

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591596

研究課題名（和文） 癌-間質相互作用からみた膵癌脈管新生の分子生物学的解明

研究課題名（英文） The study for angiogenesis focused on the cell-stromal interaction in pancreatic cancer.

研究代表者

高橋 広城 (TAKAHASHI HIROKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30381792

研究成果の概要：

平成19年度において、膵癌細胞と線維芽細胞、HUVECをdouble chamber methodで共培養し、HUVECを染色して管腔形成能を評価した結果、肝転移能の高い膵癌細胞はHUVECの管腔形成能を亢進することを確認した。また膵癌細胞と線維芽細胞、LECをdouble chamber methodで共培養し、LECを染色してmigrationを評価した結果、Mia PaCa2はmigrationを亢進し、BxPC-3は亢進しないことをつきとめた。平成20年度においては、リンパ管新生に強く影響しているVEGF-Cの発現を、Real time PCRを用いて測定したところでは、Mia PaCa2ではVEGF-Cの発現が亢進し、BxPC-3では亢進していないことが判明した。同様にELISAでもMia PaCa2ではVEGF-Cの発現が亢進し、BxPC-3では亢進していないことが判明した。またコラーゲンゲル内でのLEC/fibroblastの共培養によるLECの管腔形成能は、Mia PaCa2との共培養により、有意に増加していた。またこれらMia PaCa2との共培養により増加していた管腔形成能は、VEGFR-3抗体にて阻害された。以上の結果から膵癌周囲のリンパ管形成は、VEGF-Cを中心にして、膵癌、リンパ管、線維芽細胞などによる、癌-間質相互作用があつて初めて形成されるものと考えられ、更なる検討を行うことにより、新たな分子標的治療のターゲットとなりうると思われた。

交付額

(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	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
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：膵癌、リンパ管新生、血管新生、サイトカイン、癌・間質相互作用

1. 研究開始当初の背景

膵癌は消化器癌の中でも悪性度の高い癌であり、その予後規定因子には肝転移やリンパ節転移、神経浸潤などがある。癌の様々な

特性は腫瘍細胞だけの特徴によるものではなく、周囲の正常組織との相互作用の結果として発現されることが提唱されてきた。癌細胞が分泌するサイトカイン等が線維芽細胞

に作用し、これらの間質細胞が成長因子を発現することで腫瘍の増殖、浸潤、転移能を亢進し、血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞に作用して脈管形成を亢進する。特に我々は、膵癌細胞および血管内皮細胞、線維芽細胞を共培養して血管内皮細胞の管腔形成能を比較検討し、癌-間質相互作用により血管新生能が亢進することを確認し、さらにそれは肝転移能とよく相関していることを証明してきた。

2. 研究の目的

癌-間質相互作用から見た膵癌脈管新生機構を分子生物学的に解明するために、膵癌細胞と間質細胞の共培養により脈管新生能を比較検討する。具体的には 1) 膵癌細胞の培養上清によるHUVEC細胞の管腔形成能の亢進程度を各膵癌細胞間で比較する。2) 膵癌細胞によるリンパ管内皮細胞のtube like formationの生成亢進の程度を各細胞間で比較する。3) 各膵癌細胞の培養上清のリンパ管新生因子(VEGF-C)をELISAで比較する。4) 同様の血管新生因子のmRNAレベルの発現をreal time PCRを用いて行う。

3. 研究の方法

癌-間質相互作用からみた膵癌脈管及びリンパ管新生機構を分子生物学的に解明するために、膵癌細胞と間質細胞の共培養により脈管新生能を比較検討し、そこに関わる既知未知のサイトカインを同定する

(1) cell culture

膵癌細胞株を高肝転移株と非肝転移株に分類しており、これらの膵癌細胞株を用いる。血管内皮細胞としてはhuman umbilical vein endothelial cell (HUVEC)を用いる。リンパ管内皮細胞は新生児皮膚由来のlymphatic endothelial cell (LEC)を用いる。このLECは抗リンパ管内皮細胞特異抗体のpodoplanin陽性を確認している。線維芽細胞は新生児皮膚由来を用いる。

(2) co-culture method (angiogenesis)

膵癌細胞と線維芽細胞、HUVECをdouble chamber methodで共培養し、HUVECを染色して管腔形成能を評価する。肝転移能の高い膵癌細胞はHUVECの管腔形成能を亢進することを確認していることから、転移能の異なる膵癌細胞を用いて共培養を行い、その培養上清を採取し以下の実験に用いる。

(3) co-culture method (lymphangiogenesis)

膵癌細胞と線維芽細胞、LECをdouble chamber methodで共培養し、LECを染色してtube-like formationを評価する。tube-like formationを亢進する細胞株と、亢進しない細胞株を同定し、その培養上清を採取して以

