

令和 5 年 9 月 13 日現在

機関番号：23903  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2022  
課題番号：19K18098  
研究課題名（和文）臨床応用を目指したスクテラルリンのGirdin抑制による膵癌抗血管新生効果の検討

研究課題名（英文）Effects of Scutellarin on Antiangiogenesis of Pancreatic Cancer through Suppression of Girdin for Clinical Application

研究代表者  
前田 杏梨（Maeda, Anri）  
名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：70825471  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では膵癌におけるGirdinの機能解析を中心に行った。臨床膵癌検体を用いた検討では、膵癌におけるGirdinの高発現は膵癌予後（OSおよびRFS）が有意に不良であった。また、Girdinの発現とTNM分類のT因子とは有意な相関があることも確認した。膵癌細胞株を用いたin vitro実験では、多くの膵癌細胞株でGirdinの発現が高いことを確認した。Girdinのノックダウンにより、EGF刺激による遊走能亢進が有意に抑制され、また、VEGF-Aを介した血管新生能も抑制された。スクテラルリンはGirdinリン酸化を阻害し、EGF刺激による遊走能を抑制しうることを確認した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

Girdinは細胞運動に関与するタンパクとして本邦で発見されたが、一部の癌腫では腫瘍増殖能や遊走・浸潤能、血管新生能に関与することが報告されている。本研究では、予後の不良な膵癌におけるGirdinの機能解析を通して、Girdinが新たな予後マーカーになりうる可能性が示唆された。また、Girdinが膵癌遊走能および血管新生に関与することが考えられ、Girdinの抑制が新たな治療薬となりうることが検証された。そのうち、フラボノイドのスクテラルリンは、Girdin阻害を通じて腫瘍遊走能を抑制しうる可能性が示唆された。これらの結果が今後の臨床応用につながり、膵癌予後の改善に寄与することが期待された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the functional analysis of Girdin in pancreatic cancer. (1) In clinical pancreatic cancer specimens, high Girdin expression in pancreatic cancer patients was associated with significantly poorer prognosis (OS and RFS). We also found a significant correlation between Girdin expression and T factors of TNM classification. (2) In vitro experiments using pancreatic cancer cell lines showed that Girdin expression was high in many pancreatic cancer cell lines, and knockdown of Girdin significantly suppressed EGF-stimulated migration and VEGF-A-mediated angiogenesis. We confirmed that scutellarin inhibits Girdin phosphorylation and suppresses EGF-stimulated migration.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 Girdin スクテラルリン 遊走能 血管新生能 VEGF-A pGirdin (Tyr-1746)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は悪性度の極めて高い癌であり、膵癌全体の5年生存率は10%を下回る。その原因として、膵癌は隣接する組織や神経などに容易に浸潤しやすく、また、早期に遠隔転移をきたすことが挙げられる。これまでに我々の教室では、膵癌の転移能が血管新生と相関していることを報告してきた<sup>1)</sup>。膵癌における浸潤および血管新生の分子生物学的機序の解明と、それをターゲットとした新たな治療薬の開発は膵癌の治療成績を大きく改善すると考えられる。

一方、Girdinは、がん原遺伝子であるAktの基質として2005年に本邦で発見されたタンパクで、細胞骨格の再構成を経て細胞運動に関与している<sup>2)</sup>。近年では、癌腫増殖能や遊走・浸潤能、血管新生能への関与が報告されている。我々の教室でもこれまでに、食道癌におけるGirdinの機能解析を行ってきた<sup>3)</sup>。食道癌よりも予後が悪く、特に隣接臓器への浸潤が著しい膵癌においてGirdinの機能解析に関して研究を進めている。

最近、フラボノイドの一種であるスクテラリンが、肝細胞癌におけるSTAT3/Girdinシグナル伝達を阻害し、腫瘍浸潤・転移を抑制することが報告された<sup>4)</sup>。スクテラリンは、抗腫瘍効果や肝擁護・神経保護作用などでも知られ、古来中国では脳血管治療などにも用いられてきた天然化合物である。膵癌の浸潤および血管新生におけるスクテラリンの効果に着目した報告はこれまでにない。

