

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591594

研究課題名（和文） 膵癌の浸潤・転移機序の解明と分子標的治療法の開発

研究課題名（英文） Identify the mechanism of invasion and metastasis of pancreatic cancer and development of novel treatment strategy.

研究代表者

石川 晋之（ISHIKAWA SHINJI）

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：80419639

研究成果の概要：（和文）

浸潤・転移能の高い膵癌は ORP5 を発現しており、ORP5 発現症例は予後不良であることが判明した。ORP5 はコレステロール合成経路を活性化することでその下流遺伝子である HDAC5 を制御し、PTEN の発現を誘導することで浸潤・転移能を獲得していることが判った。また、高コレステロール血症治療薬であるスタチンと HDAC inhibitor である TSA を併用することで相乗的な抗腫瘍効果が得られた。

研究成果の概要：（英文）

The expression of oxysterol binding protein related protein (ORP) 5 is related to invasion and a poor prognosis in pancreatic cancer patients. ORP5 induced the expression of sterol response element binding protein (SREBP) 2 and activated the downstream gene of sterol response element (SRE). Chromosomal immunoprecipitation (ChIP) using SREBP2 antibody revealed that HDAC5 was one of the downstream genes of SREBP2. The effect of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) were analyzed according to the expression level of ORP5. The invasion rate, growth was suppressed in cells that strongly expressed ORP5 in a time and dose dependent manner, but had less effect in cells weakly expressing ORP5, thus suggesting that when the potential of invasion and growth relies on the cholesterol synthesis pathway, it becomes sensitive to HMG-CoA reductase inhibitor. Furthermore, HDAC inhibitor, tricostatin A (TSA), induced the expression of phosphatase and tensin homologue (PTEN) as well when ORP5 was suppressed or the cells were treated with statin. Treatment with both statin and TSA showed a synergistic anti-tumor effect in cells that highly expressed ORP5. Therefore, in some pancreatic cancers, continuous ORP5 expression enhances the cholesterol synthesis pathway and this signal transduction regulates PTEN via HDAC5 expression. This is the first report of a detail mechanism of how the signal transduction of cholesterol synthesis is related to cancer invasion and why statins can suppress invasion and growth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：遺伝子，癌，シグナル伝達，分子標的治療，ORP5，コレステロール，膵癌

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は世界でも予後不良の悪性腫瘍である。検診の超音波によって発見されたときは既に進行していることが多いだけでなく、早期に発見され、根治術を施行されたとしても肝転移や腹膜播種を起こす症例が多い。さらには有効な化学療法剤もないことから膵臓癌の生物学的な特徴、特に浸潤転移機構を解明しない限り有効な治療手段を確立することは困難と考えられ、更なる治療成績の向上は望めない。

2. 研究の目的

予後不良である膵臓癌の転移、浸潤のメカニズムを解析することにより、標的となる分子、シグナル伝達経路を解明し、新規治療法、分子標的治療薬開発の一助とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ハムスター実験膵癌モデルから作成した高転移細胞株特異的に発現する分子(ORP5)を単離し、この分子を細胞内に導入あるいは抑制することで浸潤・転移能を検討する。

(2) ヒトORP5を単離し、ヒト膵癌細胞株でもORP5の抑制、導入によって浸潤能に違いが出ることを確認する。

(3) ORP5の抗体を用い、膵癌切除症例56例を免疫染色し、ORP5発現の有無と臨床病理学的因子との関係を検討。

(4) ORP5が強く発現しているヒト膵癌細胞株を使用し、siRNAで抑制した場合と、ORP5がほとんど発現していない細胞株にORP5を導入したときのmRNAの発現の違いをcDNA microarray(浸潤、転移に関連する遺伝子130種類)で検討。

(5) コレステロール合成経路、膵癌浸潤・転移との関連について検討。ORP5の発現、抑制により、コレステロール合成の鍵であ

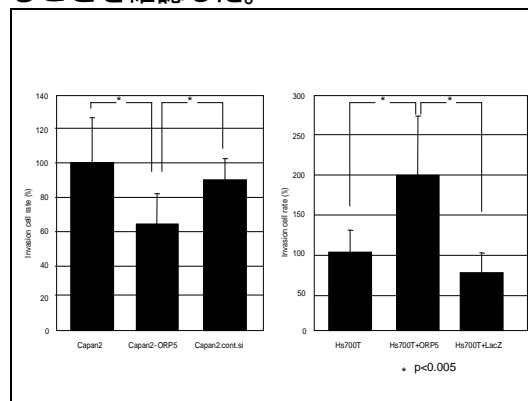
るSREBP2の発現を検討。さらに、SREBP2は特定のDNA配列(SRE)に結合するため、microarrayで検出された分子のゲノム領域にこの配列が存在するかどうか、結合するかどうかを検討する。

