

## 学位論文（博士）

Cathepsin B is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells and is associated with patients' surgical outcomes.

（CathepsinBは膵癌 stem like cells に高発現し、  
治癒切除後の予後と関連している）

氏名 藤本 拓也

所属 山口大学大学院 医学系研究科

博士後期課程

応用分子生命科学系専攻

令和2年11月

## 目次

1.	要旨	3
2.	背景	3
3.	方法	4
4.	結果	8
5.	考察	9
6.	謝辞	10
7.	参考文献	11
8.	図表	16

## 1. 要旨

【背景・目的】CathepsinB (CatB) はリソソームシステインプロテアーゼの一つであり、多癌種において健常者に比して高発現していることが報告されているが、その機能は不詳である。他方、癌の進行再発転移に癌幹細胞の関与が重要であるとされている。今回、膵癌において癌幹細胞と CatB の関連性について検討した。【方法・結果】2 種類の膵癌細胞株 (YPK-2、Panc-1) から当科で開発した誘導法を用いて、膵癌幹細胞に富んだ細胞集団 (P-CSLCs) を誘導し、癌と P-CSLCs において、2 次元電気泳動・WB を用いた CatB 定量発現解析、FCM を用いた細胞表面の CatB 発現解析、ELISA を用いた培養液内の CatB 発現解析をそれぞれ行ったところ、YPK-2、Panc-1 両細胞株ともに、タンパク定量解析、細胞表面発現解析、培養液内濃度解析いずれにおいても癌と比較して P-CSLCs において CatB が高発現していた。また、治癒切除可能であった浸潤性膵管癌 72 例を対象として CatB の免疫染色を行ったところ、CatB 高発現群において CatB 低発現群と比べて有意に全生存率が低いという結果を得た。【まとめ】本研究において、CatB が複数の局在における有用な膵癌癌幹細胞マーカーである可能性が示された。また、今後 CatB を癌の治療標的として研究を進めるうえで、癌幹細胞との関連を追及する必要性が示唆された。

## 2. 背景

膵臓癌は日本におけるがん関連死の 4 番目の主要な原因で (1)、ほとんどの患者は診断時に局所進行もしくは遠隔転移に至り、切除可能な腫瘍はわずか 15~20%とされている。(2)。さらに、膵臓癌は根治手術後の再発率が高く (無再発生存率、6.7~13.4 か月、5 年生存率 10.4~20.7%)、従来の化学療法と放射線療法に抵抗性がある症例も少なくない (3,4)。このため、効果的な補助化学療法と新しい免疫療法に関する研究が多数進行中であるが (5)、さらなる新しい治療標的が必要と考える。がんの局所再発率の高さや従来の治療に対する抵抗性や遠隔転移は、癌幹細胞らしさを有した細胞集団 (CSLC) と関連している (6-9) ことが言われているが、我々は CSLC の生物学的特性と今後いかなる治療的標的となりうるかについてさらなる研究が必要と考えている。

膵臓癌細胞の CSLCs においては、CD44、CD24 および ESA の高発現が報告されている (10)。さらに、アルデヒドデヒドロゲナーゼ 1 (11, 12)、CD133 (13)、c-Met (14) および CD44v (15) が高発現することも多方面でいわれているが、その他の P-CSLC の新しいバイオマーカーを探索する研究はなされていない現状がある。我々は独自の方法で膵癌細胞株から CD44 および CD24 高発現する P-CSLC に富んだ細胞集団を誘導する方法を研究し、これが P-CSLC のバイオマーカーを研究するのに非常に有用と考えている。

CathepsinB (以下 CTSB) は、リソソームシステインの一種で、339 アミノ酸として合成されるプロテアーゼ (17, 18) に 17 アミノ酸のシグナルペプチドを持つプレプロ酵素粗面小胞体であり、一般的なリソソームのタンパク質代謝回転に関連している、(19, 20)。このタンパク質は複数のレベルの役割があり、一般的に癌の進行に関与している可能性があ

るといわれている (21)。SP1、SP3、および ETS1 タンパク質は CTSB 転写を活性化することが知られており (22)、この SP1 および SP3 タンパク質は一般的に癌細胞および組織で高度に発現され (23)、ETS1 も癌の浸潤に関連しているとされる (24, 25)。本研究では、P-CSLC において CTSB の発現がどのように高発現し、これが患者の術後転機とどのように関連しているかを検討した。

### 3. 方法

#### 【患者背景と手術標本】

山口大学病院 (2001 年 6 月～2013 年 6 月)、および大阪大学病院 (2008 年 3 月から 2012 年 10 月) (大阪、日本) において D2 以上のリンパ節郭清 (日本膵臓学会分類 (26)) を伴う根治的切除を受けた浸潤性膵管癌患者の手術標本を用いて、後方視的に各臨床因子と予後の関連を検討した。各機関で書面によるインフォームドコンセントが参加者から得られた。患者が受けた術前治療の内訳は、ゲムシタビン単独、ゲムシタビンと放射線、ゲムシタビン/ S-1 と放射線またはゲムシタビンと重イオン放射線であった。術後治療の内訳は、ゲムシタビン単独、S-1 単独、ゲムシタビンと免疫細胞治療または免疫細胞療法であった。彼らが手術関連の原因で死亡した場合、または他の原因で死亡した症例は除外した。また、浸潤性膵管癌以外の症例 (漿液性および粘液性の嚢胞性膵臓腫瘍、膵管内乳頭粘液性新生物に由来する膵臓癌) も除外され、病理学的に切除断端が陽性であったなど明らかに残存癌があった症例も除外された。山口大学病院の患者 77 人と大阪大学病院の患者 64 人から前述の除外規定のもと、計 69 人の患者を適格患者とみなして研究対象とした。表 1 にリストされているよう臨床病理学的特徴を得るために患者の医療記録からはそれらをレビューした。研究プロトコルは山口大学の倫理審査委員会、大阪大学の倫理審査委員会にて承認され、腫瘍-リンパ節転移 (TNM) 病期分類は UICC の管理基準 (27) 基づいて分類を行った。

#### 【細胞株および培養液】

ヒト膵臓がん細胞株 YPK2 は山口大学医学部消化器・腫瘍外科学講座にて樹立された (28)。今回 同様の研究で使用した一般的な膵臓癌細胞株である PANC-1 は American Type Culture Collection (ATCC) 社から購入したものを使用し、各癌細胞は 10% の熱不活化ウシ胎児血清 (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を追加した DMEM-F12 培地 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) で 37°C および 5% CO<sub>2</sub> で維持した。