下の実験に用いる。

(4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

(2)、(3)で採取した培養上清を用いて、ELISAで蛋白定量を行う。VEGF-CおよびVEGF-Dも蛋白定量し、リンパ管新生(tube-like formation)との相関を検討する。

(5) realtime PCR

単独で継代培養した膵癌細胞株と、線維芽細胞と共培養した膵癌細胞株のRNAを抽出し、上述のサイトカインのRNA発現を定量する。同様に線維芽細胞におけるRNAレベルでのサイトカイン発現の定量を行い、co-cultureによる変化を検討する。

4. 研究成果

膵癌細胞と線維芽細胞、HUVECをdouble chamber methodで共培養し、HUVECを染色して管腔形成能を評価した結果、肝転移能の高い膵癌細胞はHUVECの管腔形成能を亢進することを確認した。膵癌細胞と線維芽細胞、LECをdouble chamber methodで共培養し、LECを染色しmigrationを評価した結果、Mia PaCa2はmigrationを亢進し、BxPC-3は亢進しないことをつきとめた。

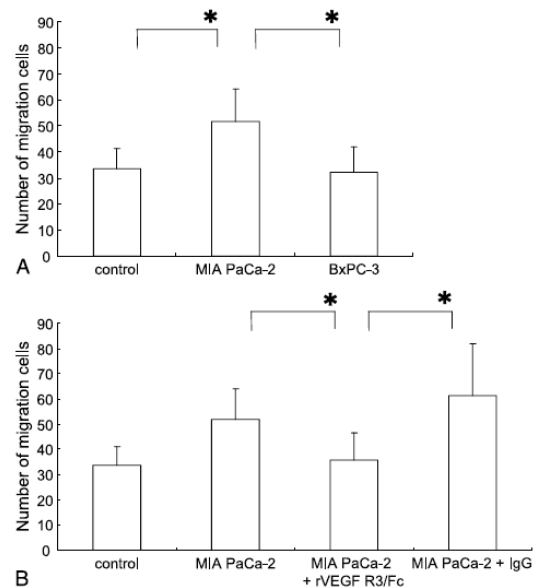


FIGURE 6. Enhancement of LEC migration by treatment with cancer cell supernatant and effect of rVEGF R3/Fc chimera. The reported number of migrating cells for each sample was the average of 12 different microscopic fields. **A**, Effect of MIA PaCa-2 cells on LEC migration compared with control (nonconditioned medium) and BxPC-3 cells (* $P < 0.01$). **B**, Effect of conditioned medium treated with rVEGF R3/Fc chimera (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or human IgG (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on LEC migration. Multiple comparisons were performed by nonrepeated measures ANOVA with the Student-Newman, Keuls test. Bars indicate SD, * $P < 0.01$ compared with MIA PaCa-2 plus rVEGF R3/Fc chimera.

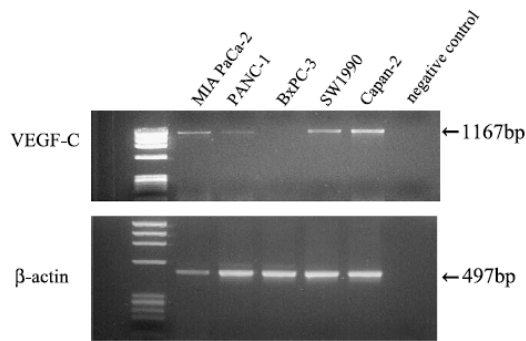


FIGURE 1. Detection of VEGF-C mRNA by reverse transcription-PCR in pancreatic cancer cell lines. The PCR amplifications were carried out using primer pairs designed from VEGF-C complementary DNA sequences. The PCR products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide; β -actin acted as a control.

平成20年度においては、リンパ管新生に強く影響しているVEGF-Cの発現を、Real time PCRを用いて測定したところでは、Mia PaCa2ではVEGF-Cの発現が見られたが、BxPC-3では認められないことが判明した。同様にELISAにおいても Mia PaCa2ではVEGF-Cの発現が高いが、BxPC-3ではほとんど見られないことが、蛋白レベルでも明らかになった。

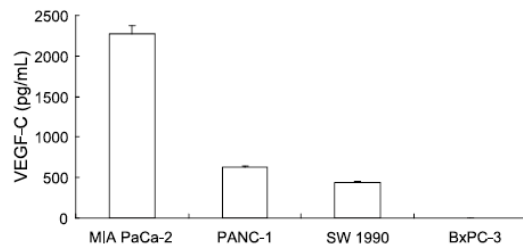


FIGURE 2. Quantification of VEGF-C protein in cultured medium using ELISA. Values are expressed as mean \pm SD.

