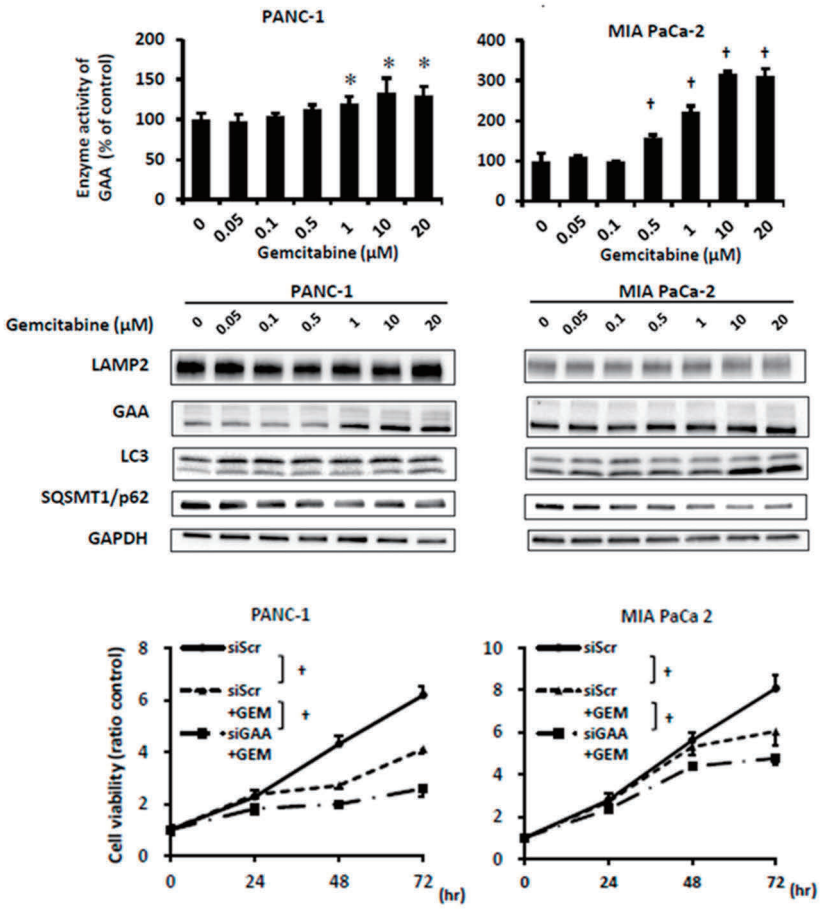
174　膵癌抗癌剤耐性と腸内細菌関連オートファジー機構解明	春木　孝一郎

【目的】膵癌は最も予後不良な克服すべき最重要疾患である。切除不能例に対し集学的治療を行っても種々の機序による抗癌剤耐性によりその効果は限定的である。本研究では膵癌の抗癌剤耐性の機序としてのオートファジーとその本体であるライソゾームに着目し、その役割を明らかにするとともに、膵癌微小環境における腸内細菌の分子メカニズムへの影響を明らかにすることを目的とする。
【方法】ヒト膵癌細胞株に対し塩酸ゲムシタビン（GEM）を投与し、電子顕微鏡およびミトコンドリア機能評価でミトコンドリアおよびライソゾーム酵素の発現を確認した。マイクロアレイ解析でオートファジー、ライソゾーム関連遺伝子の発現変化を解析し、GEM 投与により変化するターゲット遺伝子の選定を行った。また Western blotting にてオートファジー、ライソゾーム酵素の発現量を評価した。選定された酸性α グルコシダーゼ（GAA）の発現を siRNA を用いて抑制し、GEM の抗腫瘍効果の変化およびアポトーシス関連シグナル誘導の評価を行った。
【結果】GEM 投与により膵癌細胞のミトコンドリアの膨化およびライソゾーム酵素の発現上昇を認めた。マイクロアレイ解析ではオートファジーおよびライソゾーム酵素の発現上昇を認めた。GEM 投与により GAA 酵素活性は濃度依存的に上昇し、オートファジー／ライソゾーム経路の活性を認めた。*GAA* 遺伝子の抑制により GEM による抗腫瘍効果が増強された。ライソゾーム酵素発現抑制によりオートファジー機構を介した抗癌剤耐性が制御され、抗癌剤耐性にライソゾーム酵素が関与していることが示され、新たな治療標的となりうると考えられた。

