

新規治療薬の開発をめざした抗癌剤耐性膵癌における Girdin の機能解析

名古屋市立大学 消化器外科学

林 祐一

1. 諸言

いまや2人に1人が生涯でがんになる時代とされ、がん罹患数およびがん死亡数は年々増加傾向である。それに対して、がん治療もここ数年でめざましい発展を遂げてきた。これまでの手術療法や化学療法、および放射線療法に加えて、がん免疫機構の解明により、免疫療法もあらたな主軸となっている。また、がん進展における分子生物学的メカニズムが解明され、さまざまな分子標的治療薬の開発が進んでいる。さらに、進行がんに対しては、手術前後に化学放射線療法などを行う集学的治療が標準化しつつある。そして、患者個人に合わせて細胞を遺伝子レベルで分析し、適切な治療法を選択する個別化治療の“precision medicine”の概念も確立してきた。しかし、その一方で、臓器や病態特異的に治療に抵抗性を示す「難治がん」が存在することも事実であり、それら難治がんの克服は急務の課題といえる。

消化器癌は罹患数、および死亡数の上位を占めており、そのなかでも、膵癌は非常に悪性度が高いことで知られる。厚生労働省の統計（2018年）では、膵癌は年間42,361例が罹患し、年間37,677人が亡くなっている。罹患数と死亡数がほぼ同数であることから、膵癌の悪性度の高さがうかがえる。また、膵癌全体の5年生存率は8.5%と低く、根治手術を行っても20~40%程度とほかの癌腫と比べて著明に低い。その背景として、隣接する組織や神経などに対する浸潤能が非常に高いことが挙げられ、早期から遠隔転移をきたす可能性が考えられている¹⁾。

さらに、膵癌化学療法の代表的薬剤の一つであるゲムシタビン（GEM）は、継続投与中に効果が減弱する耐性化の獲得がしばしば問題となっている。抗癌剤耐性の機序の一つとしてPI3K/Akt/mTORシグナルの関与が示唆されている²⁾が、その解明は十分とはいえない。

一方、Girdinは2005年にがん原遺伝子Aktの新規基質として同定されたアクチン結合タンパクである。AktによりGirdinが活性化し、細胞骨格を形成するアクチン線維の再構成を経て、細胞運動に重要な葉状仮足の形成に関与している³⁾。Girdinはそれ以外にも、細胞増殖や微小血管新生など、多岐におよぶ機能を有していることが知られている^{4,5)}。一部

では、PI3K を介して Akt のキナーゼ活性を増強する APE (Akt phosphorylation enhancer) としても知られている⁶⁻⁸⁾。また、Gα-interacting vesicle-associated protein (GIV) としても知られており、STAT3 によって転写が誘導され、Gai タンパク質の非受容体グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として機能し、正の相関で STAT3 活性化を経て腫瘍浸潤や転移を促進していることが報告されている⁹⁾。このように、Girdin は細胞内において様々な生理活性を有することが予想される。さらに近年、各癌腫における遊走・浸潤や血管新生への関与も報告されるようになった^{10,11)}。これらの背景をもとに、消化器癌のなかでも悪性度の高い膵癌に対し Girdin の機能解析を進め、そのなかで抗癌剤、特に GEM 耐性膵癌における役割について検討を行った。

2.方法

われわれはまず、膵癌における Girdin の役割について *in vitro* で実験を行った。はじめに、膵癌細胞株における Girdin の発現を qRT-PCR で比較評価した。また、それら膵癌細胞株に対して、siRNA 法を用いて Girdin をノックダウンし、今後の機能解析を進めた。遊走能の評価のため、Boyden double chamber 法を用いて、Girdin ノックダウン株 (siGirdin 株) における遊走能の変化を検証した。次に、血管新生能の評価のため、まず血管新生因子 VEGF-A の発現および分泌変化を、それぞれ qRT-PCR および ELISA で検証した。また、実際の血管新生の評価のため on Matrigel tube formation assay を行い、siGirdin 株の上清を用いた調整培地で血管内皮細胞を培養し、管腔形成能の変化を検証した。

次に、2006 年から 2016 年にかけて当院で膵癌の診断で手術を行った 90 例を対象に、抗 Girdin 抗体を用いて免疫組織化学染色 (IHC) を行い、Girdin の発現解析を行った。Girdin の発現と全生存期間 (OS) および無再発生存期間 (RFS) との相関について Kaplan-Meier 曲線を描画し、Log-rank 検定を行った。