#### 【P-CSLC の生成】

P-CSLC が豊富な集団は、前述のように YPK2 および PANC-1 細胞から生成した (16)。まず、白血病抑制因子 (Merck KGaA)、神経生存因子-1 (Lonza Group, Ltd.) および N-アセチル-L-システイン (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) を含む無血清培地で各癌細胞を培養し、球体形成を伴う細胞集塊を誘導した。これらの球体を収集し、B27 サプリメント (Thermo Fisher Scientific, Inc.)、ヒト組換え上皮成長因子 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA)、およ

び塩基性線維芽細胞成長因子 (MerckKGaA) を含む培地を含むラミネンコーティングした培養皿に移し、以後、培地の半分を毎週交換し。その後 この培地から得られた細胞を YPK2-Lm および PANC-1-Lm と名付けた。

【2 次元電気泳動およびマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析およびタンデム質量分析 (MALDI TOF / TOF MS)】

死細胞除去マイクロビーズ (Miltenyi Biotech GmbH) で標識することにより死細胞を培養物から排除した。そして、MidiMACS セパレーター (Miltenyi Biotech GmbH) を備えた LS カラムを使用して分離した。CD44v9 陽性細胞は、ラット抗 CD44v9 IgG (1:50; クローン RV3; カタログ番号 LKG-M003; Cosmo Bio Co, Ltd)、マウスビオチン結合抗ラット IgG (1:2,000; cat.no. 13-4813-85; eBioscience; Thermo Fisher Scientific, Inc.) およびマウス抗ビオチン IgG マイクロビーズ (cat. No. 130-090-485; Miltenyi Biotech GmbH) を用いた。それぞれ製造元の指示に従って MidiMACS セパレーターを使用して分離を実行した。各サンプルを 0.2% 薬剤に懸濁し、5 M 尿素、2 M チオ尿素、2% (w / v) CHAPS、2% (w / v) SB3-10、および 1% (w / v) DTT を含む溶解バッファーでホモジナイズした。(Sigma-Aldrich のすべての試薬; Merck KGaA)。タンパク質濃度は、タンパク質アッセイキット (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用して測定しました。サンプルは前述のように 2D 電気泳動にかけられました (29, 30)。簡単に説明すると、サンプルを 18 cm Immobilized DryStrips (pH 3.0-10.0; GE Healthcare) にアプライし、CoolPhoreStar IPG-IEF Type-P (Anatech-Analytical Technology) を使用して等電点電気泳動を行った。

次に、DryStrips を、ANDERSON ISO-DALT マルチプル電気泳動システム (Hoefer Inc.) を使用して 2D 勾配電気泳動 (9~18% アクリルアミド、FUJIFILM Wako Pure) にかかけました。SYPRO Ruby 染色 (S21900; Thermo Fisher Scientific, Inc.) で染色した後、Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用してタンパク質スポットを検出し、ImageMaster 2D Platinum ソフトウェアバージョン 5.0 (GE Healthcare) を使用して分析しました。

YPK2-Lm 細胞 (それぞれの親細胞 (癌細胞) と比較して) の強度が高い一般的なタンパク質スポットを切り出し、MALDI TOF / TOFMS 分析にかけ、それぞれの親細胞と比較して YPK2-Lm 細胞における発現強度が高い一般的なタンパク質スポットを切り出し、MALDI TOF / TOFMS 分析を行った。切除したサンプルを脱色し、洗浄し、アセトニトリルで脱水しました。ゲルを 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>、5 mM CaCl<sub>2</sub>、0.01 μg / μl トリプシン (Promega Corporation) を含む消化液で再水和し、5% TFA を使用して消化停止。ペプチドは、50% アセトニトリル中の 5% TFA を使用して抽出。サンプルを ZipTipC18 ピペットチップ (Merck KGaA) に吸収させ、50% アセトニトリル中の 0.1% TFA を使用してペプチドを溶出する。

溶出したサンプルのアリコート等を等量のマトリックス溶液 (0.3 g / 1 α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸、33% アセトン、66% エタノール、(すべて Wako Chemicals GmbH 製) と混合

し、ターゲットプレート (MTP Anchorchip 600/384; Bruker Corporation) に配置し、MTP Anchorchip を使用して脱水し、質量分析計 (Ultraflex TOF / TOF; Bruker Corporation) を使用して陽イオン反射モード (20~4,000 m / z) で分析を行った。MS / MS スペクトルは、Mascot データベース検索エンジン (Matrix Science, Ltd.) を用いた。

#### 【Western blotting】

細胞を、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、5 mM EGTA、0.2%SDS、0.5%Nonidet P-40、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、20 mM ピロリン酸ナトリウム、および Roche 完全プロテアーゼ阻害剤混合物を含むバッファーで溶解。タンパク質量は、DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用した Lowry 法によって定量化した。

タンパク質 (10 µg / レーン) を 8%ゲルにロードし、SDS-PAGE を使用して分離し、PVDF メンブレン (Bio-Rad Laboratories, Inc.) に転写し、膜を 3%スキムミルクで室温で 1 時間ブロックし、抗 CTSB (カタログ番号 ab58802; Abcam) および抗バロシン含有タンパク質 (VCP; カタログ番号 GTX113030; GeneTex, Inc.) で処理した。VCP のタンパク質レベルは、GAPDH やアクチンなどの使用済みローディングコントロールと比較してより安定しているため、VCP をローディングコントロールとして使用した (31-33)。

#### 【Flow cytometry】

YPK2 および YPK2-Lm 細胞の表面での CTSB の発現をフローサイトメトリーにて分析した。

分離した細胞を 2%FBS を含む PBS (10<sup>6</sup> 細胞/100 µl) に懸濁し、各抗体を 4°C で 30 分間。

このアッセイの抗体は、ラット抗ヒト CD44v9 (1:50; クローン RV3; カタログ番号 LKG-M003; Cosmo Bio Co., Ltd.)、抗カルレティキュリン (CALR; 1 : 50; カタログ番号 ab196159; Abcam) および抗 CTSB (1:20; カタログ番号 ab58802; Abcam)。

マウス FITC 結合抗ラット IgG2a 二次抗体 (1:10; カタログ番号 11-4811-85; eBioscience; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を抗 CD44v9 一次抗体に使用。

