

研究要旨

膵癌が極めて予後不良である理由には早期からの浸潤、転移や化学療法に対する高い治療抵抗性がある。膵癌組織周囲に存在する膵星細胞は膵癌により活性化され、**活性化星細胞は逆に癌細胞の浸潤、転移を促し、さらに desmoplasia と呼ばれる過剰な間質増生を促す(癌間質相互作用)**。Desmoplasia では血管密度が乏しく腫瘍細胞への薬剤到達率が低下し化学療法抵抗性をもたらしている。しかしながらこの詳細なメカニズムは判明していない。我々はこのメカニズムとしてオートファジーに着目している。**オートファジーが癌細胞自身の転移、浸潤、さらには治療抵抗性まで癌のあらゆる局面に重要な役割を果たしていることが明らかになっており、この抑制が癌細胞の悪性度を抑制する可能性が考えられる。**近年肝炎における肝星細胞活性化にオートファジーの関与が示唆されているが、膵臓癌における星細胞活性化メカニズムは国内外で明らかになっていない。本研究では膵星細胞活性化にオートファジーが関与している事を証明し、癌細胞の浸潤、転移抑制、化学療法抵抗性の新たなメカニズムを解明できると考えている。これにより**オートファジーの抑制が癌細胞、膵星細胞の活性化双方の抑制をもたらし、革新的な膵癌治療戦略を提供できると考えている。**

A. 研究目的

膵臓癌は極めて予後不良な癌腫であり、**新規治療法の開発は社会的急務である。**本疾患が予後不良な理由には、早期から浸潤、転移を生じる**生物学的悪性度の高さ**や過剰な間質増生 (desmoplasia) のもたらす乏血性環境を原因とする**化学療法抵抗性**が挙げられる。近年、癌細胞周辺の間質細胞が癌細胞の悪性度に影響している<**癌間質相互作用**>という概念に注目が集まっている。とりわけ、最近発見された膵間質に存在する**膵星細胞 (Pancreatic Stellate Cells; PSCs)**は、種々の分泌因子を介し膵癌細胞の浸潤、転移を促進するとして報告された。**膵星細胞が膵癌の悪性形質を誘導する責任細胞として注目されているがそのメカニズムの報告は皆無である。**我々は、近年新たな癌制御メカニズムとして注目されている**オートファジー**がこのメカニズムに関与していると考えている。最近、オートファジーが肝炎における肝星細胞の活性化に関与している事が初めて報告されたが、**膵星細胞活性化とオートファジーが関与している報告は国内外において皆無である。**今回、膵星細胞が膵癌悪性度に影響を与える新たなメカニズムを解明、新たな膵癌治療戦略を構築する。

B. 研究方法

1. **ヒト膵星細胞株の樹立 (仲田、大内田 担当)**
すでに、膵癌患者より得られる手術切除標本を用いてヒト膵星細胞株を20株以上作成した。作成された細胞株に対して、膵星細胞の特徴とされるMyofibroblast様の形態の確認や -SMA染色を行い、星細胞である事を確認した。
2. **活性化膵星細胞におけるオートファジー誘導の確認 (平成24年度 仲田、水元 担当)**
膵星細胞でのオートファジー活性を共焦点顕微鏡によるGFP-LC3発現、ウェスタンブロット、更には電子顕微鏡によるオートファゴゾームの形成を観察して確認した。具体的には実験1において分離した星細胞でそれぞれ、オートファジー活性化の違いを確認した。また、これまでの報告から各種癌細胞、線維芽細胞で**ストレスによりオートファジーを誘導する事**が報告されており、培養した星細胞がストレス投与下にオートファジーを誘導されるかを確認した
3. **膵癌細胞との共培養によるオートファジーを介した膵星細胞活性化の確認 (大内田、水元 担当)** 星細胞が膵

