

平成21年 5月 22日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19591603  
 研究課題名 (和文) ケラチノサイト増殖因子受容体系を用いた新たな膵臓癌治療戦略の検討  
 研究課題名 (英文) Novel strategy for pancreatic cancer treatment, using keratinocyte growth factor receptor  
 研究代表者  
 内藤 善哉 (NAITO ZENYA)  
 日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：20237184

## 研究成果の概要：

ケラチノサイト増殖因子受容体 (KGFR) は、上皮細胞の増殖、分化に重要な役割を果たしている。膵臓癌培養細胞に対し recombinant KGF を投与すると、VEGF-A と MMP-9 の発現増加が認められ、一方、KGF に対する short hairpin RNA (shRNA) を遺伝子導入すると、VEGF-A と MMP-9 の発現が減少した。膵臓癌では KGF/KGFR 系が VEGF-A、MMP-9 を介して癌の浸潤転移に関与している可能性が考えられた。

## 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	2080,000
2008年度	1,400,000	420,000	1820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3000,000	900,000	3900,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学・膵臓外科学

キーワード：ケラチノサイト増殖因子，膵臓癌，大腸癌，VEGF-A，静脈侵襲，MMP-9

## 1. 研究開始当初の背景

Keratinocyte growth factor receptor (KGFR/FGFR2 IIIb) は、上皮細胞のみに特異的に発現する線維芽細胞増殖因子受容体の1つであり、線維芽細胞などの間質細胞で産生される keratinocyte growth factor (KGF/FGF-7) などが結合することで、上皮細胞の増殖、分化に重要な役割を果たしているとされている (Int J Oncol J 28:307-14, 2006, Oncology Rep 13:247-252, 2005)。PANC-1, MIA PaCa-2 などの膵臓癌培養細胞において、KGFR が発現しており一部の膵臓癌培養細胞では、recombinant KGF (rKGF) の投与によって癌

細胞の増殖が亢進することが現在までに報告されている。一方、正常膵管細胞は KGF の産生能を有さないが、膵臓癌培養細胞の多くは KGF を産生しており、KGFR を介したオートクライン機序の形成が考えられていた (Am J Pathol 153:213-222, 1998)。このため、我々はヒト膵臓癌組織における KGFR と KGF の発現を検討し、KGFR と KGF を共に発現している膵臓癌症例においては脈管侵襲が強く予後も悪いことが明らかになった。さらに膵臓癌培養細胞では、rKGF の投与によって vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現が誘導され、これが脈管侵襲に関与している可

能性や膵臓癌細胞の KGFR を siRNA で抑制すると、癌細胞の増殖が著明に抑制されることを明らかにした。このことは KGFR が、膵臓癌細胞における新たな分子標的治療のターゲットとなる可能性を示している。このように膵臓癌における KGF/KGFR 系の作用は多彩であるが、その細胞内のシグナル伝達系における関与や作用に関し、未だ不明な点が多い。一方で、近年 rKGF (Palifermin) が白血病患者の骨髄移植時の化学療法によって発症する重篤な口内炎と口内潰瘍の治療薬として米国では FDA の認可を受け、臨床応用が開始された。白血病細胞は KGFR を発現していないが、扁平上皮の口内粘膜上皮は KGFR を有している。Palifermin によって粘膜上皮の再生が起こっても、白血病細胞には作用しないとされている。膵臓癌においても Palifermin の投与によって化学療法時の口内潰瘍や、消化管上皮傷害などの副作用を軽減できると考えられている。しかし、膵臓癌細胞の多くが KGFR を発現しているために Palifermin の投与により、治療後に残存する癌細胞の増殖、浸潤、転移を誘導するのではないかと危惧があり KGF/KGFR 系の役割については、早急な研究が必要な状況である。本研究は、KGF/KGFR 系の膵臓癌細胞における役割を解明することで、膵臓癌患者の癌の増殖、浸潤、転移の抑制や制御を目指した新たな遺伝子治療を含めた治療法の開発、また、各種癌治療に伴い発症する副作用の軽減に新たな道を開く可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