抗 CTSB および同族のアイソタイプコントロール抗体は、以下を使用して APC と結合しました。製造元の指示に従った APC コンジュゲーションキット (カタログ番号 ab201807; Abcam)。ラット IgG2a κ アイソタイプコントロール (カタログ番号 14-4321-82; eBioscience; Thermo Fisher Scientific, Inc.)、ウサギ IgG アイソタイプコントロール Alexa Fluor 647 (カタログ番号 ab199093; Abcam) およびマウス IgG2a κ モノクローナルアイソタイプコントロール (カタログ番号 ab199093; Abcam) cat. no. ab18415; Abcam) を、抗 CD44v9、抗 CRT Alexa Fluor 647、および抗 CTSB と対応する希釈係数のネガティブコントロールとして使用しました。フローサイトメトリー分析は、FACS ARIA-III (BD Biosciences) および MACSQuant アナライザーバージョン 2.4 (Miltenyi Biotec GmbH) を使用して分析を行った。

### 【ELISA】

CTSB 分泌を定量化するために、馴化培地を収集し、製造者の指示に従ってヒトカテプシン B ELISA キット（カタログ番号 ab119584; Abcam）を使用した。

EnVision プレートリーダー（PerkinElmer、Inc.）を使用して信号を検出した。

### 【免疫染色】

ホルマリン固定パラフィン包埋手術標本（10%ホルマリンで室温で一晩固定）を用いて CTSB の免疫組織化学的染色を実施。厚さ 4 $\mu$ m の検体中の抗原は、組織を 10 mM Target Retrieval Solution、pH 6.0（Dako; Agilent Technologies、Inc）下に 95°C で 20 分間加熱し、105°C で 10 分間煮沸することで回収した。内因性ペルオキシダーゼ活性は、メタノール中の 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を使用して室温で 5 分間ブロックし、非特異的結合は、Protein Block 無血清（Dako; Agilent Technologies、Inc.）を使用して室温で 10 分間ブロックしました。

スライドをマウスモノクローナル抗 CTSB 抗体（1 : 3,000; カタログ番号 ab58802; Abcam）と室温で 1 時間インキュベートし、続いてラット抗マウス抗体（未希釈溶液; カタログ番号 K4001; Dako; Agilent Technologies、Inc.）室温で 30 分間。組織切片を 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩（Dako; Agilent Technologies、Inc.）とインキュベートし、ヘマトキシリンを使用して室温で 2 分間対比染色した。浸潤性膵臓癌の切除標本における CTSB 染色の強度は、患者の特徴を知らされていない病理医（A0）によって、陰性または陽性のいずれかに分類された。CTSB 高発現症例は、位相差顕微鏡（BZ-X700; KEYENCE）を使用して、100 倍の倍率で 5 つ以上の視野の 30% 以上を陽性染色が占める症例として定義した。また、CTSB 低発現症例は、CSTB 陰性、および、陽性染色が視野の 30% 未満を占める症例と定義した。CSTB 中等度発現症例は、高発現症例と低発現症例の中間の症例として定義した。

### 【統計解析】

各実験は少なくとも繰り返された 3 回のデータの平均±標準偏差として表した。

統計分析では、CTSB の発現が高い患者と低い患者を比較し、Fisher's の直接確率検定を使用して、患者の臨床病理学的特徴と臨床転帰を比較しました。また、生存結果の分析には Kaplan-Meier 法と Log-Rank 検定を使用。2 つまたは 3 つのグループ間の有意差は、Welch's t-test or ANOVA with Scheffe's test を使用してそれぞれ評価を行った。すべての分析は、R バージョン 3.4.0 ソフトウェア (<http://www.r-project.org/>) を使用して実行した。P < 0.05 をもって統計的に有意差ありとした。

## 4. 結果

### 【2次元電気泳動における CTSB の発現】

YPK2-Lm、YPK5-Lm 細胞（誘導された P-CSLC）および親 YPK2、YPK5 細胞からのタンパク質発現を、以前に実行された 2D ゲル電気泳動からの MALDI TOF / TOF MS データを使用したプロテオーム解析を使用して比較した (30)。2D ゲル電気泳動により、YPK2 細胞と比較して YPK2-Lm において 10 倍高発現しているスポットを認め (図 1C および D)、このタンパク質は MALDI TOF / TOF MS アッセイにて CTSB であることを同定した (図 1E)。

### 【Western blotting】

ウエスタンブロットングにより、親細胞と比較して YPK2-Lm 細胞で CTSB 発現が上昇していることが確認された (図 1F)。CTSB として同定された対応するスポットは、YPK5 誘導体からのゲルでも同様の結果が得られた (データは示していません)。

### 【フローサイトメトリー】

YPK2 および YPK2-Lm 細胞の表面でのタンパク質発現をフローサイトメトリーを用いて評価した結果、YPK2-Lm 細胞の表面での CTSB の発現がわずかに上昇していることを確認した (図 2)。YPK2-Lm 細胞で CD44v9 と CALR のわずかに上昇した発現が観察され (図 3)、以前の研究 (30) で説明されているように P-CSLC が生成されたことが確認された。CTSB および CD44v9 の発現の上昇は、親の PANC-1 細胞と比較して PANC-1-Lm 細胞でも見られた (図 S1 および S2)。また、PANC-1-Lm 細胞でも親の PANC-1 細胞と比較して CTSB および CD44v9 の発現上昇を認めた (図 S1 および S2)。

### 【CTSB の発現と臨床転帰の関連性】

患者選択プロセスを図 4A に示し、腫瘍標本における CTSB 発現の代表的な画像を図 4B に示す。正常組織は最小限の CTSB 染色を示したが、CTSB の発現は主に癌性組織の細胞質で検出され、一部の症例では核または膜の染色も示した (図 4B)。それらの染色位置に加えて、びまん性染色から顆粒球またはゴルジ領域さえも含む染色に至るまで、幅広い変動があった。CTSB の発現が低いグループと高いグループ間の臨床転帰を比較すると、高い発現は、以下を含むより進行した疾患パラメーターと有意に関連していることがわかった。腫瘍サイズ ( $P = 0.045$ )、浸潤深度 ( $P = 0.002$ )、リンパ節転移 ( $P = 0.016$ ) および TNM 病期 ( $P = 0.038$ ) (表 I)。さらに、高発現群は低 CTSB 発現群と比較して腭臓頭部腫瘍の症例が有意に多く、全生存率が低かった (図 5)。