われわれの教室では、GEM の継続投与により GEM 耐性膵癌細胞株を樹立しており、DNA マイクロアレイを行った。その結果、GEM 感受性株に比べ耐性株で Girdin の発現が 2.12 倍高いことがわかった。GEM 耐性株における Girdin の発現変化を qRT-PCR で検証した。

3.結果

3.1.1 膵癌細胞株における Girdin の発現とノックダウン (図 1)

正常膵管上皮細胞株 (HPDE; H6c7 株) および各種膵癌細胞株における Girdin の発現を qRT-PCR で比較検証した。すべての膵癌細胞株で Girdin の発現を認め、H6c7 と比べて多くの膵癌細胞株で Girdin 発現亢進を認めた。そのうち、MIA PaCa-2、AsPC-1、PANC-1 の 3 株に対して、siRNA 法で Girdin をノックダウンした (siGirdin 株)。

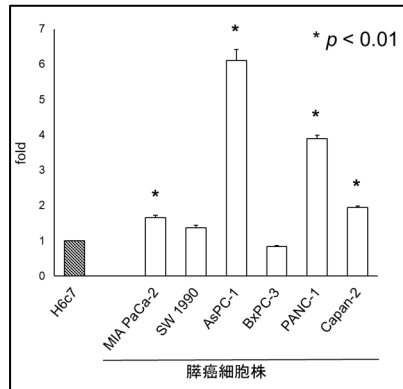


図1 膵癌細胞株における Girdin の発現変化

3.1.2 Girdin ノックダウンによる膵癌遊走能の変化 (図2)

ダブルチャンバーの上側に Girdin をノックダウンした MIA PaCa-2、PANC-1 の細胞株を播種し、24 時間後にインサート底面に遊走した細胞株を固定・染色しカウントした。いずれの膵癌細胞株においても、EGF 0.1ng/mL の刺激下で遊走能は有意に亢進した。一方で、siGirdin 株では EGF 刺激により誘導される遊走能が抑制されることが明らかとなった。

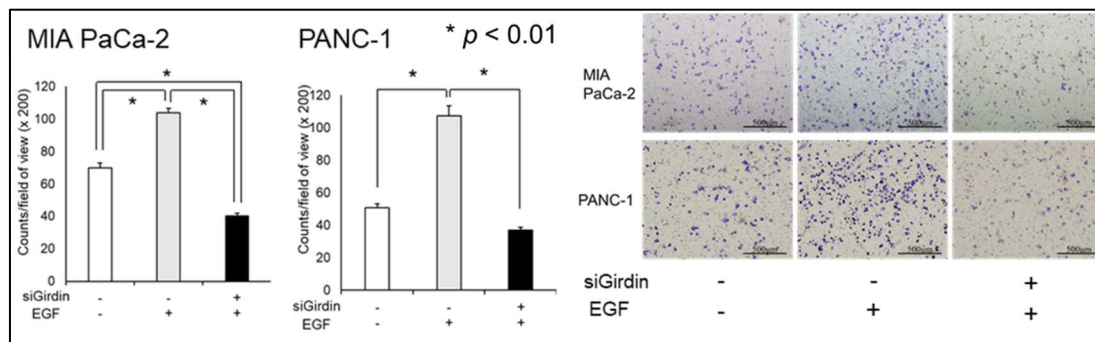


図2 siGirdin 膵癌細胞株における遊走能の変化

3.1.3 Girdin ノックダウンによる血管新生能の変化 (図3)

Girdin をノックダウンした MIA PaCa-2、AsPC-1、PANC-1 の細胞株に対して、血管新生因子 VEGF-A の qRT-PCR を行ったところ、いずれの siGirdin 株においても発現が抑制された。また同様に、siGirdin 株の培養上清を用いて VEGF-A ELISA を行ったところ、いずれの siGirdin 株においても VEGF-A の分泌抑制を認めた。in vitro での tube formation assay では、不死化 HUVEC として EA.hy926 細胞株を使用し、膵癌細胞株の培養上清で作成した調整培地により Matrigel 上で 16 時間培養した。その結果、膵癌細胞株の培養上清を用いた調整培地では管腔形成能の亢進を認めたが、siGirdin 株では有意に管腔形成能が抑制された。

