### 4) 膵癌マウスを用いたオートファジー阻害薬の抗腫瘍効果の検証

膵癌モデルマウスを用いて、オートファジー阻害薬 CQ の抗腫瘍効果 (奏効率、生存曲線) と安全性を in vivo で検証する。また抗癌剤 5-FU や GEM との併用投与の効果と安全性を検証し、臨床応用を目指す。

#### 4. 研究成果

##### 1) 膵癌患者における、オートファジーの発現と予後との関連

2013 年 4 月から現在まで約 50 例の通常型膵癌に対して切除手術を行った。この症例の切

除検体 (癌部および通常膵実質部) (図 10) を用いて、オートファゴゾームのマーカである LC3 に対するウェスタンブロッティングを行っている。

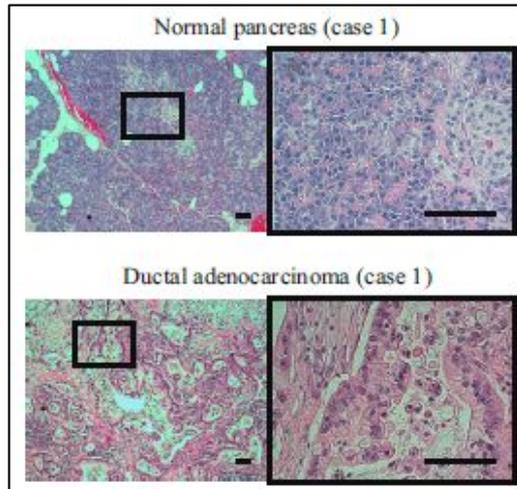


図10 膵癌切除組織

通常膵実質部に比べて癌部で LC3 の発現が亢進している傾向があり、臨床病理学的特徴とともに解析し進行度、予後との関連を解析している。

##### 2) 膵癌細胞にオートファジーに誘導される仕組みと、具体的な機能の解明

膵癌細胞株 PANC-1 で見られたオートファジーの特徴を確認するために、膵癌細胞株 BxPC-3 を用いて実験を行った。BxPC-3 では PANC-1 と同様に通常培養条件下で LC3 の発現が見られ、つまりオートファジーが発現していた。オートファジー阻害薬クロロキンにより BxPC-3 の細胞増殖は抑制され、抗癌剤 5-FU またはゲムシタピンと併用した場合さらに強く細胞増殖が抑制された (図 11)。

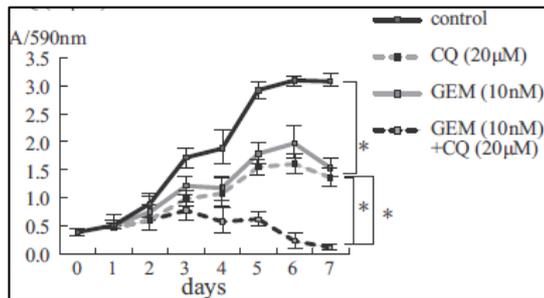
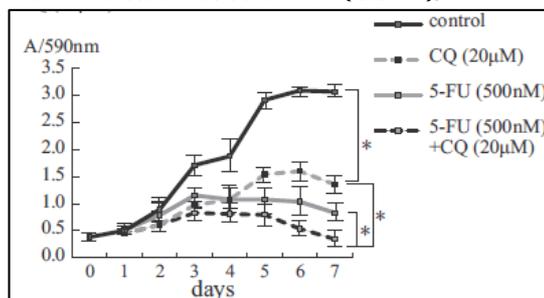


図11 BxPC-3における抗癌剤5-FUおよびGEMとオートファジー阻害薬CQの併用の影響。細胞増殖曲線を示す。

つまり、BxPC-3 においてもオートファジーが

細胞保護的に働いていることが示された。この結果は、Eur J Cancer に論文発表を行った。

#### 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 7 件) 全て査読有

Hashimoto D, Chikamoto A, Taki K, Arima K, Yamashita Y, Ohmuraya M, Hirota M, Baba H. Residual total pancreatectomy: Short- and long-term outcomes. *Pancreatology*. 2016 May 6. pii: S1424-3903(16)30048-5. doi: 10.1016/j.pan.2016.04.034. [Epub ahead of print]

Hashimoto D, Chikamoto A, Arima K, Taki K, Inoue R, Imai K, Yamashita Y, Baba H. Unused sterile instruments for closure prevents wound surgical site infection after pancreatic surgery. *J Surg Res*. 2016. [in press] doi:10.1016/j.jss.2016.02.044

Hashimoto D, Arima K, Yokoyama N, Chikamoto A, Taki K, Inoue R, Kaida T, Higashi T, Nitta H, Ohmuraya M, Hirota M, Beppu T, Baba H. Heterogeneity of KRAS Mutations in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*. 2016 Mar 10. [Epub ahead of print] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26967456>

Zhou L, Baba Y, Kitano Y, Miyake K, Zhang X, Yamamura K, Kosumi K, Kaida T, Arima K, Taki K, Higashi T, Imai K, Hashimoto D, Yamashita Y, Chikamoto A, Beppu T, Tan X, Baba H. KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations, and patient prognosis in 126 pancreatic cancers: pyrosequencing technology and literature review. *Med Oncol*. 2016;33(4):32. doi:10.1007/s12032-016-0745-9.

Hashimoto D, Chikamoto A, Ohmuraya M, Abe S, Nakagawa S, Beppu T, Takamori H, Hirota M, Baba H. Impact of Postoperative Weight Loss on Survival After Resection for Pancreatic Cancer. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2015;39(5):598-603. doi: 10.1177/0148607114520992.

Hashimoto D, Chikamoto A, Miyanari N, Ohara C, Kuramoto M, Horino K, Ohshima H6, Baba H. Recombinant soluble thrombomodulin for postoperative

disseminated intravascular coagulation. *J Surg Res*. 2015 Aug;197(2):405-11. doi:10.1016/j.jss.2015.04.048.

Hashimoto D, Chikamoto A, Sakata K, Nakagawa S, Hayashi H, Ohmuraya M, Hirota M, Yoshida N, Beppu T, Baba H. Staging laparoscopy leads to rapid induction of chemotherapy for unresectable pancreatobiliary cancers. *Asian J Endosc Surg*. 2015 Feb;8(1):59-62. doi:10.1111/ases.12138.

[学会発表](計 3 件)

坂田和也、大村谷昌樹、橋本大輔、阿部真也、新田英利、林洋光、近本亮、別府透、馬場秀夫、「オートファジーの機能不全に基づく慢性膵炎の発症機序」、第 69 回日本消化器外科学会総会、2014 年 7 月 18 日、郡山総合体育館(福島県・郡山市)

坂田和也、大村谷昌樹、高城克暢、橋本大輔、阿部真也、新田英利、林洋光、近本亮、別府透、馬場秀夫、「慢性膵炎におけるオートファジーの解析」、第 45 回日本膵臓学会大会、2014 年 7 月 12 日、北九州国際会議場(福岡県・北九州市)

坂田和也、大村谷昌樹、高城克暢、阿部真也、井田智、新田英利、今井克憲、林洋光、橋本大輔、近本亮、別府透、馬場秀夫、「オートファジー機能不全がもたらす慢性膵炎の発症機構」、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 4 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 大輔 (HASHIMOTO, Daisuke)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 80508507

(2)研究協力者

坂田 和也 (SAKATA, Kazuya)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師