膵癌における抗癌剤耐性におけるオートファジー／ライソゾーム酵素の制御



174. 膵癌抗癌剤耐性と腸内細菌関連オートファジー機構解明

春木　孝一郎

東京慈恵会医科大学 医学部 外科学講座 肝胆膵外科

Key words：膵癌，化学療法，オートファジー，ライソゾーム，腸内細菌

緒　言

膵癌は最も予後不良な克服すべき最重要疾患である。治療法としては外科的切除が唯一の根治術であるが、発見時切除可能である症例は約 10～20%と極めて少ない。切除不能例に対し化学療法や放射線療法などの集学的治療を行ってもその効果は限定的で、1 年生存率は約 15%に留まる。膵癌が抗癌剤耐性を示す要因として、膵癌微小環境における線維化や低酸素化、癌幹細胞、耐性遺伝子の活性化などが挙げられるが、いまだブレイクスルーとなる治療抵抗性の機序解明、克服は得られておらず、新規治療戦略の立案、構築が急務である［1］。

オートファジーは障害された蛋白質をオートライゾゾームによる自己消化を介して細胞内エネルギーの維持あるいはタンパク質の供給によって細胞内器官を再構成することで細胞のホメオスタシスを維持する生体機構である。オートファジーは膵癌における抗癌剤耐性の機序の一つとして注目されている。オートファジーはオートファゴソーム形成に始まり､分解の本体は脂質二重膜で構成されるオルガネラの一つであるライソゾームが担い、オートファジーによって取り込まれた物質をその構成単位まで酵素処理している［2］。癌細胞における Lysosome 発現増強が、血管新生やがんの転移浸潤能に関与していることが知られている［3］。

一方で、腸内細菌叢は腫瘍微小環境、腫瘍免疫と密接に関係していることが報告され、化学療法や免疫チェックポイント阻害剤の効果や耐性への関与が大きな注目を集めている［4］。特に口腔内に存在し歯周病の原因菌である *Fusobacterium nucleatum* は大腸癌の腫瘍内で検出され、予後不良との関連が報告されているが［5］、膵癌でも腫瘍内に *Fusobacterium* 属が存在し、予後との関連が報告されている［6］。膵癌では腫瘍内の腸内細菌の多様性と構成が予後と関係することから［7］、膵癌の進行や治療抵抗性における腸内細菌の関与が強く示唆されるが、そのメカニズムは不明である。

本研究では膵癌における抗癌剤耐性とオートファジーの役割を明らかにするとともに、膵癌微小環境における腸内細菌のオートファジーなどの分子メカニズムへの影響を明らかにすることを目的とする。

方法および結果

1.　塩酸ゲムシタビンによるオートファジー関連遺伝子および Lysosome 酵素遺伝子発現の上昇

ヒト膵癌細胞株（PANC-1、MiaPaca2）に対し、膵臓癌の標準治療である塩酸ゲムシタビン（GEM）投与した際の細胞内変化を、電子顕微鏡、蛍光顕微鏡を用いて評価した。電子顕微鏡においてはミトコンドリアの膨化や、Lysosome の発現の上昇を認めた（図 1A）。蛍光顕微鏡においては、Lysosome（赤）の発現上昇や、ミトコンドリア（緑）の発現上昇を認めた（図 1B）。フローサイトメトリーにて同条件でのミトコンドリアの定量を行うと、GEM 投与にて有意なミトコンドリアの発現上昇をみとめた（Mann-Whitney U test、$p<0.05$）（図 1C）。GEM の濃度は、CCK assay にて膵癌細胞株の抗癌剤耐性を示した濃度（PANC1：1 μM、MiaPaca2：0.5 μM）を選択した。