癌細胞との共培養により活性化が促進されるかを確認、その際オートファジーが誘導されているかを実験1と同様の方法で観察した。

4. 膵星細胞に対する Atg5 ノックダウン効果の確認（仲田担当）

膵星細胞に対してオートファジー関連因子 Atg5 をノックダウンし、星細胞の活性化の変化を確認した。その効果を確認したところ約 80%のノックダウン効果を得た。

Control 繊維芽細胞とノックダウン細胞におけるオートファジー誘導を比較したところ Atg5 ノックダウン細胞においてオートファジーの誘導が抑制されている事を確認した。更に Atg5 ノックダウン細胞においては脂肪滴発現が抑制され、ノックダウン繊維芽細胞において星細胞の活性化が抑制されている事が示唆された。

（倫理面への配慮）

本研究は、癌に含まれ後天的に出現する特定の細胞集団を対象としており、マイクロアレイや RT-PCR を用いた発現解析も同様に後天的な特定の分子の発現異常を解析するものであり、ゲノム解析は行わず、平成 13 年の三省の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」の対象になる研究ではない。しかし、臨床検体を使用した解析を含む研究であるので、平成 15 年 7 月の厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に従い、九州大学倫理委員会で承認済みである。また、本研究に使用される切除組織は、治療のために切除された組織を一部用いるものであり、研究のために過剰に切除されることはなく、医療行為を伴う介入研究には当てはまらず、疫学研究に関する倫理指針が適用され、同指針の第 3 章 7 条の第 2 項の観察研究に相当し、この場合に相当し、文書による

説明と文書による同意は必ずしも必要としないとされているが、説明の内容と同意に関する記録が必要となるため、念のため、文書による説明を行い文書による同意を得ることとする。試料は、九州大学の個人情報保護規定を遵守し、匿名コード化し、個人情報保護を徹底し、安全、人権、プライバシーに十分に留意する。

本研究でのマウスの飼育・管理・実験は、動物愛護、生命倫理の観点に十分に配慮し、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および九州大学の学内規定に基づいて適切に行う。

実験用各種ウイルス・plasmid の取り扱いは、九州大学の学内規定に基づき厳正に行う。すでに P2 レベルの動物実験施設、培養実験施設を専用に確保しており、承認された計画調書に従い、安全性の確保に最大限の注意を払って研究を遂行する。

C. 研究結果

1. ヒト膵星細胞株の樹立および性状の確認

膵癌患者より得られる手術切除標本を用いてヒト膵星細胞株を作成した。作成された細胞株は、膵星細胞の特徴とされる Myofibroblast 様の形態を呈し、 α -SMA が陽性であることを確認した。その際、同症例標本より癌組織近傍の膵組織および癌組織より離れた膵組織から星細胞を培養し、オートファジー誘導性の違いを確認したところ、癌組織近傍より作製した星細胞において癌組織より離れた組織から培養した星細胞に比べてオートファジーが誘導される症例が一部に見られた。さらに複数の星細胞株それぞれに対してオートファジー誘導性

の違い、オートファジー必須遺伝子Atg5発現の分布を確認したところ、個々の症例に由来する星細胞によりオートファジーの誘導性が異なる可能性がある事を確認した。更には、オートファジー抑制剤3-MAの投与により一部の星細胞で脂肪滴の発現が抑制され、Quiescent星細胞様性質を示す事を確認した。

2. 膵癌細胞、星細胞におけるオートファジー誘導の確立。膵癌細胞および星細胞にGFP-LC3を導入し、星細胞での容易なオートファジー発現観察を確認する手法を確立した。また、ストレス条件下に癌細胞でオートファジーが誘導される事も同時に確認した。

3. 膵癌細胞、星細胞共培養における3MA投与による膵癌細胞浸潤能力への影響(大内田、水元担当)

膵星細胞、癌細胞に3MAを投与したところ星細胞、癌細胞でオートファジーの誘導が抑制される細胞を認める事を確認した。さらに、膵星細胞と膵癌細胞との共培養モデルを確立、星細胞との共培養において膵臓癌浸潤が促進される事を確認した。癌細胞、膵星細胞共培養下にオートファジー抑制剤3MAの投与で膵癌細胞の浸潤が抑制される事を確認した。

4. 膵星細胞に対するAtg5ノックダウン効果の確認(仲田担当)