#### 【YPK2 細胞培養液内の CTSB 濃度】

ELISA を使用して、YPK2 および YPK2-Lm 細胞による CTSB の細胞分泌を評価した。結果は、YPK2 細胞と比較して YPK2-Lm 細胞の培地中の CTSB の濃度が有意に上昇していることを明らかにした ( $P < 0.05$ ; 図 6)。PANC-1 細胞と比較して PANC-1-Lm でも同じ結果が得られた ( $P < 0.05$ ; 図 S3)。

## 5. 考察

CTSB の機能は動的であり、その詳細な機能は十分に明らかになっていない。ただ、リソソームプロテイナーゼをコードする CTSB は、正常な生理学的状態だけでなく、炎症・感染・神経変性疾患などの病的状態、および胃、結腸直腸、膵臓、および乳房を含むいくつかの種類の癌の悪性進行においても役割を果たすとされる。(34-38)。

しかしながら、CTSB が、腫瘍細胞や腫瘍関連細胞、またはその両方で発現しているかどうかや、CTSB の発現が細胞または非細胞微小環境との相互作用にどのように影響を与えるかまた影響を受けるかはわかっていない (21)。そのような中、CSC と CTSB の発現との関連を述べる研究もされている (39)。

本研究では、当教室から先だって報告された誘導方法 (16, 30) を用いて P-CSLC を生成した。この方法で誘導された YPK2-Lm 細胞は親 YPK2 細胞と比較して CD44v の集団が多だけでなく、副集団と ALDH 活性も高いことが示し、さらには、腫瘍形成能および上皮間葉転換の増強は、マウス皮下注射および定量的 PCR 分析の両方によって確認された。

当研究のタンパク質分析では、親株である膵臓癌細胞株と比較して、P-CSLC において CTSB がより高度に発現されていた。ウエスタンブロット分析でも、CTSB が P-CSLC で高度に発現していることが確認でき、フローサイトメトリーでは、P-CSLC の表面で CTSB の発現が上昇していることが明らかになった。以前からの報告にあるように、細胞表面に発現する CD24、CD44、CD44v および CALR は、膵臓癌幹細胞の同定に有用なマーカーであるが (30)。本研究の結果を考えると、それらと同様に CTSB も細胞表面発現および総タンパク質発現が予後を反映する有用なバイオマーカーとなりうることが示唆される。

また、本研究で CTSB 染色強度の高い腫瘍標本を調べたところ、これらの症例のほとんどが主に細胞質に強い染色を示したが、細胞質のみならず核または膜の染色も示す症例も混在していた。びまん性染色から顆粒球またはゴルジ領域を含む染色に至るまで、これらの組み合わせた症例の染色位置には幅広い変動があった。さらに、切除標本における高い CTSB 発現は、進行した疾患パラメーター (より大きな腫瘍サイズ、より深い浸潤深度、リンパ節転移陽性およびより進行した TNM 病期) およびより低い全生存率と有意に関連しており、これは以前に報告された結果と一致していた (40)。これらの結果は、CTSB が膵臓がんの進行に関連しているという仮説も支持しています。CTSB は一般に、腫瘍の成長、

移動、浸潤、血管新生に寄与することが報告されている (38)。特に、腫瘍組織および腫瘍浸潤免疫細胞における CTSB とその阻害剤の両方の発現の観察は、それらが膵管腺癌関連の炎症に関与している可能性があることを示唆している (41)。

前述のような膵臓癌組織で観察されたびまん性 CTSB 染色を考慮し、次に CTSB の分泌に関して invitro で調べたところ、親細胞用培地と比較して、P-CSLC 用培地中のより高い CTSB 濃度が観察され、これは、CTSB が P-CSLC の細胞表面に発現され、これらの細胞によって分泌されている可能性を示唆した。

したがって、P-CSLC の CTSB は、細胞外微小環境に直接的または間接的に影響を及ぼし、悪性腫瘍の進行に寄与する可能性があります。これらの結果は、2 つの膵臓癌細胞株 (PANC-1 および YPK2) から生成された P-CSLC を使用していずれも同様の結果を得たことにより、本研究で得た知見は細胞株特異的ではないことを示唆している。

すでに、CTSB が複数の癌種 (膠芽腫、悪性髄膜腫、膵臓癌、乳癌、食道癌、および前立腺癌) において、複数の細胞内局在 (表面、細胞内、分泌物) で癌の進行に関与していることが広く報告されているが (40- 49)、P-CSLC における CTSB の機能的役割に言及した既報はない。特に、多くの癌マーカーの細胞内局在は、一般に単一の区画に限定しているとされるが、一部の高悪性度癌の悪性腫瘍は細胞内の局在が単一でないとも言われている。たとえば、サイトケラチンは固形腫瘍細胞の一般的なマーカーであり、高分化型腺癌では多くの場合細胞膜に発現しますが、高悪性度の低分化型腺癌では膜とゴルジ体に発現しません (50)。したがって、癌関連タンパク質が複数の局在を有することが高悪性度の腫瘍を示している可能性があるといえる。サイトケラチン (50) と同様に、CTSB も本研究で示されているように複数の細胞局在を伴う癌関連タンパク質であり、その局在と悪性腫瘍との関連は明らかではありませんが、本研究結果から癌幹細胞の悪性度に CTSB が関与している可能性を示唆される。

本研究により、CTSB の発現は一般的な膵臓癌細胞株から生成された P-CSLC で上昇し、切除された腫瘍標本での発現は術後の転帰不良と関連していることが明らかになった。このタンパク質が有用な治療標的であるかどうかはまだ不明だが、特に膵臓癌幹細胞に関連する複数の細胞内局在を有した有用な予後マーカーである可能性がある。

CTSB 発現の予後への影響、およびそれが潜在的な治療標的であるかどうかを明らかにするには、ゲノム編集や in vivo マウス実験などの遺伝子標的実験によるさらなる研究が必要と考える。

## 6. 謝辞

### 科研費

また、本研究をサポートしてくださった山口大学消化器・腫瘍外科学講座の技術補佐員、佐野昭子さん、兼安香織さん、竹ノ内博子さん、事務員そして大学院生の方々には深く御礼申し上げます。