Reference

- |   |  |
|---|--|
| 1) Matsuo Y, et al. Dig Dis Sci. 2010.    | 2013.  |
| 2) Enomoto A, et al. Dev. Cell. 2005.     | 4) Yang Ke, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2017. |
| 3) Shibata T, Matsuo Y, et al. Oncol Rep. |  |

2. 研究の目的

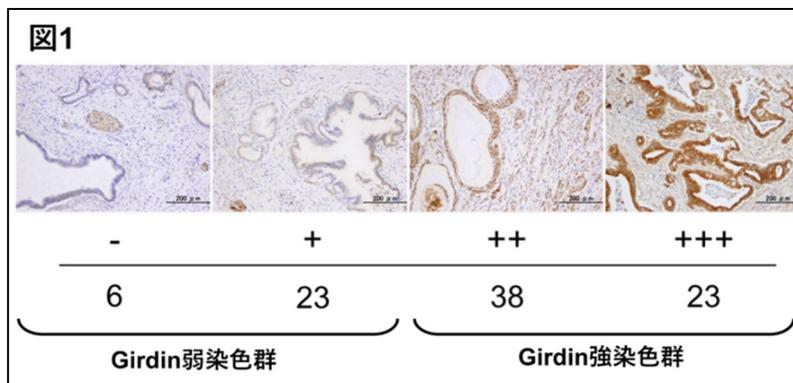
本研究では、膵癌におけるGirdinの役割を腫瘍浸潤および血管新生の両側面から検討し、スクテラリンが実際に膵癌におけるGirdinの機能を阻害し、腫瘍浸潤および血管新生が抑制されることを解明することを目的とした。これにより、Girdinが膵癌の新たな治療ターゲットとなり、また、スクテラリンが治療的役割を果たすことを示し、臨床応用につながることを期待される。

3. 研究の方法

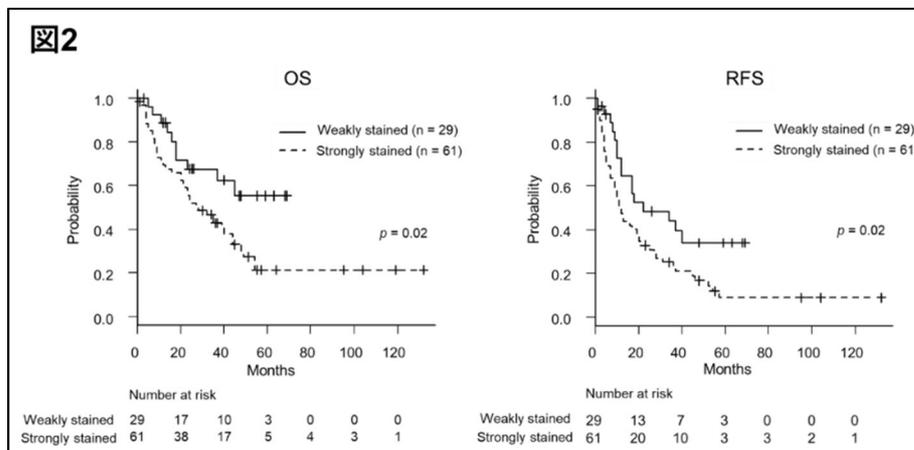
- (1) Girdinの臨床意義について、膵癌切除検体を用いてGirdin抗体にて免疫染色を行い、予後や臨床組織学的背景との関連について検討した。
- (2) 膵癌細胞株を用いて*in vitro*実験を行った。
  - 膵癌細胞株におけるGirdinの発現をqRT-PCRおよびWestern blottingで検証した。
  - Girdinをノックダウンし、膵癌細胞株の遊走能および血管新生能について検証した。
  - 膵癌細胞株に対するスクテラリンの効果について検証した。
    - i. スクテラリンの膵癌細胞株に対する毒性を検証し、実験濃度を決定した。
    - ii. スクテラリン添加による膵癌遊走能および血管新生能を検証した。