(6) 高コレステロール血症の治療薬であるHMG-CoAR inhibitor(statin類)を使用した膵癌増殖抑制の検討。また、新規抗がん剤であるHDAC inhibitorを併用することで相乗効果が得られるかどうかの検討も行う。

4. 研究成果

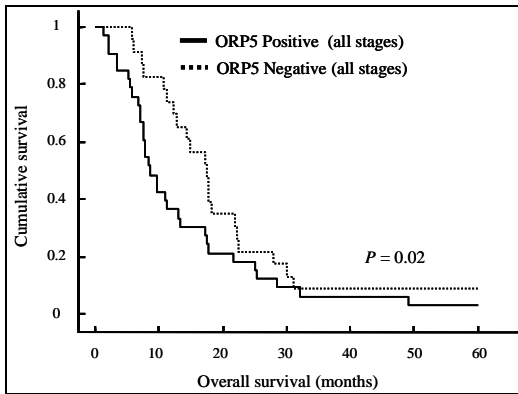
(1) ハムスターの実験膵癌の高転移株(PC-1.0)特異的に発現する分子の断片をRDA法で検出し、これをプローブとしてPC-1.0のcDNA libraryをスクリーニング。ハムスターのORP5を単離した。これを低転移株(PC-1)に発現させると浸潤能は上がり、siRNAで抑制すると浸潤能は抑制された。

(2) ヒトORP5の全長をクローニングし、ヒト膵癌細胞株でもORP5の発現は検討した5種類中4種類に認められた。ヒトORP5をハムスター細胞株での実験と同様に抑制、導入したところ、浸潤能に違いが出ることを確認した。



(3) 平成19年9月に同分子の抗体(ヒト)が発売となり、これを購入。ヒト正常組織を免疫染色したところ、脾臓、膵臓の一部、脳のプルキンエ細胞に発現が認められ、さらに、肝臓では非常に強く染まった。膵癌切除症例56例を免疫染色し、臨床病理学的因子と検討したところ、ORP5を発現している膵癌患者の予後は有意にORP5を発現していない患者より悪かった。特に1年生存率はORP5陰性群が73.9%に対してORP5陽性群が36.4%であった。

(Cancer Sci. 99, 2387-94, 2008)



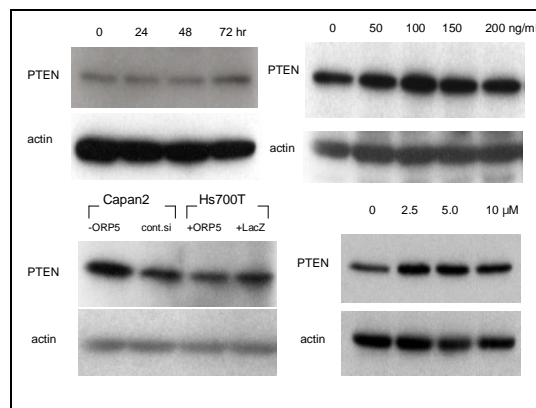
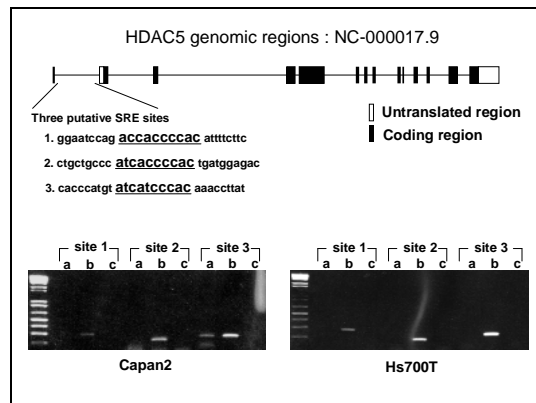
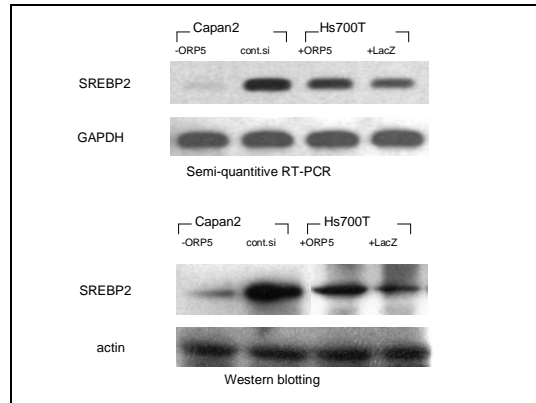
しかし、肝臓で非常に強く、しかも全体的に発現しているため、この分子を直接の標的とした場合、肝障害が出現することが容易に想像できるため、この分子を直接抑制するような治療は困難であると考えられた。そこで、この分子のシグナル伝達経路の解明（下流遺伝子の検索）を行うこととした。