## 7. 参考文献

1. The Editorial Board of the Cancer Statistics in Japan: Cancer statistics in Japan 2018. Foundation for Promotion of Cancer Research, Tokyo, pp 15, 2019.
2. Ryan DP, Hong TS and Bardeesy N: Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med* 371: 1039-1049, 2014
3. Murakami T, Hiroshima Y, Matsuyama R, Homma Y, Hoffman RM and Endo I: Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Ann Gastroenterol Surg* 3: 130-137, 2019.
4. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, Zülke C, Fahlke J, Arning MB, et al: Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: The CONKO-001 randomized trial. *JAMA* 310:1473-1481, 2013.
5. Torphy RJ, Zhu Y and Schulick RD: Immunotherapy for pancreatic cancer: Barriers and breakthroughs. *Ann Gastroenterol Surg* 2: 274-281, 2018.
6. Clevers H: The cancer stem cell: Premises, promises, and challenges. *Nat Med* 17: 313-319, 2011.
7. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, et al: Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100: 672-679, 2008.
8. Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC and Dirks PB: Tumour-initiating cells: Challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 8: 806-823, 2009.
9. Tsunedomi R, Yoshimura K, Suzuki N, Hazama S and Nagano H: Clinical implications of cancer stem cells in digestive cancers: Acquisition of stemness and prognostic impact. *Surg Today*: Feb 5, 2020 (Epub ahead of print). doi: 10.1007/s00595-020-01968-x.
10. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF and Simeone DM: Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67: 1030-1037, 2007.
11. Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, Kowalski J, Freed I, Murter C, Hong SM, Koorstra JB, Rajeshkumar NV, He X, et al: Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 102: 340-351, 2010.
12. Sureban SM, May R, Qu D, Weygant N, Chandrakesan P, Ali N, Lightfoot SA, Pantazis P, Rao CV, Postier RG and Houchen CW: DCLK1 regulates pluripotency and

- angiogenic factors via microRNA-dependent mechanisms in pancreatic cancer. *PLoS One* 8: e73940, 2013.
13. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ and Heeschen C: Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1: 313-323, 2007.
  14. Li C, Wu JJ, Hynes M, Dosch J, Sarkar B, Welling TH, Pasca di Magliano M and Simeone DM: c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology* 141: 2218-2227, 2011.
  15. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, et al: CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc<sup>-</sup> and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* 19: 387-400, 2011.
  16. Watanabe Y, Yoshimura K, Yoshikawa K, Tsunedomi R, Shindo Y, Matsukuma S, Maeda N, Kanekiyo S, Suzuki N, Kuramasu A, et al: A stem cell medium containing neural stimulating factor induces a pancreatic cancer stem-like cell-enriched population. *Int J Oncol* 45: 1857-1866, 2014.
  17. Rawlings ND, Barrett AJ and Bateman A: MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors *Nucleic Acids Res* 40: D343-D350, 2012.
  18. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B and Turk D: Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta* 1824: 68-88, 2012.
  19. Kirschke H, Barrett AJ and Rawlings ND: Proteinases 1: Lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* 2: 1581-1643, 1995.
  20. Mort JS and Buttler DJ: Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* 29:715-720, 1997.
  21. Aggarwal N and Sloane BF: Cathepsin B: Multiple roles in cancer. *Proteomics Clin Appl* 8: 427-437, 2014.
  22. Yan S, Berquin IM, Troen BR and Sloane BF: Transcription of human cathepsin B is mediated by Sp1 and Ets family factors in glioma. *DNA Cell Biol* 19: 79-91, 2000.
  23. Li L and Davie JR: The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann Anat* 192: 275-283, 2010.
  24. Dittmer J: The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* 2: 29, 2003.
  25. Buggy Y, Maguire TM, McGreal G, McDermott E, Hill ADK, O'Higgins N and Duffy MJ: Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br J Cancer* 91: 1308-1315, 2004.
  26. Japan Pancreas Society: General rules for the study of pancreatic cancer, The 6th Edition, Revised Version edn. Tokyo, Japan: Kanehara, pp 3-14,

2013.

27. Union for International Cancer Control (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours, 7th edition. Sobin LH, Gospodarowicz MK and Wittekind C (eds.). Wiley, New York, NY, 2010.
28. Yamamoto K, Yahara N, Gondo T, Ishihara T and Oka M: Establishment and characterization of a new human pancreatic cancer cell line, YPK-1. *Bull Yamaguchi Med Sch* 49: 33-42, 2002.
29. Gerashchenko BI, Yamagata A, Oofusa K, Yoshizato K, de Toledo SM and Howell RW: Proteome analysis of proliferative response of bystander cells adjacent to cells exposed to ionizing radiation. *Proteomics* 7: 2000-2008, 2007.
30. Matsukuma S, Yoshimura K, Ueno T, Oga A, Inoue M, Watanabe Y, Kuramasu A, Fuse M, Tsunedomi R, Nagaoka S, et al: Calreticulin is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells. *Cancer Sci* 107: 1599-1609, 2016.
31. Fujiwara N, Usui T, Ohama T and Sato K: Regulation of beclin 1 protein phosphorylation and autophagy by protein phosphatase 2A (PP2A) and death-associated protein kinase 3 (DAPK3). *J Biol Chem* 291: 10858-10866, 2016.
32. Enjoji S, Yabe R, Tsuji S, Yoshimura K, Kawasaki H, Sakurai M, Sakai Y, Takenouchi H, Yoshino S, Hazama S, et al: Stemness is enhanced in gastric cancer by a SET/PP2A/E2F1 axis. *Mol Cancer Res* 16: 554-563, 2008.
33. Yabe R, Tsuji S, Mochida S, Ikehara T, Usui T, Ohama T and Sato K: A stable association with PME-1 may be dispensable for PP2A demethylation-implications for the detection of PP2A methylation and immunoprecipitation. *FEBS Open Bio* 8: 1486-1496, 2018.
34. Ebert MP, Krüger S, Fogeron ML, Lamer S, Chen J, Pross M, Schulz HU, Lage H, Heim S, Roessner A, et al: Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. *Proteomics* 5: 1693-1704, 2005.
35. McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, Matley M, Coussens L and Warren R: A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. *Mol Med* 6: 450-460, 2000.
36. Srisomsap C, Subhasitanont P, Otto A, Mueller EC, Punyarit P, Wittmann-Liebold B and Svasti J: Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis. *Proteomics* 2: 706-712, 2002.
37. Wulfkühle JD, Sgroi DC, Krutzsch H, McLean K, McGarvey K, Knowlton M, Chen S, Shu H, Sahin A, Kurek R, et al: Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62: 6740-6749, 2002.
38. Mijanović O, Branković A, Panin AN, Savchuk S, Timashev P, Ulasov I and Lesniak