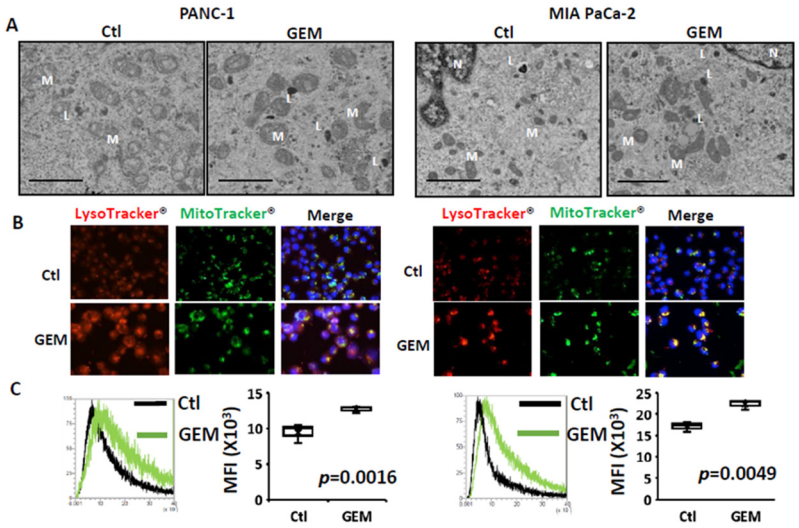


図 1. GEM 投与によるミトコンドリアの蓄積と Lysosome 酵素の上昇

A) 電子顕微鏡の観察ではGEM投与によりミトコンドリア膨化、Lysosome発現上昇を認めた（スケールバー：500 nm）。

B) LysoTrackerの観察ではGEM投与によりLysosomeおよびミトコンドリアの発現上昇を認めた（スケールバー：50 μm）。

C) フローサイトメトリーでは GEM 投与で有意なミトコンドリアの発現上昇を認めた（Mann-Whitney U test、$p<0.05$）。

塩酸ゲムシタビン（GEM）を投与した膵癌細胞（PANC-1）に対しマイクロアレイ解析を行い（図 2A）、オートファジー関連遺伝子や複数の Lysosome 酵素の遺伝子が発現上昇していることを同定した（図 2B）。塩酸ゲムシタビンによって発現上昇を認めた Lysosome 酵素遺伝子として、遺伝子欠損時の酵素補充療法が確立されている、酸性α グルコシダーゼ（GAA）やα ガラクトシダーゼ A（GLA）、イズロネートスルファターゼ（IDS）、α イズロニダーゼ（IDUA）などの発現も有意に増加していた（図 2C）。本研究ではグリコーゲン代謝に大きくかかわる酸性α グルコシダーゼ（GAA）に着目した。

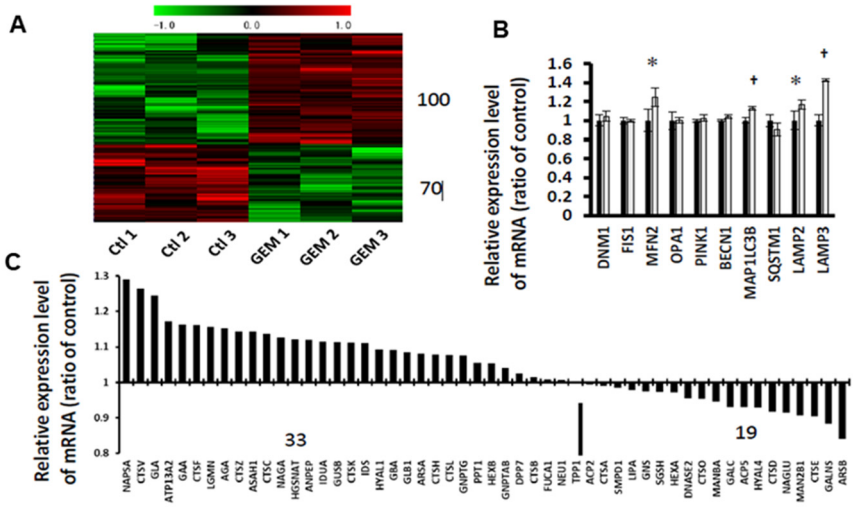


図 2. GEM 投与によるマイクロアレイ解析

A) GEM 投与により約 100 の遺伝子の発現上昇を認めた。

B) GEM 投与によりオートファジー関連、Lysosome 酵素の発現上昇を認めた。

C) GAA を含めた Lysosome 酵素の発現上昇を認めた。

2. 塩酸ゲムシタビンによるオートファジー、Lysosome 酵素活性の変化

ヒト膵癌細胞株（PANC-1、MiaPaca2）に対し、濃度別に塩酸ゲムシタビンを投与すると、濃度依存的に GAA の酵素活性の上昇を認めた（Mann-Whitney U test、$p<0.05$）（図 3A）。また Western blotting では GEM の濃度依存的に LAMP2、LC3II の発現が上昇し、p62 が減弱していることから、GEM によって Autophagy-Lysosome pathway の亢進が確認された（図 3B）。