膵臓癌培養細胞において、KGFR 発現と KGF の産生を確認したうえで、これらの細胞における KGFR または KGF の産生を siRNA、または KGFR または KGF の siRNA 発現ベクターを用いて、それぞれの発現を恒常的に抑制した安定株 (stable transfectant) を作成し、対照の細胞群 (mock transfectant) と血管新生に関連する因子と細胞の増殖動態について検討する。これらの検索により、KGF/KGFR 系を介し発現調節されている下流の細胞増殖因子や受容体、細胞外基質などとの関連を明らかにする。大腸癌細胞においては、KGF/KGFR 系が細胞内シグナル伝達系の ERK-FAK 系の活性化により細胞外基質への接着亢進を惹起させ、さらにこの接着亢進が接着因子蛋白の発現増強を介していないことを明らかにしたが、膵臓癌における KGFR の詳細な細胞内シグナル伝達系路については未だ解明が進んでいない。この研究では rKGF 投与または KGF 安定過剰発現株を用い細胞内シグナル伝達系 MAPK 系の活性化ならびに増殖能、浸潤能など機能変化への関与を解明する。さらに KGF/KGFR 系の制御による新たな分子標的治療や遺伝子

治療の可能性と癌治療に伴う上皮障害などの副作用の治療法について検討する。

## 3. 研究の方法

### 1. 免疫組織化学染色法

日本医科大学病院外科において手術的に切除された進行膵臓癌組織 53 例を用いて抗 KGF 抗体、抗 KGFR 抗体、抗 VEGF-A 抗体、抗 MMP-9 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。癌細胞の 30% 以上が染色された癌症例を陽性とし、臨床病理学的因子と予後との関連を検討した。さらに KGF/KGFR/VEGF-A の共発現例、KGF/KGFR/VEGF-A の共発現例について、臨床病理学的因子、予後についてそれ以外の症例と比較検討した。

### 2. 膵臓癌培養細胞における KGF, KGFR, 血管新生因子、マトリックス分解酵素の発現

RT-PCR 法と Real-time RT-PCR 法を用いて膵臓癌培養細胞の PANC-1, MIA PaCa-2, KLM-1, Capan-1, PK-1, PK-8, PK-9, PK-59 における KGF, KGFR, VEGF-A, MMP-9 について、mRNA レベルで発現量を検討した。KGFR の発現については Western blot 法を行い、タンパクレベルでの発現を検討した。

### 3. Recombinant human KGF の投与による膵臓癌の増殖動態の検討

膵臓癌培養細胞系に rKGF を 1-100ng/ml 投与し癌細胞の増殖動態を 24 時間、48 時間、72 時間後に比較検討した。

### 4. Recombinant human KGF の投与による膵臓癌の血管新生因子産生能の検討

膵臓癌および大腸癌培養細胞に対し、rKGF を 1-100ng/ml 投与し、主な血管新生因子である VEGF-A, fibroblast growth factor (FGF)-2, hepatocyte growth factor (HGF) の発現の変化を検討した。癌細胞内のそれぞれの血管新生因子の mRNA レベルの変化を real-time PCR 法で、培養液中の変化を ELISA 法で測定した。

### 5. 膵臓癌培養細胞における KGF の産生抑制

pBAsihU6NeoDNA vector (Takara 社) に KGF siRNA を組み込んだヘアピン型 KGF siRNA 発現ベクター (KGF shRNA vector) を作成し、そのベクターを膵臓癌培養細胞の中で豊富な KGF タンパクを発現している KLM-1 細胞に、FuGENE HD (Roche 社) を用い化学的に遺伝子導入した。

### 6. 膵臓癌培養細胞における KGFR の産生抑制

pBAsihU6NeoDNA vector (Takara 社) に KGFR siRNA (NM022970) を組み込んだヘアピン型 KGFR siRNA 発現ベクターを作成し、そのベクターを膵臓癌培養細胞の中で豊富な KGFR タンパクを発現している MIA-PaCa2 細胞に、FuGENE HD (Roche 社) を用い化学的に遺伝子導入した。

#### 7. KGF または KGFR の発現抑制細胞における細胞動態の検討

上記の 5 と 6 で作成した膵臓癌細胞を用いて以下の実験を行なった。

ランダムな配列を組み込んだ negative control の pBAsihU6NeoDNA vector を遺伝子導入した膵臓癌細胞と比較し、KGF または KGFR の発現が抑制されている事を real-time PCR 法、Western blot 法で確認した。KGF または KGFR 発現抑制膵臓癌細胞における細胞増殖能、細胞遊走能、基底膜成分である matrigel の通過能（浸潤能）、細胞外基質との接着能の変化を検討した。

#### 8. KGF または KGFR の発現抑制細胞における血管新生因子の産生能の検討

上記 5 と 6 で作成した膵臓癌細胞において主な血管新生因子である VEGF-A, FGF-2, HGF の発現能の変化を negative control の細胞と比較、検討し KGF/KGFR 系と血管新生因子との関連を明らかにする。