またコラーゲンゲル内でのLEC/fibroblastの共培養によるLECの管腔形成能の評価を行ったところ、Mia PaCa2との共培養により有意に増加していた。

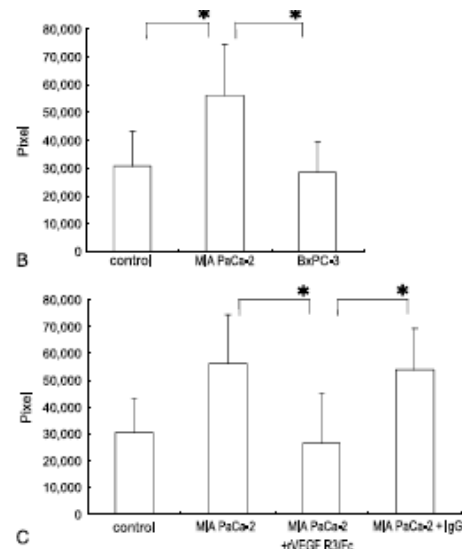
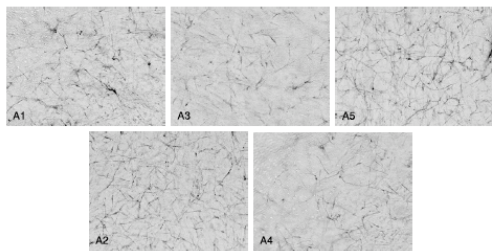


FIGURE 8. Effect of pancreatic cancer cells with different levels of secreted VEGF-C on capillary formation by LECs. A, MIA PaCa-2 or BxPC-3 cells were cultured with LECs and fibroblasts using a double chamber for 6 days: A1: control (coculture without pancreatic cancer cells); A2, coculture with MIA PaCa-2; A3, coculture with BxPC-3; A4, coculture with MIA PaCa-2 treated with rVEGF R3/Fc chimera; A5, coculture with MIA PaCa-2 treated with human IgG ($100 \mu\text{g}$). B, Capillary formation area for each condition measured using an image analyzer. Multiple comparisons were performed by nonrepeated-measures ANOVA with the student-Newman, Keuls test. Bars indicate SD, *P < 0.01 compared with control and BxPC-3 cells. C, Effect of rVEGF R3/Fc chimera or human IgG on capillary formation by LECs as enhanced by pancreatic cancer cells. MIA PaCa-2 or BxPC-3 cells, LECs, and fibroblasts were cocultured and treated with rVEGF R3/Fc chimera or human IgG. Multiple comparisons were performed by nonrepeated-measures ANOVA with the Student-Newman, Keuls test. Bars indicate SD, *P < 0.01 compared with coculture with MIA PaCa-2 cells treated with rVEGF R3/Fc chimera.

またこれら Mia PaCa2 との共培養により増加していた管腔形成能は、VEGFR-3 抗体にて阻害された。

以上の結果から膵癌周囲のリンパ管形成は、VEGF-Cを中心にして、膵癌、リンパ管、線維芽細胞などによる、癌-間質相互作用があって初めて形成されるものと考えられ、更な

る検討を行うことにより、新たな分子標的治療のターゲットとなりうると考えられた。

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 8 件)

- ① Matsuo Y, Sawai H, Ochi N, Yasuda A, Takahashi H, Funahashi H, Takeyama H, Guha S. Interleukin-1 α secreted by pancreatic cancer promotes angiogenesis and its therapeutic implications. J Surg Res, in press, 2009, peer reviewed.
- ② Ma J, Sawai H, Matsuo Y, Ochi N, Yasuda A, Takahashi H, Wakasugi T, Funahashi H, Sato M, Okada Y, Takeyama H, Manabe T. Interleukin-1 α enhances angiogenesis and is associated with liver metastatic potential in human gastric cancer cell lines. J Surg Res 148, 197-204, 2008, peer reviewed.
- ③ Sawai H, Okada Y, Funahashi H, Takahashi H, Matsuo Y, Yasuda A, Ochi N, Takeyama H, Manabe T. Basement membrane proteins play an important role in the invasive processes of human pancreatic cancer cells. J Surg Res 144, 117-123, 2008, peer reviewed.
- ④ Funahashi H, Satake M, Hasan S, Sawai H, Newman RA, Reber HA, Hines OJ, Eibl G. Opposing effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on pancreatic cancer growth. Pancreas 36, 353-362, 2008, peer reviewed.
- ⑤ Takeyama H, Funahashi H, Sawai H, Akamo Y, Yamamoto M, Takahashi H, Manabe T. Expression of α_6 integrin subunit is associated with malignancy in gastric gastrointestinal stromal tumors. Med Sci Monit 13, CR51-56, 2007, peer reviewed.
- ⑥ Takahashi H, Funahashi H, Sawai H, Matsuo Y, Yamamoto M, Okada Y, Takeyama H, Manabe T. Synthetic serine protease inhibitor, gabexate mesilate, prevents nuclear factor- κ B activation and increases TNF- α -mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells. Dig Dis Sci 52, 2646-2652, 2007, peer reviewed.
- ⑦ Takahashi H, Sawai H, Funahashi H, Matsuo Y, Yasuda A, Ochi N, Sato M, Okada Y, Takeyama H. Antiproteases in preventing the invasive potential of pancreatic cancer cells. JOP 8, 501-508, 2007, peer reviewed.