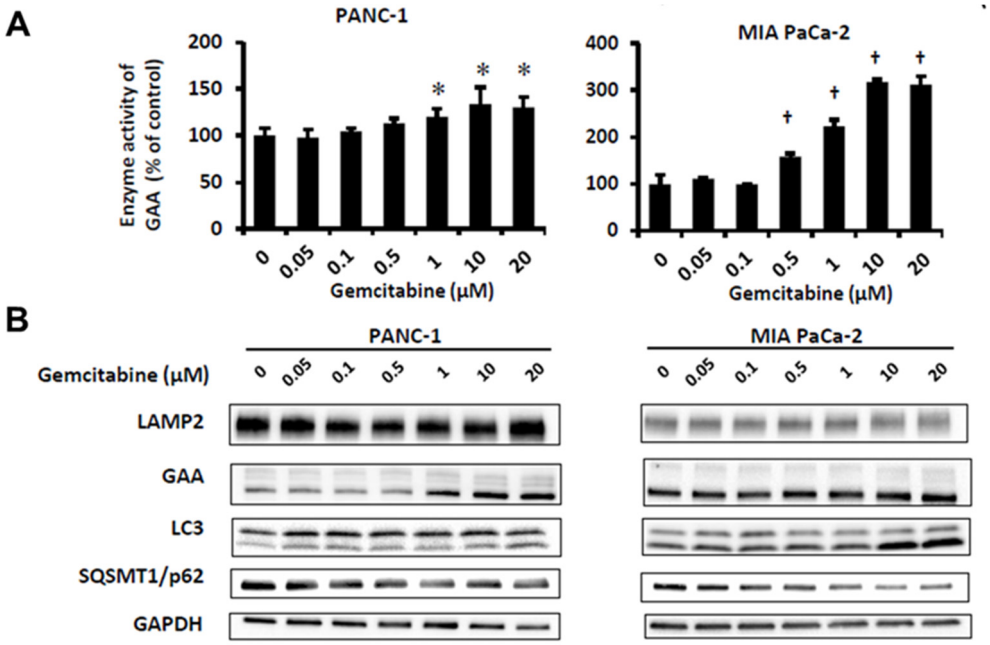


図 3. GEM 投与によるオートファジー活性化

A）GEM 投与により濃度依存的に GAA 酵素活性の上昇を認めた。

B）GEM 投与により濃度依存的にオートファジー／Lysosome 経路の活性を認めた。

3. GAA 抑制による化学療法抵抗性の改善

ヒト膵癌細胞株（PANC-1、MiaPaca2）に対し siRNA を用いて *GAA* 遺伝子をノックダウンさせ、塩酸ゲムシタビンを投与すると、GEM による細胞増殖抑制効果がさらに増強することが確認された（Repeated measures analysis of variance、$p<0.05$）（図 4）。

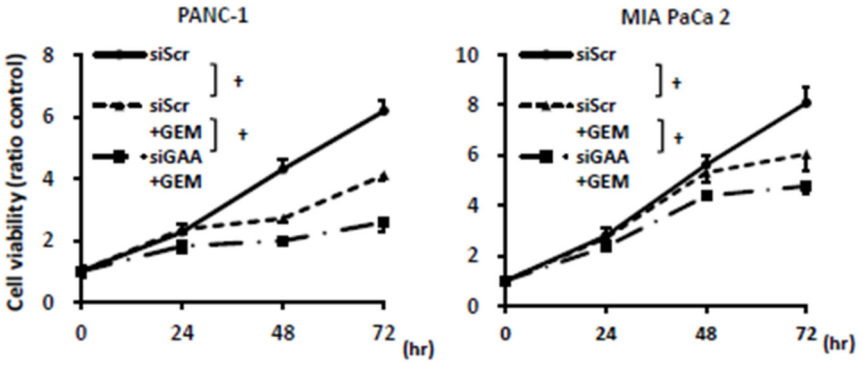


図 4. GAA ノックダウンによる GEM の抗腫瘍効果

GAAノックダウンによりGEMによる細胞増殖抑制効果が増強した。

（Repeated measures analysis of variance、$p<0.05$）

さらに GAA ノックダウン細胞においては、GEM との併用療法において Cleaved caspase-3、Cleaved caspase 8、Cleaved PARP などのアポトーシスシグナル蛋白が増強することが確認された（図 5A)。また、Annexin V Assay においても、アポトーシス細胞が有意に増強することが確認された（Mann-Whitney U test、$p<0.05$）（図 5B)。