4. 研究成果

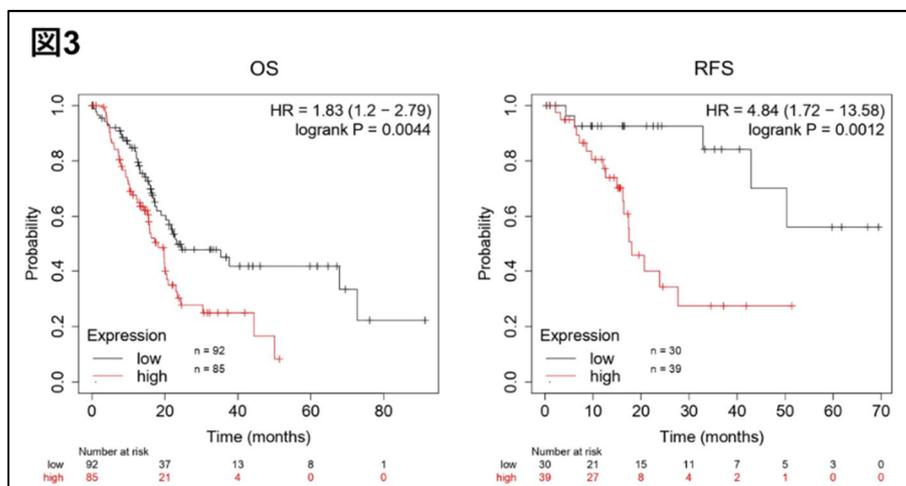
- (1) 2006年から2016年までに名古屋市立大学病院で手術を行った90例の膵癌切除検体に対してGirdinの免疫染色を行った。ランゲルハンス島の染色強度を基準として、4段階に分類した(-, 6; +, 23; ++, 38; +++, 23)。そのうち、「-」、「+」をGirdin弱染色群、「++」、「+++」をGirdin強染色群としてわけた(図1)。



Girdin の発現と膵癌予後について、Girdin 強発現群と弱発現群における全生存率 (OS), および無再発生存率 (RFS) について、Kaplan-Meier 曲線を描画し、Logrank 検定を行った。OS および RFS ともに、Girdin 染色群では有意に予後が不良であった (図 2)。



Web 上のデータベース (KM plotter; <https://kmplot.com/analysis/>, 2020/9/8 アクセス) を用いて、mRNA レベルでの Girdin の発現と予後を検討した結果、免疫染色の結果と同様に、OS および RFS ともに Girdin 強発現群で予後不良であった (図 3)。



臨床組織学的背景の検討では、Girdin 強染色群において、T 因子 (T1-3 vs. T4) および病期 ( - vs. ) が有意に高いことを確認した。一方、リンパ管や静脈侵襲に有意差を認めなかったが、神経浸潤においては、有意差はないものの、Girdin の高染色群で多い傾向があると考えられた (表 1)。

- (2) 膵癌細胞株を用いた *in vitro* 実験を行った。膵癌細胞株における Girdin の発現を検証した結果、正常膵管上皮細胞株 H6c7 と比べ、ほとんどの膵癌細胞株においてその発現は亢進していた (図 4)。

Girdin の高発現株 (MIA PaCa-2, AsPC-1, PANC-1) に対して、Girdin siRNA を形質導入し Girdin をノックダウンした (siGirdin 膵癌細胞株) (図 5)。

Boyden double chamber 法による Transwell assay の結果、0.1 ng/mL の EGF 刺激下では遊走能の亢進を認めたが、一方で、siGirdin 膵癌細胞株では、EGF 刺激下においても有意に遊走能は抑制された (図 6)。