#### 9. KGF または KGFR の発現抑制細胞におけるマトリックス分解酵素の産生能の検討

上記 5 と 6 で作成した膵臓癌細胞において血管基底膜の分解に強く関与しているとされている MMP-2 と MMP-9 の発現の変化を negative control の細胞と比較、検討し KGF/KGFR 系と血管侵襲との関連を明らかにする。

#### 4. 研究成果

ケラチノサイト増殖因子受容体 (KGFR/FGFR2 IIIb) は、上皮細胞に特異的に発現する線維芽細胞増殖因子受容体の 1 つで、間質細胞で産生された KGF/FGF-7 が結合することで上皮細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしている。

53 例の膵臓癌症例中 22 例 (41.5%) で膵臓癌細胞に KGFR が発現しており、18 例 (34%) で KGF が発現していた。膵臓癌症例における KGF または KGFR の発現は、静脈侵襲と有意に関連していた。さらに KGF と KGFR が共発現している膵臓癌症例は、有意に静脈侵襲、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) 発現が多く、予後不良であった。膵臓癌の 60% で MMP-9 の発現がみられ、MMP-9 発現および、KGF/KGFR/MMP-9 の共発現と静脈侵襲とに有意な関連がみられた。KGF/KGFR/MMP-9 の共発現症例は、他の症例と比較して有意に予後が悪いことが明らかとなった。

今回、検討した 8 種類の膵臓癌培養細胞の全てに KGFR が発現しており、KGF も MIA PaCa-2 細胞以外の細胞で発現していた。さらに MMP-9 も全ての膵臓癌細胞において発現がみられた。rKGF の投与により大部分の膵臓癌細胞においても in vitro での増殖促進作用はみられなかったが、一部の膵臓癌細胞にお

いて増殖促進効果がみられた。さらに膵臓癌培養細胞に対して rKGF を投与することにより VEGF-A と MMP-9 の発現増加が認められ、膵臓癌に KGF 遺伝子を導入した KGF 安定発現株では、VEGF-A の発現も増加していた。一方、KGF を産生している膵臓癌細胞に、KGF に対する short hairpin RNA (shRNA) を遺伝子導入し KGF 産生を抑制したところ、VEGF-A と MMP-9 の発現が減少した。これらより、膵臓癌では KGF/KGFR 系が VEGF-A を介して癌周囲の血管新生に関与し、癌の増殖と転移に関与している可能性が考えられた。また、rKGF の投与により膵臓癌細胞の遊走と浸潤能の亢進が認められた。これらより、KGF/KGFR 系は MMP-9 などにより細胞外基質を分解し膵臓癌の遊走と浸潤、転移に重要な役割を果たしていることが考えられた。同じ腺癌細胞である子宮内膜癌における検討では、rKGF による癌細胞増殖促進作用はみられなかったが、癌細胞の細胞外基質との接着性亢進が認められた。また、大腸癌培養細胞の HCT-15 においても rKGF 投与により VEGF-A の発現亢進がみられた。これらより、膵臓癌などの腺癌細胞では KGF/KGFR 系が一部の癌細胞の増殖を直接的に促進するのみでなく、VEGF-A、MMP-9 などを産生しこれらの作用を介して癌の浸潤転移にも関与している可能性が考えられた。このことから、今後膵臓癌をはじめとし大腸癌、子宮内膜癌などで KGF/KGFR 系が癌の血管侵襲、浸潤、転移などに対する新たな分子標的となる可能性が示唆された。

#### 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 2 件)

1. Narita K, Fujii T, Ishiwata T, Yamamoto T, Kawamoto Y, Kawahara K, Nakazawa N, Naito Z: Keratinocyte growth factor induces vascular endothelial growth factor-A expression in colorectal cancer cells. Int J Oncol. 34:355-60, 2009.
2. Ishikawa A, Kudo M, Nakazawa N, Onda M, Ishiwata T, Takeshita T, Naito Z: Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human endometrial cancer in cooperation with steroid hormones. Int J Oncol 32:

〔学会発表〕(計2件)

1. 藤井 雄文、大腸癌細胞における keratinocyte growth factor の血管増殖因子発現誘導、第97回日本病理学会総会、2008年5月15日、金沢もてなしドーム地下広場
2. Kazumitsu Cho, Keratinocyte growth factor and its receptor correlate with venous invasion via matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in pancreatic cancer, American Pancreatic Association Meeting 38th Annual Meeting 2007年11月1日、米国 イリノイ州 シカゴ

6. 研究組織

(1)研究代表者

内藤 善哉 (NAITO ZANYA)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20237184

(2)研究分担者

石渡 俊行 (ISHIWATA TOSHIYUKI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90203041

藤原 ゆり (FUJIWARA YURI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70434131

(3)連携研究者

なし