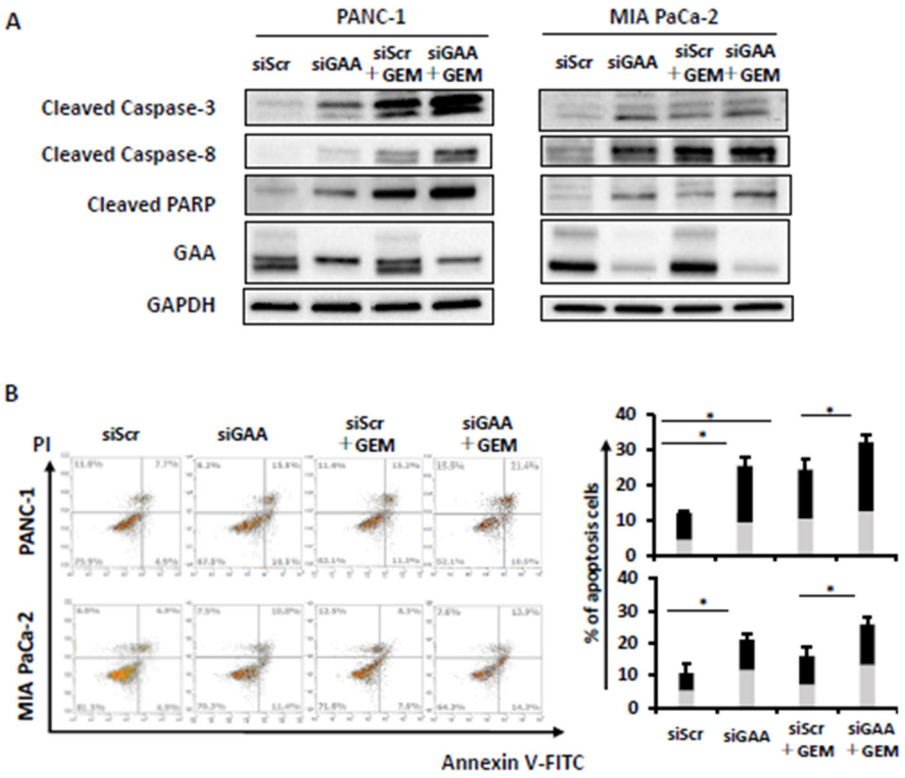


図 5. GAA ノックダウンによる GEM のアポトーシス誘導効果

A) GAA ノックダウンによるアポトーシスシグナル蛋白発現上昇を認めた。

B) GAA ノックダウンにより、アポトーシス細胞の増加を認めた。

4. RNA scope による癌組織中の腸内細菌の同定

ヒト癌組織中の腸内細菌の同定のため RNA scope を用いた in situ hybridization を行った。プレリミナリーで施行したヒト大腸癌組織の RNA scope では癌組織中の *Fusobacterium nucleatum* を同定した（図 6)。

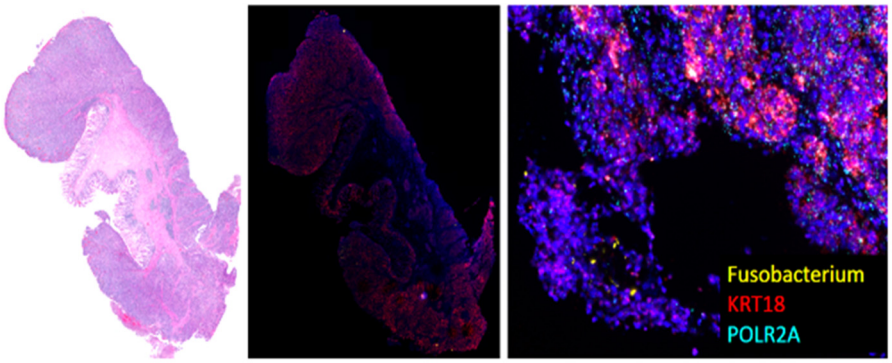


図 6. RNA scope による *Fusobacterium nucleatum* の同定

ISHにより *Fusobacterium nucleatum*（黄）を同定した。

考　察

膵癌の治療抵抗性の機序において、オートファジーは重要な機序の一つとして注目されている。オートファジーの分解のプロセスで主要な役割を果たすライソゾームは細胞における生体高分子の代謝、細胞増殖、細胞分裂、細胞分化に重要な役割を果たしている。癌細胞では、ライソゾームによる分解が亢進し、血管新生や転移形成に関与していることが報告されてきた［8］。