(4) ORP5が強く発現しているヒト膵癌細胞株を使用し、siRNAで抑制した場合と、ORP5がほとんど発現していない細胞株にORP5を導入したときのmRNAの発現の違いをcDNA microarrayで検討。HDAC5、TGF beta 1に発現の違いが認められた。

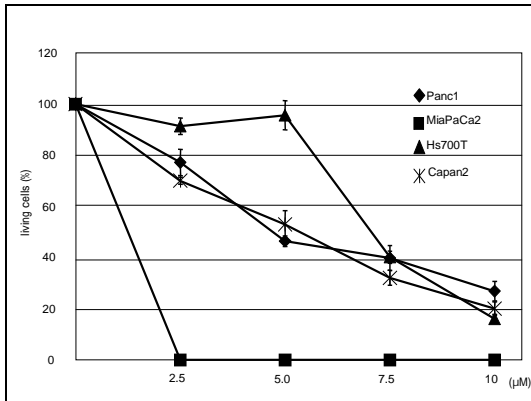
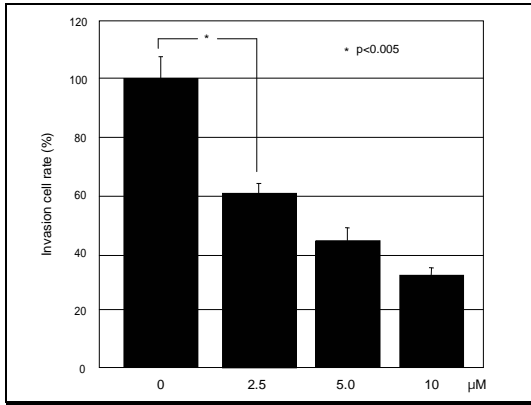
(5) ORP5 が肝臓で強く発現していること、名前のとおり、oxyxterol と関連があるはずの分子であることから、コレステロール合成経路と関わりがあると考え、ORP5 の抑制、導入のサンプルを使用し、SREBP2, HMG-CoA reductase の発現を mRNA レベルで検討した。ORP5 を抑制すると SREBP2, HMG-CoA reductase の発現が減少し、ORP5 の導入で発現が上昇した。このことは、ORP5 の発現がコレステロール合成促進に働くことを示唆している。

HDAC5 のプロモーター領域を検索したところ、3箇所 SRE (SREBP2 が結合する配列) を認め、そのうちの1箇所 SREBP2 が結合することを ChIP で証明した。また、経路はまだ不明であるが、癌抑制遺伝子である PTEN が ORP5 発現で抑制され、ORP5 抑制で発現が増強することが判った。つまり、ORP5 はコレステロール合成経路を活性化し、その下流には HDAC5 が存在し、これを制御することで PTEN の発現をも調節、結果的に浸潤能が