EGF 刺激による膵癌細胞株の形態変化およびリン酸化 Girdin (Y-1764) の発現

表 1

Characteristics	Expression of Girdin		p-value
	Weakly stained (n = 28)	Strongly stained (n = 60)	
Gender			
Male	21	40	0.47
Female	7	20	
Mean age [IQR]	69 [63 - 74]	67 [60 - 75]	0.48
TNM factors			
T1/2/3/4	4/3/17/4	4/3/29/24	0.02 *
T1-3	24	36	
T4	4	24	
N0/1/2/3	14/11/2/1	22/25/10/3	0.23
N-	14	22	
N+	14	38	
M0/1	28/0	56/4	0.3
TNM Stage			
I/2/3/4	4/2/15/7	4/2/21/33	0.01 *
1-3	21	27	
4	7	33	
Venous invasion			
v0/1/2/3	6/13/7/2	12/22/15/11	1
v-	6	12	
v+	22	48	
Lymphatic invasion			
ly0/1/2/3	3/19/3/3	6/22/10/11	1
ly-	3	6	
ly+	25	54	
Neural invasion			
ne0/1/2/3	3/13/9/3	15/16/11/18	0.16
ne-	3	15	
ne+	25	45	

変化を蛍光免疫染色で検証した。EGF 刺激により Lamellipodia の形成が促進され、同部位にリン酸化 Girdin の発現を認めた (図 7)。

フラボノイドの一種であるスクテラリンを用いて実験を行った。膵癌細胞株の増殖能に対するスクテラリンの影響を WST-1 assay で検証した。いかなる濃度のスクテラリン濃度においても膵癌細胞株の増殖能に変化を認めなかった。以降の実験濃度を 100 $\mu$ M と設定した (図 8)。

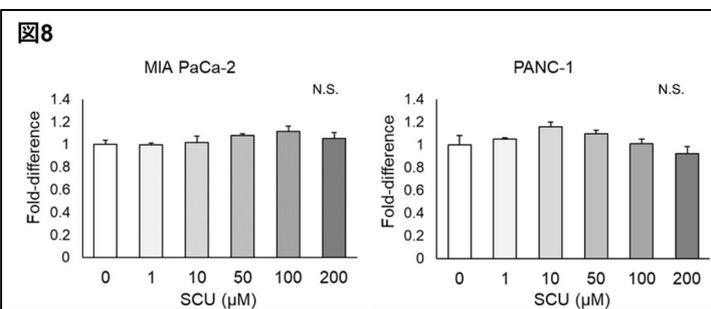
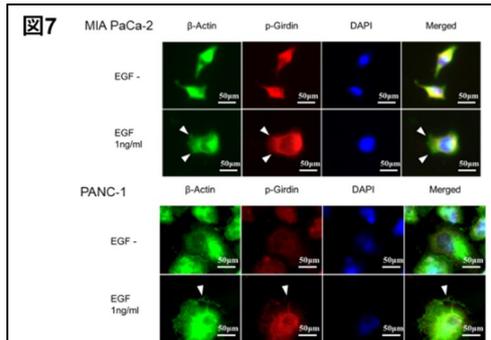
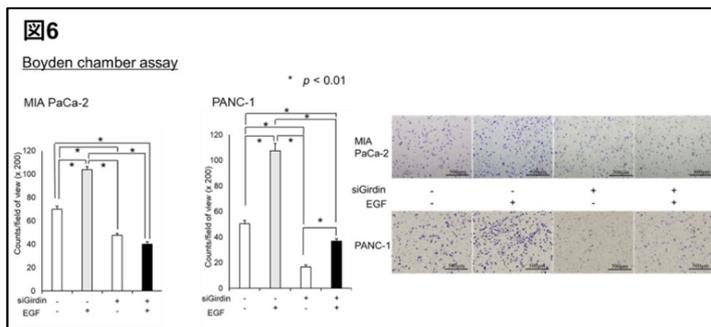
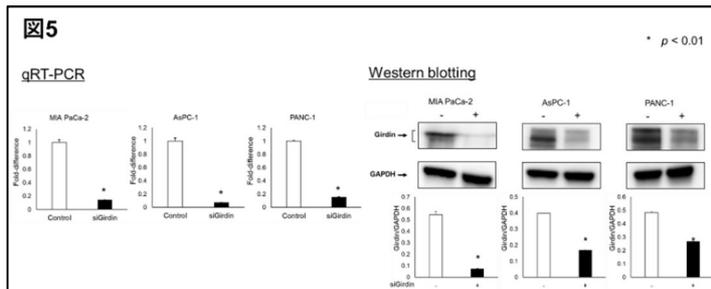
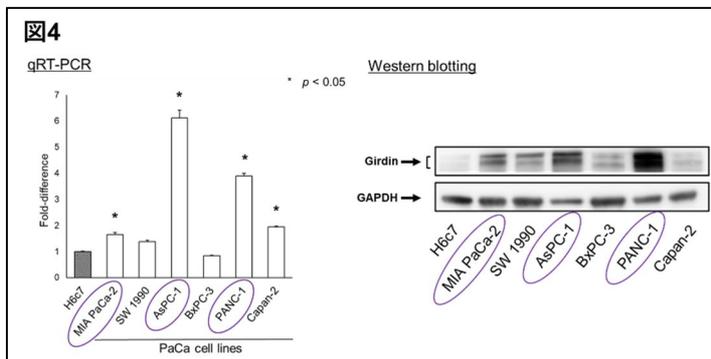
スクテラリン処理によるリン酸化 Girdin (Y-1764) の発現変化を蛍光免疫染色で検証した。リン酸化 Girdin の発現が抑制されると同時に Lamellipodia の形成が抑制された。全細胞数に対する Lamellipodia を形成した細胞数の割合は、EGF 刺激下で増加し、スクテラリン処理で有意に抑制された (図 9)。また、Western blotting にて定量的に評価したところ、MIA PaCa-2 においては、EGF 刺激により亢進したリン酸化 Girdin の発現はスクテラリン処理下では抑制された (図 10)。