しかし、化学療法に対するライソゾームの役割はいまだ十分には解明されていない。本研究では、多くの Lysosome 酵素の中から糖代謝の中心的役割を果たす GAA に着目し、その制御がオートファジー抑制および抗癌剤耐性改善に有効であることを示した［9］。膵癌細胞における 60 種類以上の Lysosome 酵素の中から抗癌剤耐性の鍵となる酵素を同定し抑制することでオートファジー不全を誘導し、抗癌剤の治療効果を高めようとする新しい取り組みであり、抗癌剤耐性における Lysosome 酵素の働きを解明することで、癌細胞が抗癌剤耐性に必要とする代謝経路を特定し、抗癌剤抵抗性膵癌に対する新たな遺伝子治療を用いた治療法開発を目指す。

一方で、腫瘍内の腸内細菌はオートファジーを介して化学療法抵抗性と関係していると報告があり［10］、膵癌微小環境においても治療抵抗性との関連している可能性がある。本研究では ISH による腫瘍内の腸内細菌の局在の同定を行った。今後、16S RNA シークエンスや PCR による定量を行い、オートファジー活性との関係を明らかにしていく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所生命医科学研究センターマイクロバイオーム研究チームの須田亙先生、東京慈恵会医科大学外科学講座肝胆膵外科の池上徹先生、古川賢英先生である。また研究を全面的に支援してくださった上原記念生命科学財団の方々に心から感謝いたします。

文　献

1） Halbrook CJ, Lyssiotis CA, Pasca di Magliano M, Maitra A. Pancreatic cancer: Advances and challenges. Cell. 2023;186(8):1729-54. Epub 2023/04/15. doi: 10.1016/j.cell.2023.02.014. PubMed PMID: 37059070.

2） Jiang X, Overholtzer M, Thompson CB. Autophagy in cellular metabolism and cancer. The Journal of clinical investigation. 2015;125(1):47-54. Epub 2015/02/06. doi: 10.1172/jci73942. PubMed PMID: 25654550; PubMed Central PMCID: PMCPMC4382242.

3） Perera RM, Stoykova S, Nicolay BN, Ross KN, Fitamant J, Boukhali M, et al. Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. Nature. 2015;524(7565):361-5. Epub 2015/07/15. doi: 10.1038/nature14587. PubMed PMID: 26168401; PubMed Central PMCID: PMCPMC5086585.

4） Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Reuben A, Wargo JA. The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. Cancer Cell. 2018;33(4):570-80. Epub 2018/04/11. doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.015. PubMed PMID: 29634945; PubMed Central PMCID: PMCPMC6529202.

5） Mima K, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, et al. Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. Gut. 2016;65(12):1973-80. Epub 2015/08/28. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310101. PubMed PMID: 26311717; PubMed Central PMCID: PMCPMC4769120.

6) Mitsuhashi K, Nosho K, Sukawa Y, Matsunaga Y, Ito M, Kurihara H, et al. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. Oncotarget. 2015;6(9):7209-20. Epub 2015/03/24. doi: 10.18632/oncotarget.3109. PubMed PMID: 25797243; PubMed Central PMCID: PMCPMC4466679.
7) Riquelme E, Zhang Y, Zhang L, Montiel M, Zoltan M, Dong W, et al. Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. Cell. 2019;178(4):795-806.e12. Epub 2019/08/10. doi: 10.1016/j.cell.2019.07.008. PubMed PMID: 31398337; PubMed Central PMCID: PMCPMC7288240.
8) Kallunki T, Olsen OD, Jäättelä M. Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? Oncogene. 2013;32(16):1995-2004. Epub 2012/07/11. doi: 10.1038/onc.2012.292. PubMed PMID: 22777359.
9) Hamura R, Shirai Y, Shimada Y, Saito N, Taniai T, Horiuchi T, et al. Suppression of lysosomal acid alpha-glucosidase impacts the modulation of transcription factor EB translocation in pancreatic cancer. Cancer science. 2021;112(6):2335-48. Epub 2021/05/02. doi: 10.1111/cas.14921. PubMed PMID: 33931930; PubMed Central PMCID: PMCPMC8177769.
10) Yu T, Guo F, Yu Y, Sun T, Ma D, Han J, et al. Fusobacterium nucleatum Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. Cell. 2017;170(3):548-63 e16. Epub 2017/07/29. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.008. PubMed PMID: 28753429; PubMed Central PMCID: PMCPMC5767127.