- MS: Cathepsin B: A sellsword of cancer progression. *Cancer Lett* 449: 207–214, 2019.
39. Tang KD, Liu J, Jovanovic L, An J, Hill MM, Vela I, Lee TK, Ma S, Nelson C, Russell PJ, et al: Adipocytes promote prostate cancer stem cell self-renewal through amplification of the cholecystokinin autocrine loop. *Oncotarget* 7: 4939–4948, 2016.
40. Niedergethmann M, Wostbrock B, Sturm JW, Willeke F, Post S and Hildenbrand R: Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 29: 204–211, 2004.
41. Komura T, Takabatake H, Harada K, Yamato M, Miyazawa M, Yoshida K, Honda M, Wada T, Kitagawa H, Ohta T, et al: Clinical features of cystatin A expression in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 108: 2122–2129, 2017.
42. Krueger S, Haeckel C, Buehling F and Roessner A: Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res* 59: 6010–6014, 1999.
43. Shimizu A, Nakayama H, Wang P, König C, Akino T, Sandlund J, Coma S, Italiano JE Jr, Mammoto A, Bielenberg DR and Klagsbrun M: Netrin-1 promotes glioblastoma cell invasiveness and angiogenesis by multiple pathways including activation of RhoA, cathepsin B, and cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 288: 2210–2222, 2013.
44. Withana NP, Blum G, Sameni M, Slaney C, Anbalagan A, Olive MB, Bidwell BN, Edgington L, Wang L, Moin K, et al: Cathepsin B inhibition limits bone metastasis in breast cancer. *Cancer Res* 72: 1199–1209, 2012.
45. Tummalapalli P, Spomar D, Gondi CS, Olivero WC, Gujrati M, Dinh DH and Rao JS: RNAi-mediated abrogation of cathepsin B and MMP-9 gene expression in a malignant meningioma cell line leads to decreased tumor growth, invasion and angiogenesis. *Int J Oncol* 31: 1039–1050, 2007.
46. Gocheva V, Zeng W, Ke D, Klimstra D, Reinheckel T, Peters C, Hanahan D and Joyce JA: Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev* 20: 543–556, 2006.
47. Andl CD, McCowan KM, Allison GL and Rustgi AK: Cathepsin B is the driving force of esophageal cell invasion in a fibroblast-dependent manner. *Neoplasia* 12: 485–498, 2010.
48. Guo M, Mathieu PA, Linebaugh B, Sloane BF and Reiners JJ Jr: Phorbol ester activation of a proteolytic cascade capable of activating latent transforming growth factor-betaL a process initiated by the exocytosis of cathepsin B. *J Biol*

Chem 277:14829-14837, 2002.

49. Steffan JJ, Snider JL, Skalli O, Welbourne T and Cardelli JA: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers and RhoA regulate acidic extracellular pH-induced lysosome trafficking in prostate cancer cells. *Traffic* 10: 737-753, 2009.

50. Bayrak R, Yenidünya S and Haltas H: Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in colorectal adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* 207: 156-60, 2011.

## 8. 图表

Table 1. Association between 30 cases of low cathepsin B expression and 39 cases of high expression and clinical features of patients with pancreatic cancer.

Clinical feature	Cathepsin B expression		P-value
	Low	High	
Age, years			0.366
<60	8	6	
≥60	22	33	
Sex			0.083
Male	8	19	
Female	22	20	
Tumor location			0.008
Pancreatic head	15	32	
Pancreatic body and tail	15	7	
Tumor size, mm			0.045
<30	23	20	
≥30	28	35	
Differentiation			0.690
Well	2	4	
Moderate-poor	28	35	
Invasion depth			0.002
T1+T2	9	1	
T3	21	38	
Lymph node metastasis			0.016
Negative	19	13	
Positive	11	26	
TNM stage			0.038
I	6	1	
II	24	38	
Perineural invasion			0.488
Negative	5	4	
Positive	25	35	
Portal invasion			0.803
Negative	19	26	
Positive	11	13	
Preoperative therapy <sup>†</sup>			0.058
None	18	32	
Performed	12	7	
Postoperative therapy <sup>‡</sup>			0.532
None	4	8	
Performed	26	31	

Data were analyzed using Fisher's exact test or  $\chi^2$  where appropriate. <sup>†</sup>Preoperative therapy included gemcitabine alone (n=1), gemcitabine plus radiation (n=10), gemcitabine/S-1 plus radiation (n=7) and gemcitabine plus heavy ion radiation (n=1). <sup>‡</sup>Postoperative therapy included gemcitabine alone (n=1), S-1 alone (n=34), gemcitabine plus immune cell therapy (n=16) and immune cell therapy alone (n=6). TNM, Tumor-Node-Metastasis.