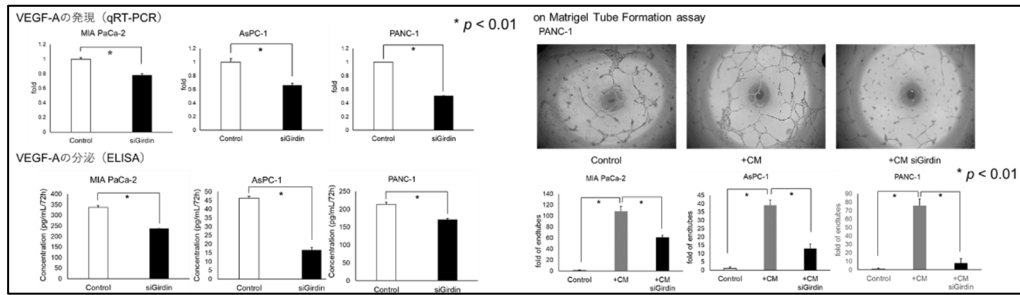


図 3 siGirdin 膵癌細胞株における血管新生能

3.2. 膵癌臨床検体における Girdin の発現解析 (図 4)

すべての膵癌組織において、癌細胞の細胞質に一致した Girdin の染色を認めた。ランゲルハンス島での染色強度に基づいて、染色強度を 4 つに分類した (-, +, ++, +++)。そのうち、弱染色群 (-, +) および強染色群 (++, +++) の 2 群にわけた (弱染色群 : 29 例、強染色群 : 61 例)。Kaplan-Meier 曲線による Log-rank 検定の結果、OS および RFS とともに、Girdin 強染色群で有意に予後不良であることが明らかとなった。

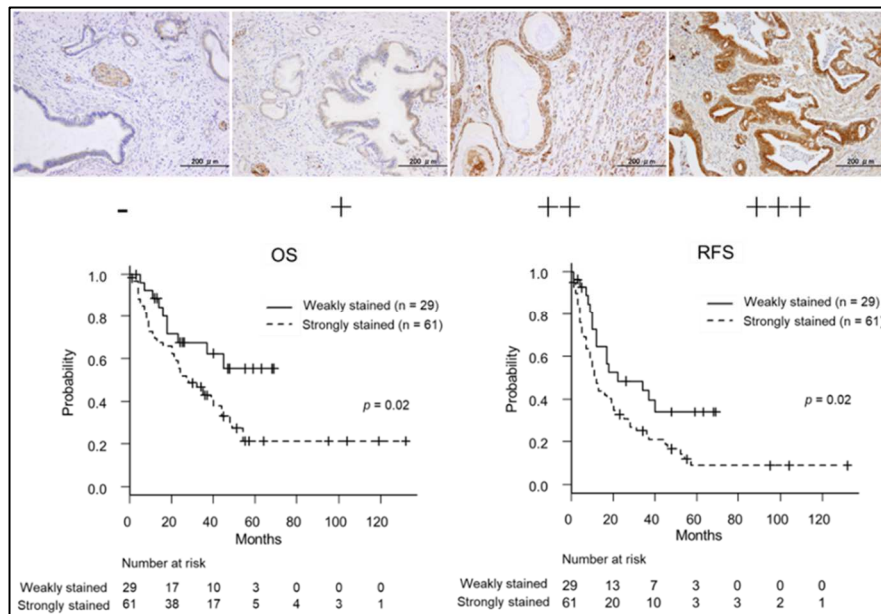


図 4 臨床膵癌検体における Girdin の発現解析

3.3 GEM 耐性膵癌における Girdin の発現変化 (図 5)

われわれの教室で樹立した GEM 耐性 MIA PaCa-2 について、Girdin の発現変化を qRT-PCR で検証したところ、GEM 耐性株において発現亢進を認めた。

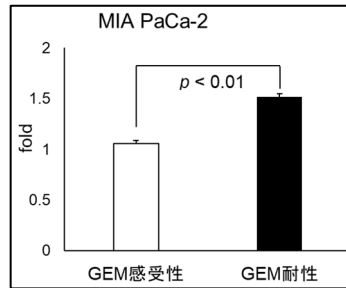


図 5 GEM 耐性株における Girdin の発現

4.考察

本研究の結果、膵癌において Girdin は遊走能および血管新生能に関与することが示唆された。遊走能の制御は、EGF 刺激下による Girdin のリン酸化が関与している可能性がある³⁾。一方、血管新生能については VEGF-A の転写発現に関与している可能性があるが、その詳細な分子生物学的メカニズムについてはいまだ判明しておらず、今後の課題である。膵癌臨床検体における Girdin の発現解析の結果からも、遊走能や血管新生能といった腫瘍進展能に Girdin が正の制御を行うことで、膵癌の予後を規定している可能性が考えられ、Girdin が新たな予後予測マーカーとなりうることが示された。