スクテラリン処理による膵癌遊走能の変化を Wound healing assay で検証した。スクテラリンは EGF 刺激下において遊走能を低下した (図 11)。

膵癌細胞株における血管新生因子 VEGF-A の発現および分泌を検証した。siGirdin 膵癌細胞株においてはその発現および分泌が抑制された (図 12)。

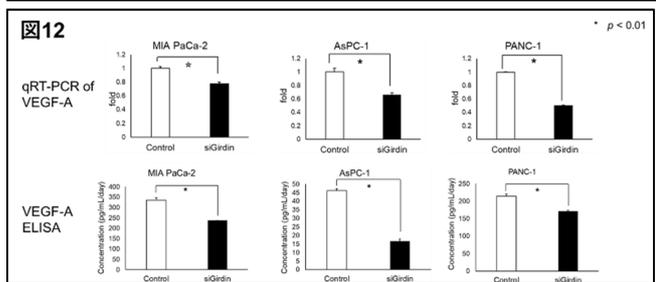
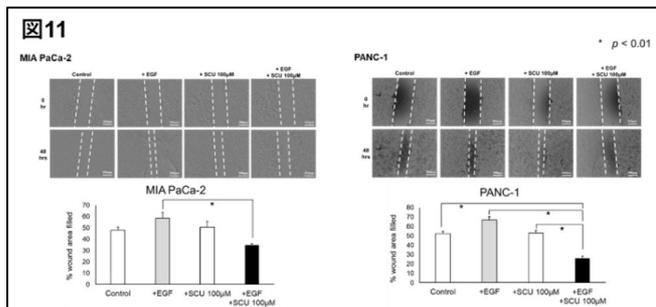
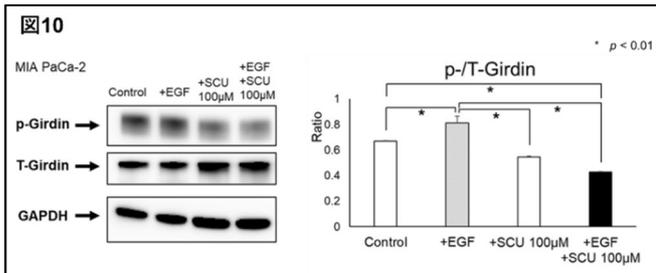
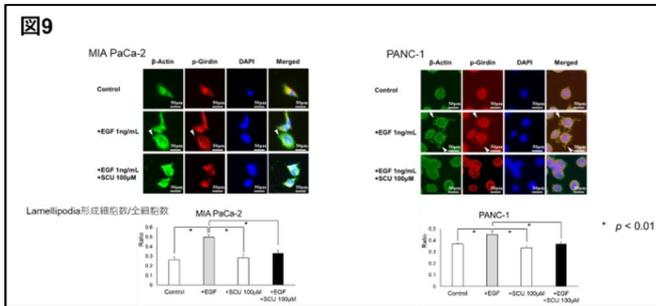
血管新生能の評価を On Matrigel tube formation assay で検証した。Control 群と比べ、膵癌細胞株の上清を用いた場合、不活化ヒト内皮細胞の管腔形成能は亢進した。一方、siGirdin 膵癌細胞株の上清では管腔形成能は有意に抑制された (図 13)。