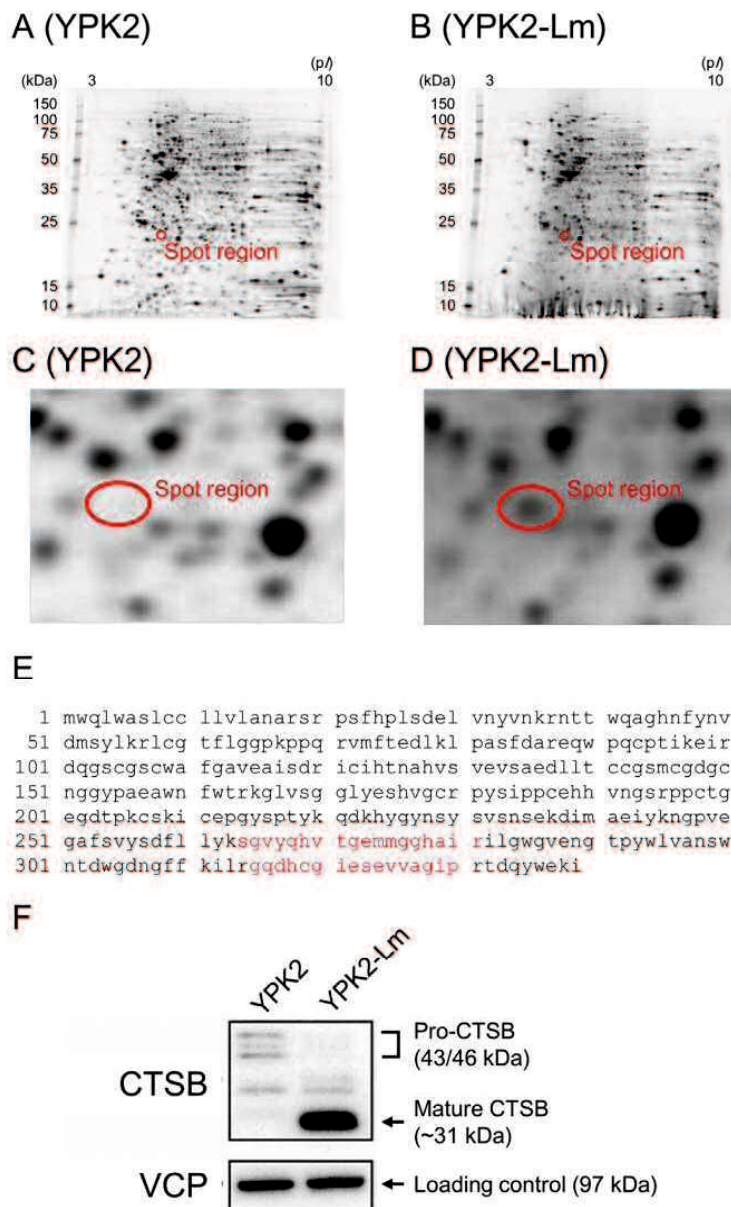


Figure 1. Identification of CTSB by proteome analysis. Representative two-dimensional gel electrophoresis images were previously shown (25). These images were obtained using proteins from (A and C) YPK2 and (B and D) YPK2-Lm. Red circles in C and D showed a 10-fold stronger corresponding spot in the YPK2-Lm compared with parental YPK2. (E) Identification of CTSB using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry, with matched peptides shown in red (264-281; score=10, 315-30; score=50). (F) Western blot analysis of YPK2 and YPK2-Lm. Anti-CTSB antibody employed in these analyses detects both mature CTSB (~31 kDa) and pro-CTSB (43/46 kDa). The expression level of VCP was used as a loading control. CTSB, cathepsin B; VCP, valosin-containing protein.

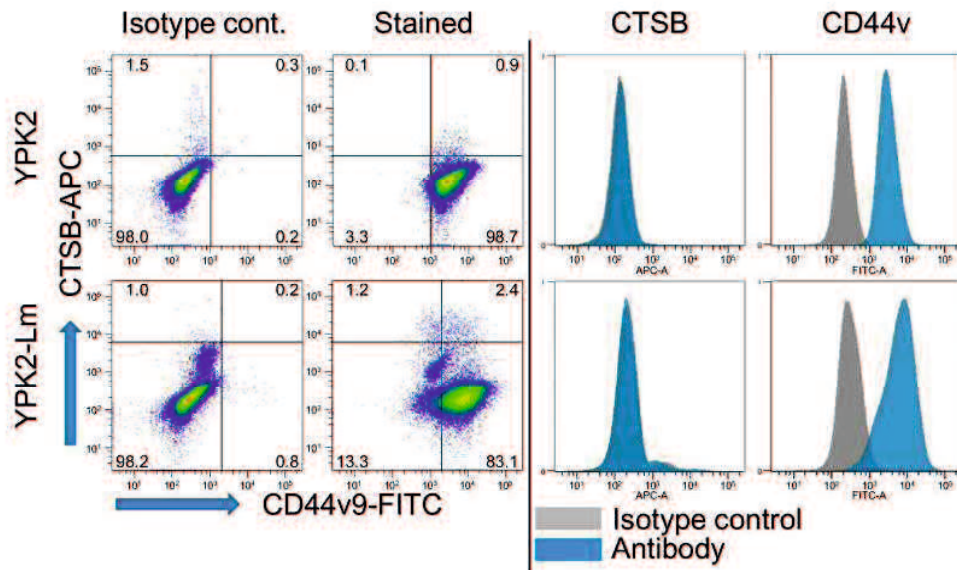


Figure 2. Expression of CTSB and CD44v9 on the surface of YPK2-Lm cells and YPK2 parental cells. Cells were stained with APC-conjugated anti-CTSB antibody and anti-CD44v9 antibody followed by FITC-conjugated anti-rat IgG2a secondary antibody and then separated using flow cytometry. Results indicated that CTSB was more highly expressed on the surface of YPK2-Lm cells compared with on YPK2 cells. Red histograms represent cells stained with isotype control antibodies. CTSB, cathepsin B; CD44v, variant isoforms of CD44.

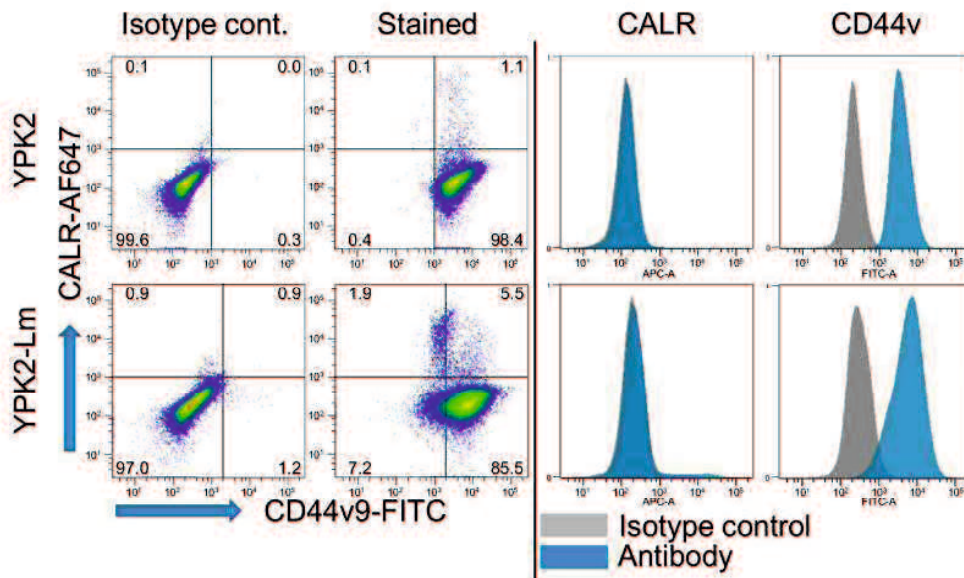
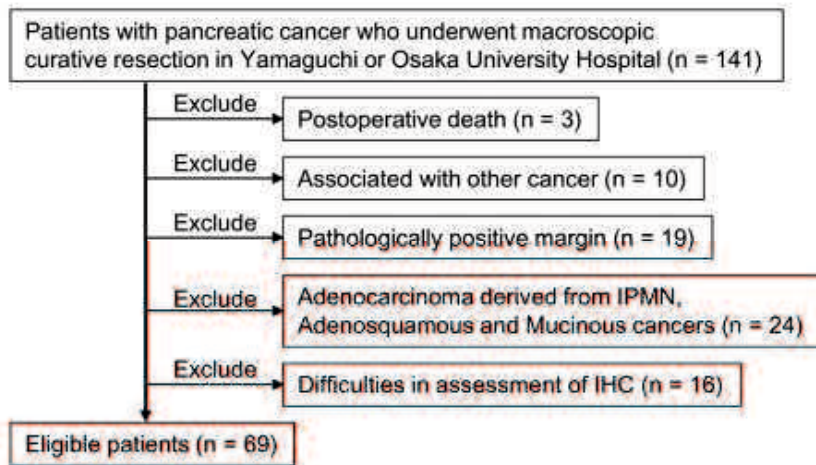