一方、化学療法、特に GEM 耐性に関する Girdin の機能解析については、研究途中であるが、Girdin の高発現が腫瘍の悪性能に関与していることから、化学療法耐性にも関与している可能性は考えられる。Wang ら¹²⁾によれば、膵癌において Girdin はオートファジータンパク質 p62/SQSTM1 と相互作用することでオートファジーを活性化し、膵癌における GEM に対する化学療法耐性を高める可能性があることを示している。そのため、Girdin の制御が GEM 感受性の上昇につながる可能性があり、膵癌治療における新たなブレイクスルーとなることが期待される。

5.結語

本研究により、Girdin が膵癌の進展能において重要な役割を担うことが示唆され、予後予測因子となりうることが考えられた。また、Girdin が化学療法耐性にも関わる可能性があり、今後のさらなる研究が期待される。

6.文献

- 1) Niedergethmann N, Alves F, Neff JK, Heidrich B, Aramin N, Li L et al. Gene expression profiling of liver metastases and tumour invasion in pancreatic cancer using an orthotopic SCID mouse model. *Br J Cancer*. 2007;97(10):1432-40.
- 2) Avan A, Narayan R, Giovannetti E, Peters GJ. Role of Akt signaling in resistance to DNA-targeted therapy. *World J Clin Oncol*. 2016;7(5):352-369.
- 3) Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K et al. Akt/PKB regulates actin

organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell*. 2005;9(3):389-402.

4) Kitamura T, Asai N, Enomoto A, Maeda K, Kato T, Ishida M et al. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol*. 2008;10(3):329-37.

5) Ito T, Komeima K, Yasuma T, Enomoto A, Asai N, Asai M, Girdin and its phosphorylation dynamically regulate neonatal vascular development and pathological neovascularization in the retina. *Am J Pathol*. 2013;182(2):586-96.

6) Anai M, Shojima N, Katagiri H, Ogihara T, Sakoda H, Onishi Y et al. A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J Biol Chem*. 2005;280:18525-35.

7) Wang S, Lei Y, Cai Z, Ye X, Li L, Luo X et al. Girdin regulates the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells via the PI3K/Akt signalling pathway. *Oncol Rep*. 2018;40:599-608.

8) Wang W, Chen H, Gao W, Wang S, Wu K, Lu C et al. Girdin interaction with vimentin induces EMT and promotes the growth and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 2020;44:637-649.

9) Dunkel Y, Ong A, Notani D, Mittal Y, Lam M, Mi X et al. STAT3 protein up-regulates Gα-interacting vesicle-associated protein (GIV)/Girdin expression, and GIV enhances STAT3 activation in a positive feedback loop during wound healing and tumor invasion/metastasis. *J Biol Chem*, 2012;287(50):41667-83.

10) Weng L, Enomoto A, Ishida-Takagishi M, Asai N, Takahashi M. Girdin for migratory cues: roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis. *Cancer Sci*. 2010;101(4):836-42.

11) Gu F, Wang L, He J, Liu X, Zhang H, Li W et al. Girdin, an actin-binding protein, is critical for migration, adhesion, and invasion of human glioblastoma cells. *J Neurochem*. 2014;131(4):457-69.

12) Wang S, Feng W, Wang W, Ye X, Chen H, Yu C. Girdin knockdown increases gemcitabine chemosensitivity to pancreatic cancer by modulating autophagy. *Front Oncol*. 2021;11:618764.

7.成果発表

学会発表

・林祐一, 松尾洋一, 大見関, 今藤裕之, 齊藤健太, 坪井謙, 森本守, 小川了, 高橋広城, 瀧口修司. 膵癌血管新生を標的としたアクチン結合タンパク Girdin の機能解析と治療への応用. 第42回癌免疫外科研究会. 山口 (web 開催) . 2021.

・林祐一, 松尾洋一, 上田悟郎, 村瀬寛倫, 青山佳永, 加藤知克, 大見関, 今藤裕之, 齊藤健太, 坪井謙, 森本守, 小川了, 高橋広城, 瀧口修司. 膵癌血管新生におけるアクチン結合タンパク Girdin の機能解析. 第30回日本がん転移学会学術集会・総会. 鳥取 (web 開催) . 2021.