スクテラリン処理による VEGF-A の発現および分泌は、EGF の投与の有無に関わらず変化がみられなかった (図 14)。



今回の研究で、以下のことがわかった。

Girdin の発現と全生存期間 (OS) および無再発生存期間 (RFS) には有意な相関がみられた。また、Girdin の発現は局所浸潤 (T 因子) と特に相関しており、それを反映して進行度 (Stage) とも相関することが示された。一方、リンパ節転移や遠隔転移、また、微小環境における脈管侵襲では有意な差を認めなかった。今回、神経浸潤において有意差はないものの、Girdin の高発現群で多い傾向がみられた。以上より、Girdin は膵癌の悪性度と関連し、予後のバイオマーカーとなりうることを示唆された。

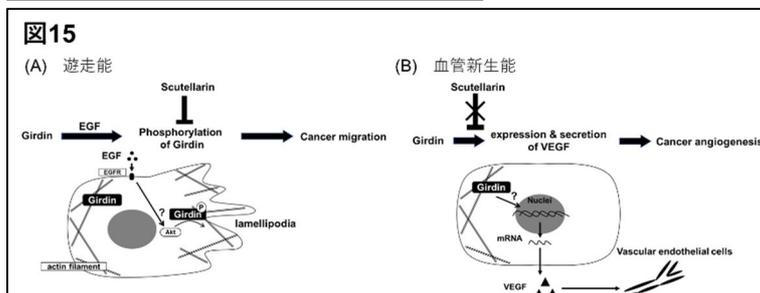
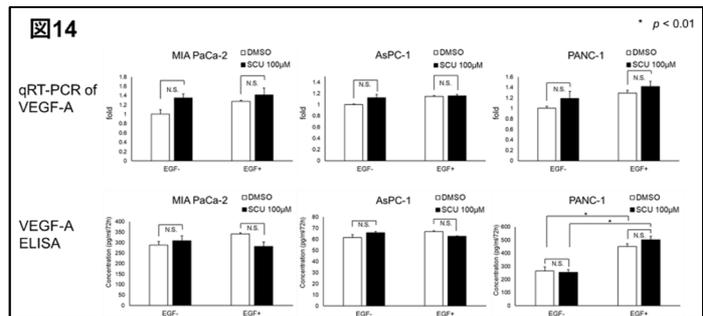
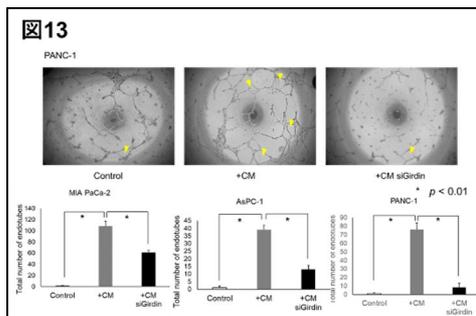