Figure 3. Expression of calreticulin and CD44v9 on the surface of YPK2-Lm cells and YPK2 parental cells. Cells were stained with Alexa Fluor 647-conjugated anti-CALR antibody and anti-CD44v9 antibody followed by FITC-conjugated anti-rat IgG2a secondary antibody and then separated by flow cytometry. Results indicated that CALR and CD44v9 were more highly expressed on the surface of YPK2-Lm cells compared with on YPK2 cells. Red histograms represent cells stained with isotype control antibodies. CD44v, variant isoforms of CD44; CALR, calreticulin; cont., control.

A



B

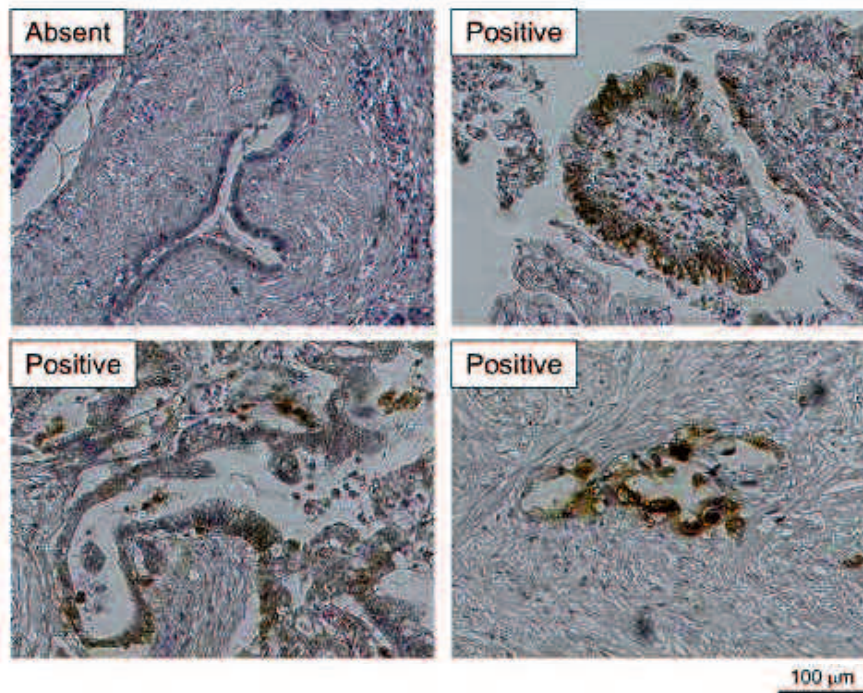


Figure 4. CTSB expression in resected pancreatic tumor samples. (A) Study flowchart. (B) CTSB expression in resected pancreatic tumor samples, categorized as negative (upper left panel) or positive (lower and upper right panels). CTSB, cathepsin B; IPMN, intraductal papillary mucinous neoplasm; IHC, immunohistochemistry.

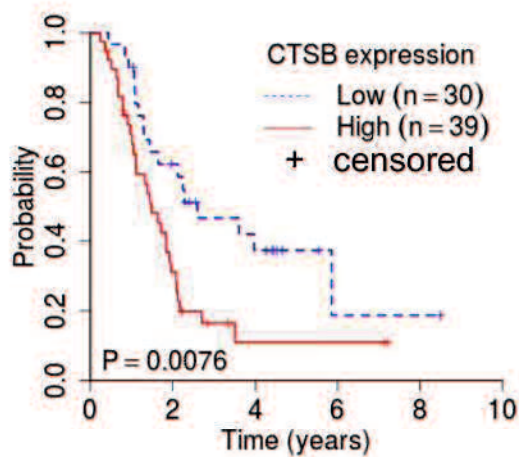


Figure 5. A Kaplan-Meier curve for CTSB expression in patients with pancreatic cancer. Overall survival rate according to high CTSB expression (red line, 39 patients) or low expression (blue dotted line, 30 patients). A P-value was calculated using the log-rank test. CTSB, cathepsin B.

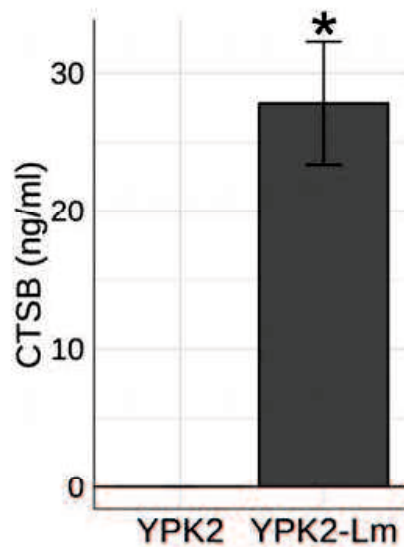


Figure 6. Concentrations of CTSB based on ELISA using media from cultures of YPK2 and YPK2-Lm cells. Results indicated that CTSB was present at a higher concentration in the culture media from YPK2-Lm cells compared with that from YPK2 cells. Each medium incubated in the absence of cells was used as a blank. Data were analyzed using Welch's t-test.  $P < 0.05$ . CTSB, cathepsin B.