



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 通常型膵癌の浸潤、転移メカニズムに関する分子生物学的研究 [論文内容及び審査の要旨]                                                              |
| Author(s)           | 古川, 聖太郎                                                                                                 |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                  |
| Dissertation Number | 甲第14320号                                                                                                |
| Issue Date          | 2020-12-25                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/80219">https://hdl.handle.net/2115/80219</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                         |
| File Information    | Shotaro_Furukawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                  |



## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 古川 聖太郎

### 学位論文題名

通常型膵癌の浸潤、転移メカニズムに関する分子生物学的研究

( The molecular biological studies on the mechanisms of invasion and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma)

### 【背景と目的】

通常型膵癌（Pancreatic ductal adenocarcinoma、以下、PDAC）は手術、化学療法、放射線療法が進歩した現在でも、5年生存率が10%に満たない難治癌である。PDACの根治には適切なリンパ節郭清を伴った外科的切除が最低限必要である。しかし、初診断時、局所進行または遠隔転移の存在によりすでに根治切除不能である症例が80%以上を占めることや、化学療法および放射線療法に対して抵抗性を有することが膵癌を難治たらしめる主な原因と考えられている。膵発癌メカニズムは、正常膵上皮細胞に様々な遺伝子異常が蓄積し、前癌病変の膵上皮内腫瘍性病変を経て、PDACに至る多段階発癌仮説が有力と考えられている。この過程には、*KRAS*の恒常活性型変異および*TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4*の機能喪失が重要であることがゲノム解析で明らかとなっている。このうち、*KRAS*変異は90~95%、*TP53*変異は70%程度のPDAC症例で認められ、*KRAS*変異と*TP53*変異は膵発癌の主要なドライバー変異であると考えられている。しかし、その変異の結果としてPDACの悪性度を増強する蛋白レベルのメカニズムについては不明な点が多い。

低分子量G蛋白質のARF6は様々な癌腫で過剰発現することが報告されている。癌細胞が増殖因子などの細胞外からの刺激を受け、受容体型チロシンキナーゼがリン酸化されると、GEP100を代表とするグアニンヌクレオチド交換因子の仲介によりARF6が活性化し、エフェクター分子のAMAP1を支配下に入れる。AMAP1はコルタクチン、パキシリン、プロテインキナーゼD2と結合することで、アクチンのリモデリングやインテグリンのリサイクリングを促進する。また、EPB41L5と結合することでE-カドヘリンのエンドサイトーシスを促進するなど、細胞膜発現蛋白の細胞内動態を制御し、癌細胞の浸潤、転移、化学療法抵抗性を促進することが他の癌腫で報告されている。ARF6の活性化にはメバロン酸経路（Mevalonate pathway、以下、MVP）の働きが必須であり、この経路により別の低分子量G蛋白質RAB11bがゲラニルゲラニル化され、RAB11bがARF6を細胞表面へ輸送することでARF6機能が発揮される。MVPは*TP53*変異により過剰に活性化されることが乳癌細胞で示されている。また、*TP53*変異はPDGFR $\beta$ シグナリングを介して膵癌細胞の浸潤や転移を促進することが動物実験で示されている。

本研究では*TP53*変異がPDACの浸潤性、転移性、化学療法抵抗性を進展させるために、ARF6-AMAP1経路を主要なターゲットとしていることを示す。

## 【材料と方法】

膵癌細胞の浸潤性、転移性、化学療法抵抗性を評価するため、ヒト膵癌細胞株である BxPC-3、Capan-2、SW1990、MIAPaCa-2、Panc-1、膵発癌モデルマウス (*Pdx1-Cre; LSL-KRAS<sup>G12D/+</sup>; TP53<sup>R172H/+</sup>*) から樹立した細胞株 KPC を使用した。浸潤性はマトリゲル浸潤アッセイで、転移性はマウス尾静脈に細胞株を注射することで形成される肺転移の程度で、化学療法抵抗性は培養した細胞株に Gemcitabine、5-Fluorouracil、Oxaliplatin、Irinotecan を添加した後の細胞増殖率の変化で評価した。また、Gemcitabine に MVP 阻害薬の Simvastatin を併用した際の細胞増殖率の変化も調べた。また、70 名の膵癌患者から得た切除標本における p53、PDGFR $\beta$ 、GEP100、AMAP1、EPB41L5 発現と予後の関係を免疫組織学的に解析した。ARF6 活性化制御メカニズムおよび EPB41L5 蛋白発現と TP53 変異との関係を GGA-pulldown アッセイやウェスタンブロット法を用いて解析した。

## 【結果】

MIAPaCa-2、KPC では ARF6、AMAP1、EPB41L5 が高発現し、ARF6-AMAP1 経路が活性化されていることを確認した。ARF6-AMAP1 経路の抑制により MIAPaCa-2、KPC の浸潤活性が低下し、化学療法感受性が上昇した。また、KPC を使用した転移実験で肺転移が抑制された。免疫組織学的解析から ARF6-AMAP1 経路の高発現が膵癌切除後の予後規定因子であることが判明した。変異型 TP53 をもつ MIAPaCa-2 で *siRAB11b*、*siGGT-II*、*shTP53* および Simvastatin 処理により、PDGF 刺激依存的な ARF6 活性化が抑制され、その結果、浸潤活性が低下した。一方、野生型 TP53 をもつ Capan-2 では PDGF 刺激依存的な ARF6 活性化を認めなかった。また、Gemcitabine に Simvastatin を併用することにより化学療法感受性が有意に上昇した。*shTP53* により、転写因子 ZEB1 と EPB41L5 発現が、また、*shZEB1* により EPB41L5 発現が低下することがわかった。*ZEB1* はある種の miRNA により制御されることが他の癌腫では報告されているが、MIAPaCa-2 ではそのような miRNA を同定できなかった。

## 【考察】

PDAC 症例の 70%程度で認められる TP53 変異により ARF6 が活性化され、ARF6-AMAP1 経路が駆動し、膵癌細胞の浸潤性、転移性、化学療法抵抗性を促進することを示した。これには MVP や PDGFR シグナリングの活性化が重要な役割を果たしている。スタチン系薬剤による ARF6 活性化阻害により、PDAC の浸潤、転移、化学療法抵抗性が改善することが判明した。

## 【結論】

本研究により ARF6-AMAP1 経路が PDAC で高発現し、予後不良に直結することや ARF6-AMAP1 経路阻害により PDAC 治療を躍進させる可能性があることが判明した。