膵癌では、EGF シグナルを介した細胞遊走に Girdin が関与していることが示唆された。

スクテラリンは膵癌細胞株の増殖能には影響を及ぼさないことが示唆された。Girdin のノックダウンと同様に、EGF によって亢進された膵癌の遊走能はスクテラリン処理により有意に抑制された。EGF による Lamellipodia 形成の亢進は Girdin の Tyr-1764 のリン酸化を介して調節されることが示唆された。また、スクテラリンは Girdin の Tyr-1764 のリン酸化経路と競合的に相互作用していると考えられた。

膵癌微小環境において、Girdin は膵癌細胞からの VEGF-A の発現および分泌を制御し血管新生に関与することが示唆された。一方で、遊走能の検証では EGF シグナル系を介した Girdin のリン酸化(Tyr-1764)によって制御されているのに対し、血管新生能の検証では、EGF 刺激の有無、または Girdin を阻害するスクテラリンの有無に関わらず変化がみられなかった。

膵癌細胞において EGF シグナルを介した遊走能には Girdin が関与しており、スクテラリンがそれを阻害することによって癌の遊走を抑制する可能性が示唆された。また、膵癌細胞において、Girdin は EGF シグナルを介する遊走能の制御とは異なる経路で、膵癌の血管新生能を制御していると考えられた(図 15)。膵癌遊走能の制御において、スクテラリンは Girdin を標的とする新規薬剤として予後の改善につながる可能性が考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Yuichi, Matsuo Yoichi, Denda Yuki, Nonoyama Keisuke, Murase Hiromichi, Ueda Goro, Aoyama Yoshinaga, Kato Tomokatsu, Omi Kan, Imafuji Hiroyuki, Saito Kenta, Morimoto Mamoru, Ogawa Ryo, Takahashi Hiroki, Mitsui Akira, Kimura Masahiro, Takiguchi Shuji	4. 巻 50
2. 論文標題 Girdin regulates both migration and angiogenesis in pancreatic cancer cell lines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2023.8606	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第42回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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, 森本守, 小川了, 高橋広城, 瀧口修司
2. 発表標題 膵癌の遊走および血管新生におけるGirdinの役割の検討
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林祐一，松尾洋一，大場杏梨，上田悟郎，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
2. 発表標題 膵癌におけるScutellarinのGirdin抑制を介した抗腫瘍遊走効果の検討
3. 学会等名 第41回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林祐一，松尾洋一，前田杏梨，上田悟郎，加藤知克，青山佳永，大見関，今藤裕之，齊藤健太，佐藤崇文，坪井謙，森本守，小川了，高橋広城，瀧口修司
2. 発表標題 Role of Girdin and its therapeutic application on migration, invasion, and angiogenesis in pancreatic cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林祐一，松尾洋一，前田杏梨，上田悟郎，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
2. 発表標題 膵癌血管新生におけるアクチン結合タンパクGirdinの検討
3. 学会等名 第29回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林祐一，松尾洋一，大場杏梨，上田悟郎，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
2. 発表標題 膵癌におけるScutellarinのGirdin抑制を介した抗腫瘍遊走能に関する検討
3. 学会等名 第53回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林祐一, 松尾洋一, 前田杏梨, 上田悟郎, 大見関, 今藤裕之, 齊藤健太, 佐藤崇文, 坪井謙, 森本守, 小川了, 高橋広城, 瀧口修司
2. 発表標題 スクテラリンは膵癌においてGirdinの抑制により腫瘍移動を阻害する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林祐一, 松尾洋一, 大場杏梨, 上田悟郎, 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
2. 発表標題 膵癌におけるアクチン結合タンパクGirdinの機能解析
3. 学会等名 第40回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林祐一, 松尾洋一, 前田杏梨, 上田悟郎, 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
2. 発表標題 膵癌進展におけるアクチン結合蛋白Girdinの役割の検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 林祐一, 松尾洋一, 前田杏梨, 上田悟郎, 大見関, 今藤裕之, 齊藤健太, 佐藤崇文, 坪井謙, 森本守, 瀧口修司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 飯田橋パピルス	5. 総ページ数 243
3. 書名 分子細胞治療フロンティア2020 (CHAPTER3 癌分診断と臨床的意義)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------