膵星細胞に対してオートファジー関連因子Atg5をノックダウンし、星細胞の活性化の変化を確認した。その効果を確認したところ約80%のノックダウン効果を得た。Control繊維芽細胞とノックダウン細胞におけるオートファジー誘導を比較

したところAtg5ノックダウン細胞においてオートファジーの誘導が抑制されている事を確認した。更にAtg5ノックダウン細胞においては脂肪滴発現が抑制され、ノックダウン繊維芽細胞において星細胞の活性化が抑制されている事が示唆された。

D. 結論、考察

星細胞はDesmoplasiaを形成し、抗癌剤治療抵抗性の原因と考えられている。また、星細胞は癌細胞の転移、浸潤を促している。その為、膵星細胞の活性化を抑制することにより、膵癌細胞の浸潤を抑制出来るのではないかと考えている。同時にオートファジーは癌細胞自身の浸潤能、治療抵抗性関連する事が示唆されていると考えられる。今回の研究遂行により膵癌の浸潤性が膵星細胞、膵癌細胞双方に対するオートファジーを抑制することにより、相乗的に浸潤性を抑制する事が予想される。また、Desmoplasia形成も抑制し、化学療法抵抗性を解決出来るのではないかと考えている。本年度の研究成果から膵癌細胞周囲の星細胞にはオートファジーが誘導されているが、その中でも誘導の強い星細胞と誘導が弱い星細胞が認められた。また、癌細胞から離れた部位の星細胞ではオートファジーの誘導が癌細胞周囲細胞に比較して低いものがあった。癌細胞周囲の星細胞の一部が癌細胞によりオートファジーを誘導されている可能性が示唆された。今後、症例の蓄積による検討が必要である。

また、今後はオートファジー抑制により星細胞自身の活性化が抑制される事確認する。膵癌細胞および星細胞共培養下に膵癌浸潤能が増強されるがオートファジー抑制剤により浸潤能が抑制されている。今回、オー

トファジー抑制剤3MAを投与する事により膵臓癌の浸潤能が抑制された。本結果からでは3MAが膵癌細胞および星細胞双方のオートファジーを抑制している可能性が考えられる。今回星細胞に対してAtg5をノックダウンしたところ星細胞活性化の抑制が確認され、オートファジー及び星細胞活性化の関連性が強く示唆された。今後もその再現性多方面から検討していく予定である。

E. 健康危険情報

無し

F. 研究発表

論文発表

1. Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Aishima S, Nagai E, Oda Y and Tanaka M. MicroRNA-373 is down regulated in pancreatic cancer and inhibits cancer cell incasion. *Annals of Surgical Oncology*. 2014;*in press*
2. Nagai E, Ohuchida K, Nakata K, Toma H, Tanaka M. Feasibility and safety of intracorporeal esophagojejunostomy after laparoscopic total gastrectomy: Inverted T-shaped anastomosis using linear staplers. *Surgery*. 2013;153(5):732-8
3. Ohuchida K, Mizumoto K, Nagai E, Tanaka M et al. MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the HOXA gene *Ann Surg Oncol*. 2012;19(7):2394-402.
4. Yamanaka N, Nagai E, Ohuchida K, Ueda J, Toma H, Tanaka M. Feasibility of laparoscopic gastrectomy for advanced

gastric cancer with positive peritoneal cytology.

Surg Today. 2012

学会発表

1. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Akagawa S, Fujiwara K, Eguchi D, Kozono S, Otsuka T, Takahata S, Tanaka M Pancreatic cancer Cells Enhance the Ability of Collagen Internalization During Epithelial-Mesenchymal Transition. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
2. Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, Fujiwara K, Zhao M, Cui L, Mizumoto K, Tanaka M Antifibrotic Agent, Pirfenidone, Inhibits Pancreatic Stellate Cells and Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
3. Akagawa S, Ohuchida K, Otsuka T, Eguchi D, Fujiwara K, Kozono S, Cui L, Ikenaga N, Aishima S, Mizumoto K, Tanaka M Role of Peritoneal Fibroblasts at Disseminated Sites of Pancreatic Cancer American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
4. Eguchi D, Ohuchida K, Kozono S, Cui L, Zhao M, Fujiwara K, Akagawa S, Otsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Tanaka M Pancreatic Cancer Cells in Hypoxia Enhance the Motility of Pancreatic Stellate Cells Via Increased Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
5. Shindo K, Aishima S, Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y Fibroblasts Expression podoplanin Enhance the Tumor Progression of Invasive Ductal Carcinoma of Pancreas. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America