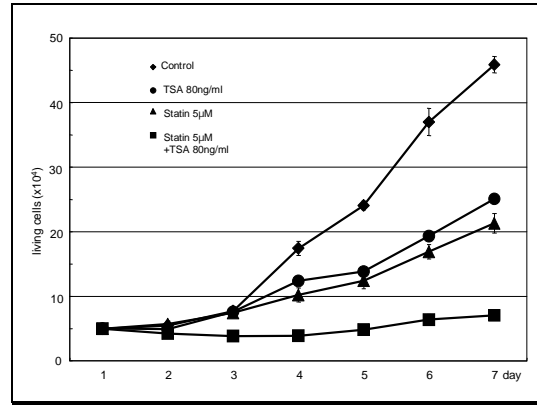
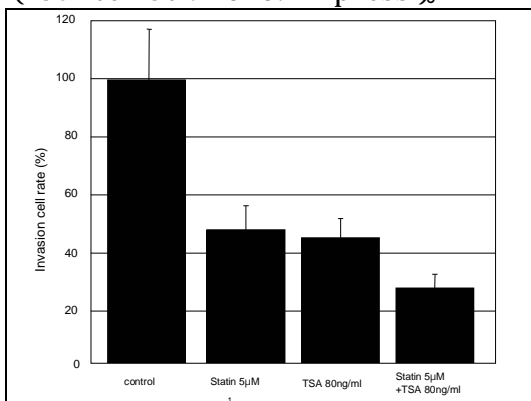
変わると考えられた。



(6) 以上より、10年以上解明されていなかった、高コレステロール血症治療薬であるスタチンが膵癌の浸潤抑制効果を持つ理由が解明された。事実、ORP5を強く発現している膵癌細胞株にスタチンを投与したところ、dose dependentに浸潤能が抑制され、ORP5の発現が弱い膵癌細胞株では低濃度のスタチンでも強い浸潤抑制が観られた。そして、ORP5をほとんど発現していない膵癌細胞株では5 μMのスタチン投与まで浸潤に影響がなかった。



ORP5 がコレステロール合成経路に強く関連しており、正常では肝臓で強く発現していることから、この分子を治療の直接のターゲットにすることは危険である。そこで、上記結果から、スタチンと HDAC inhibitor の併用による治療を考案。これらは同じ経路の別な箇所で作作用するため、治療の相乗効果が期待できると考えた。両者を併用したところ、浸潤能には明らかな相乗効果は認められなかったが、増殖能は強く抑えられ、相乗効果を認めた (Cancer Sci. 2010. in press)。



これまで疫学的な研究から生活習慣と癌との関連が報告されているが、我々は世界で初めてそのメカニズムの一つ(コレステロール合成経路と膵癌浸潤)を科学的に証明した。さらに、その経路を、既に製品化されている薬剤を二種類使用することで相乗的な抗腫瘍効果が得られることをも見出した。現在、国が推し進めている生活習慣病対策が癌の進行をも抑制する可能性が認められただけでなく、高価な分子標的治療薬を使用せずとも、安価な薬剤で予後不良な膵癌の進展を抑えることが出来る可能性も見出しているため、医療経済にも貢献できる結果である。このようにシグナル伝達 が判明し、使用すべき薬剤の選定も出来ており、臨床試験での検討も可能である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ishikawa S : The role of Oxysterol binding protein related protein 5 in pancreatic cancer. Cancer Science. (in press), 査読有

Koga Y : ORP5 (oxysterol-binding protein-related protein-5) is related to invasion and poor prognosis in pancreatic cancer, Cancer Science 99, 2387-94, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

森 啓史; 局所進行膵癌に対する治療戦略, 第40回日本膵臓学会大会, 2009年7月31日, 東京都, 京王プラザホテル

井田 智; Analysis of the chronic pancreatitis model mice induced the CDE diet,

第1回日本・モンゴル消化器癌シンポジウム
，2009年4月29日，ウランバートル（モンゴ
ル），モンゴル国立がんセンター

石川 晋之；コレステロール合成経路
とORP5：膵癌浸潤とスタチンの効果のメ
カニズム，第63回日本消化器外科学会，
2008.07.16，札幌，ロイトン札幌・札幌プ
リンスホテル

石川 晋之；脂質代謝関連遺伝子ORP5と
膵臓癌浸潤との関係，第108回日本外科学
会，2008.05.15，長崎，ベストウエスタン
プレミアホテル長崎

6．研究組織

(1)研究代表者

石川 晋之（ISHIKAWA SHINJI）

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医
師

研究者番号：80419639

(2)研究分担者

廣田 昌彦（HIROTA MASAHIKO）

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医
師

研究者番号：80284769

高森 啓史（TAKAMORI HIROSHI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：90363514

馬場 秀夫（BABA HIDEO）

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20240905