- ⑧ 沢井博純, 岡田祐二, 高橋広城, 松尾洋一, 竹山廣光, 真辺忠夫, 膵癌転移における接着分子の役割を探索, 分子消化器病 4, 30-34, 2007, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 舟橋 整, 沢井博純, 原 賢康, 安田 顕, 越智靖夫, 坂本雅樹, 高橋広城, 松尾洋一, 若杉健弘, 高山 悟, 竹山廣光, N-6 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の膵癌細胞増殖能、浸潤能への増強効果, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008/10/28, 名古屋
- ② 赤毛義実, 竹山廣光, 若杉健弘, 舟橋 整, 沢井博純, 佐藤幹則, 治癒切除胃癌における nomogram を用いた予後の検討, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008/10/28, 名古屋
- ③ 安田 顕, 沢井博純, 越智靖夫, 若杉健弘, 舟橋 整, 竹山廣光, 膵漿液性嚢胞腺腫 (solid type) の 1 例, 第 63 回日本消化器外科学会総会, 2008/7/16, 札幌
- ④ 沢井博純, 越智靖夫, 安田 顕, 高橋広城, 松尾洋一, 坂本雅樹, 若杉健弘, 舟橋 整, 佐藤幹則, 赤毛義実, 竹山廣光, 膵癌細胞の浸潤能に細胞外マトリックスが果たす役割, 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007/10/3, 横浜
- ⑤ 越智靖夫, 松尾洋一, 沢井博純, 安田 顕, 舟橋 整, 高橋広城, 佐藤幹則, 竹山廣光, 膵癌リンパ管新生における腫瘍由来 VEGF-C の影響, 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007/10/3, 横浜
- ⑥ 高橋広城, 安田 顕, 越智靖夫, 若杉健弘, 高山 悟, 沢井博純, 岡田祐二, 赤毛義実, 竹山廣光, 真辺忠夫, 膵癌における膜結合型ケモカインの発現についての検討, 第 62 回日本消化器外科学会定期学術総会, 2007/7/19, 東京
- ⑦ 沢井博純, 岡田祐二, 越智靖夫, 安田 顕, 松尾洋一, 舟橋 整, 竹山廣光, 真辺忠夫, 膵癌細胞の浸潤能に細胞外マトリックスがおよぼす影響, 第 38 回日本膵臓学会大会, 2007/6/29, 福岡
- ⑧ 越智靖夫, 松尾洋一, 沢井博純, 岡田祐二, 舟橋 整, 安田 顕, 高橋広城, 佐藤幹則, 真辺忠夫, 膵癌由来 VEGF-C によるリンパ管内皮細胞への影響, 第 38 回日本膵臓学会大会, 2007/6/29, 福岡
- ⑨ 沢井博純, 岡田祐二, 高橋広城, 松尾洋一, 安田 顕, 越智靖夫, 舟橋 整, 佐藤幹則, 竹山廣光, 真辺忠夫, 細胞外マトリックスが膵癌細胞の浸潤能に果たす役割, 第 19 回日本肝胆膵外科学会, 2007/6/8, 横浜

- ⑩ 越智靖夫、松尾洋一、岡田祐二、沢井博純、舟橋 整、高橋広城、佐藤幹則、真辺忠夫、腓舘リンパ節転移に対する腫瘍由来 VEGF-C の影響, 第 107 回日本外科学会定期学術集会, 2007/4/13, 大阪
- ⑪ 安田 顕、高橋広城、松尾洋一、沢井博純、岡田祐二、佐藤幹則、竹山廣光、真辺忠夫、大腸癌細胞の増殖における c-kit の関与について, 第 107 回日本外科学会定期学術集会, 2007/4/11, 大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 広城 (TAKAHASHI HIROKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30381792

(2) 研究分担者

沢井 博純 (SAWAI HIROZUMI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40336681

竹山 廣光 (TAKEYAMA HIROMITSU)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00216946

高山 悟 (TAKAYAMA SATORU)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70381887

(3) 連携研究者

岡田 祐二 (OKADA YUJI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：10305550

松尾 洋一 (MATSUO YOICHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40381800