- 2012/10/30-11/2
6. 小藺真吾、大内田研宙、水元一博、大塚隆生、赤川進、江口大樹、藤原謙次、Ana Ines Cases、趙茗、崔林、池永直樹、田中雅夫 Prifenidone による膵星細胞およびその癌間質相互作用を標的とした膵癌治療の可能 第 43 回日本膵臓学会大会 2012/6/28-29
 7. 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、高畑俊一、藤原謙次、小藺真吾、池永直樹、水元一博、田中雅夫 腹膜線維芽細胞が膵癌の腹膜播種を促進する第 43 回日本膵臓学会大会 2012/6/28-29
 8. 藤原謙次、大内田研宙、江口大樹、小藺真吾、池永直樹、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 CD105 陽性膵癌細胞は膵星細胞から影響を受けて強い遊走能を獲得する第 43 回日本膵臓学会大会 2012/6/28-29
 9. 小藺真吾、大内田研宙、大塚隆生、赤川進、Prawej Mahawithitwong、高浪英樹、江口大樹、藤原謙次、趙茗、崔林、池永直樹、水元一博、田中雅夫膵癌における膵星細胞およびその癌間質相互作用を標的とした新しい膵癌治療の可能性 第 22 回日本消化器癌発生学会総会 2012/11/25-26
 10. 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、寅田信博、江口大樹、藤原謙次、小藺真吾、崔林、池永直樹、水元一博、田中雅夫 腹膜線維芽細胞の作用に着目した膵癌腹膜播種メカニズムの解明 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
 11. 崔林、大内田研宙、鄭彪、趙茗、小藺真吾、寅田信博、植木隆、水元一博、田中雅夫 大腸癌および組織由来線維芽細胞のがん関連遺伝子の発現解析 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
 12. 江口大樹、大内田研宙、小藺真吾、崔林、藤原謙次、趙茗、赤川進、寅田信博、Cases Ana Ines、大塚隆生、上田純二、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 膵癌の遠隔転移に関与する新規遺伝子 MAL2(myelin and lymphocyte protein2)の同定 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
 13. 小藺真吾、大内田研宙、進藤幸治、江口大樹、藤原謙次、趙茗、崔林、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 膵癌における Nodal 発現の特徴とその臨床的意義 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
 14. 藤原謙次、大内田研宙、進藤幸治、赤川進、江口大樹、小藺真吾、崔林、大塚隆生、高畑俊一、相島慎一、水元一博、田中雅夫 CD166 陰性膵癌細胞は強い浸潤能・遊走能を有する 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
 15. 趙茗、大内田研宙、鄭彪、崔林、小藺真吾、江口大樹、水元一博、田中雅夫 The investigation of CD146 in pancreatic cancer associated fibroblast 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
 16. 佐田政史、大内田研宙、藤原謙次、赤川進、江口大樹、小藺真吾、趙茗、崔林、大塚隆生、水元一博、田中雅夫 膵癌間質における CD90 と α -SMA 発現の意義 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
 17. 田中友晴、小藺真吾、佐田政史、堀岡宏平、赤川進、江口大樹、藤原謙次、大内田研宙、水元一博、田中雅夫 膵癌細胞株における Histon deacetylase1 の放射線耐性に関する評価第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
 18. 寅田信博、赤川進、崔林、大内田研宙、小藺真吾、水元一博、相島慎一、小田義直、田中雅夫高品質かつ簡便な凍結組織アレイ作製法-手術切除組織を効率よく保存する保存組織タブレット法を活用して- 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし