

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591782

研究課題名（和文）

膵癌治療戦略におけるヘパリンと NF- κ B 阻害剤の役割と抗癌剤増強作用に関する検討

研究課題名（英文）

Evaluation of the synergistic anti-proliferation effects of heparin or NF- κ B inhibitor and gemcitabine on pancreatic cancer

研究代表者

相浦 浩一 (AIURA KOICHI)

慶應義塾大学・医学部・講師（非常勤）

研究者番号：00184010

研究成果の概要（和文）：

膵癌は他の癌腫に比較し周囲の間質増生が著しいという特徴があり、膵癌の悪性度を考える上で豊富に存在する間質との相互作用を無視することはできない。我々は、膵癌化学療法における heparin と NF- κ B 阻害剤の役割と抗腫瘍作用を検討し、heparin は増殖抑制だけではなく、浸潤能を抑制している可能性が示唆され、NF- κ B 阻害剤は腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し、血管新生を抑制することで抗腫瘍効果を示した。GEM との相乗効果も期待され新しい治療薬に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Pancreatic cancer is characterized by abundant quantity of the connective tissue framework and the interaction between cancer cells and connective tissue could be very important for the growth and invasiveness of cancer cells, leading partly to the poor outcome of the patients with pancreatic cancer. We evaluated the effects of heparin or NF- κ B inhibitor, DHMEQ, on pancreatic cancer. Heparin showed not only anti-proliferation effects but also inhibition of liver metastasis on in vivo model. Gemcitabine showed angiogenesis inhibition, apoptosis induction and invasiveness inhibition rather than cell growth inhibition. The anti-tumor effects of combination therapy were promising.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

キーワード：癌、膵臓、ヘパリン、NF- κ B 阻害剤、肝転移

1. 研究開始当初の背景

膵癌は他の癌腫に比較し周囲の間質増生が著しいという特徴があり、膵癌の悪性度を考える上で豊富に存在する間質との相互作用を無視することはできない。さらにその特徴に加え、ほとんどの膵癌は進行癌で発見され外科的に切除しえても高率に肝転移再発を生じるという特徴がある。そこで膵癌治療成績の向上には、第1に膵癌細胞と大量に存在する間質との相互作用に着目し、相互作用による浸潤能増強を抑制するという対策、第2に肝転移形成に関わる基底膜の破壊、thrombin, fibrinなどの凝固因子、血小板などとの相互作用、接着因子などの諸因子を有効に抑制するという2つの治療戦略が必須と考えられる。今、heparinについては様々な抗腫瘍作用が報告されてきており、その抗腫瘍効果の作用点は上記のいずれにも存在しうる。しかし、いまだその臨床応用については明確な回答はでていない。また、NF- κ B に関しても癌細胞では恒常的に刺激され、浸潤・転移・apoptosis 抵抗性に関わる関連遺伝子の転写・活性化が亢進されていることが明らかにされており、その阻害により効果的な癌治療が期待される。

2. 研究の目的

上記2つの治療戦略を考慮し、膵癌化学療法における heparin と NF- κ B 阻害剤の役割と抗腫瘍作用の可能性について明らかにし、化学療法と併用することで効果的に膵癌浸潤能を抑制し、転移形成を減少させるか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) in vitro assay

①WST Assay

1X10⁷個の細胞を 96well プレートに播種し、CO₂インキュベーターで前培養する。目的の薬剤に曝露し、培地で1:10の割合で希釈した Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) を培養上清を除いた細胞に添加、1時間後 450nm の吸光度を解析することにより、細胞増殖能を測定した。

②Chemo invasion Assay

BD社の cell culture insert を用いた。上段に細胞、下段に chemo attractant、目的の薬剤はそれぞれの濃度を上下段に入れ、24時間後の遊走細胞数を測定した。

(2) in vivo assay

マウス肝転移モデルは膵原発肝転移と経門脈的肝転移の2種類のモデルを作製した。膵原発肝転移モデルはヒト膵臓癌株 AsPC-1 をヌードマウス膵尾部漿膜下に 5 x 10⁵ in 50 μ l 注入し作製した。経門脈的肝転移モデルは小開腹下に 5x10⁵ の AsPC-1 をヌードマウスの門脈内へ注入し作製した。UFH は 0.5~50 U/day の投与量を腫瘍注入翌日より浸透圧ポンプ (ALZET osmotic pump) を用いて持続皮下投与とした。効果判定は、腫瘍径及び肝転移個数、及び全肝を摘出し、10ml のバッファー内でホモジナイズ、Renilla Luciferase Assay Kit (Promega) にてルシフェラーゼの活性を測定することにより行った。また、有害事象として肝重量、体重、血液生化学検査を施行した。

4. 研究成果

膵癌における Heparin (UFH) の抗腫瘍効果を検討する為、先ずヒト膵癌由来細胞株 (AsPC1, BxPC3, MIA PaCa3)、ヒト肝臓癌由来細胞株 (HepG2) において定量的 RT-PCR を用いた Heparanase の発現量の比較を行った。AsPC1 を基準に発現量の比をとると、AsPC1, BxPC3 において Heparanase の発現量が高かった (図1)。

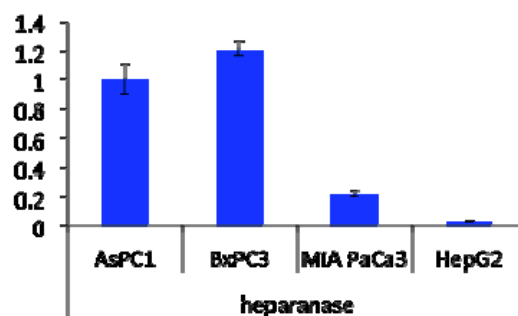


図1

WST assay では、UFH 320 U/ml 投与下での 48 時間後の各細胞株の細胞増殖抑制効果の検討をすると、AsPC1, BxPC3 では高く、MIA PaCa2, HepG2 では低かった。UFH には弱いながらもそれ自身に細胞増殖抑制効果があり、しかも Heparanase の高発現している細胞株において UFH の効果がより高い可能性が考えられた。さらに、Chemoinvasion Assay では、低濃度でチャンバーを通過した腫瘍細胞が減少し (図2)、

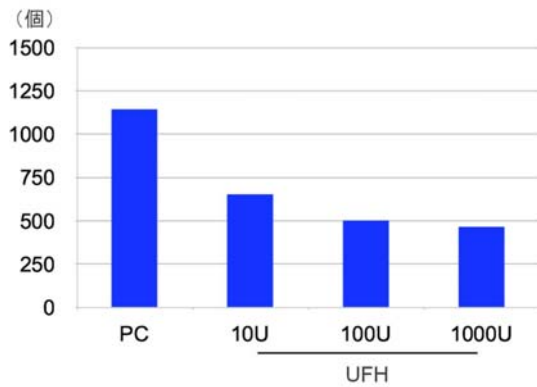


図 2

増殖抑制だけでなく、浸潤能を抑制している可能性が考えられた。Luciferase 安定発現腫瘍細胞を用いた肝転移モデルでは、ルシフェリンを腹腔内投与したのちにイメージング (IVIS) を行うことで肝転移の定性・定量を行うことが可能となる。膵癌肝転移モデルに対する UFH の抗腫瘍効果を検討すると、IVIS によるイメージングではルシフェラーゼ肝転移巣の発光量は、UFH 5U/day で低下し効果を認めた (図 3)。

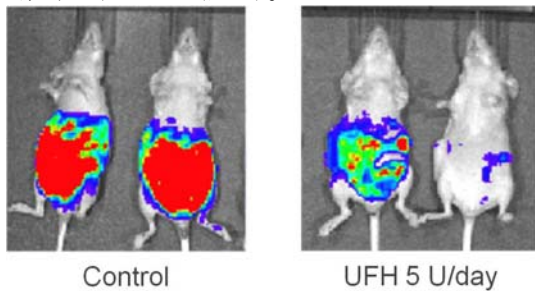


図 3

全肝を用いたルシフェラーゼ定量においても未治療 (NC) 群と比較して UFH 5U/day のモデルで腫瘍量が低値であった (図 4)。

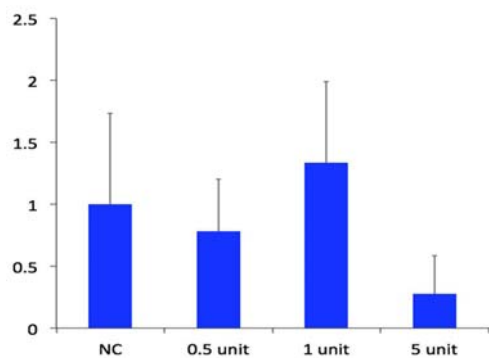


図 4

また、UFH と Gemcitabine (Gem) 抗腫瘍効果増強作用について In vitro で検討したところ、WST assay においては、UFH による Gem の増強作用は認められなかった。しかし In vivo では、肝転移数は C 群 23.9 個、H 群 14.7

個、G 群 15.2 個、GH 群 10.1 個。肝重量は C 群 2.08g、H 群 1.92g、G 群 1.85g、GH 群 1.80g であり UFH による抗腫瘍効果と Gem との増強効果の傾向を認めた。また、肝転移巣の Heparanase 活性は C 群 3.18 U/ml、H 群 2.67 U/ml、G 群 1.74 U/ml、GH 群 1.56 U/ml であり、VEGF 発現量は C 群を 100% としたものに対し、H 群 78%、G 群 65%、GH 群 70% と UFH による Heparanase 抑制効果と、VEGF 抑制効果の傾向が認められた。

NF- κ B 阻害剤である DHMEQ は疎水性である為、生体適合性のある PMB ポリマーを用いて可溶化した。粒径測定を行ったところ、約 7 μ m と粒径はほぼ一定であった (図 5)。

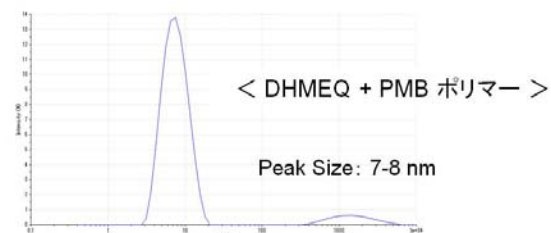


図 5

一方、CMC で懸濁した DHMEQ の粒径にはばらつきがあり、多峰性のピークを示した (図 6)。

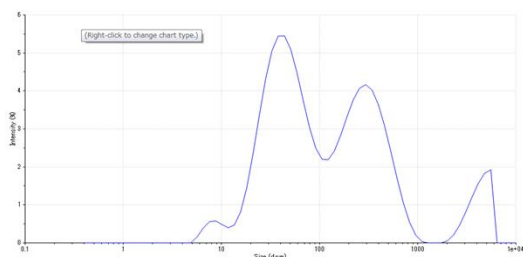


図 6

この 2 種類の製剤を用いてヒト膵癌株 AsPC1 に対して WST assay を行った結果は、DHMEQ 1, 5, 10, 20 μ g/ml それぞれの濃度において、ポリマーを用いて可溶化した群が 0.5% CMC を用いて DHMEQ を懸濁した群よりも高い細胞増殖抑制効果を示した (図 7)。

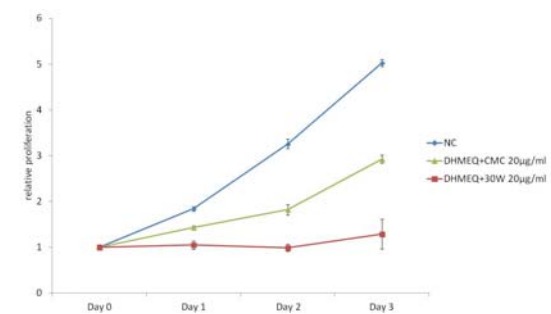


図 7

PMB ポリマー単独では使用した範囲の濃度では細胞毒性はほとんど見られなかった。1回投与量を12mg/kgとした *in vivo* 投与試験の予備実験では、ポリマーを用いて可溶化した DHMEQ を2日おきに *i.v.*した群が、0.5%CMCを用いて懸濁した DHMEQ を連日 *i.p.*した群より高い腫瘍増殖抑制効果を示した(図8)。

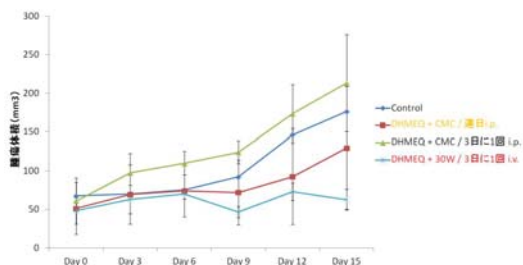


図8

DHMEQの血液中での安定性、組織内濃度及び血中滞留性をLS-MS装置を用いて分析した。Ex vivoにおいて採取した血液にDHMEQを混和した際の安定性にはポリマー、CMCの2群間で変化が見られなかったものの、*in vivo*で2mg/kgのDHMEQを担癌マウスに*i.v.*した際には、肺・肝臓などの臓器に0.5%CMCを用いて懸濁した群、癌部にはPMBポリマーで可溶化した群でより多くDHMEQが集積している傾向が見られた。さらに、アクティブエステル基を有し、蛋白・リガンドなどを付加することが可能なPMBNポリマーにDHMEQを加え、超音波処理を施した後、抗EGFR抗体を加えることでターゲティング可能な会合体を作製した。膵癌のcell lineの中でEGFRを発現しているAsPC-1、BxPC-3、MIAPaCa-2を使用した。結果は、抗EGFR抗体を結合させることで、DHMEQ単独の腹腔内投与より高い抗腫瘍効果を認めることが示された。また、DHMEQとGEMにおいても(1)無治療群(2)GEM投与群(3)DHMEQ投与群(4)DHMEQ+GEM投与群の4群にマウスを分けた*in vivo*の検討において、肝転移巣数はGEM群とDHMEQ群で有意に肝転移が減少していた。アポトーシス小体数測定では、GEM群及びDHMEQ群ではアポトーシス誘導が認められた。またDHMEQ+GEM併用群では相乗効果が認められた。抗CD31抗体免疫染色での腫瘍内新生血管数測定では、DHMEQ群、GEM群、DHMEQ+GEM群の順に血管新生抑制効果を認めた。qRT-PCRを用いて肝転移巣における各種mRNA発現を測定した。DHMEQ治療群ではIL-8とMMP-9の発現が著明に低下し、一方GEM治療群ではVEGFとCyclinD1の中等度の低下が見られた。

膵原発肝転移という臨床像に近いモデル

でUFHは増殖抑制だけではなく、浸潤能を抑制している可能性が示唆され、経門脈的肝転移モデルを用いたDHMEQの検討では腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し、血管新生を抑制することで抗腫瘍効果を示した。GEMとの相乗効果も期待され新しい治療薬に繋が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0件)

[学会発表] (計7件)

①発表者: Hiroto Fujisaki

発表タイトル: Active enhancement of anti-tumor effect by NF- κ B inhibitor DHMEQ using PMBN conjugated with anti-EGFR antibody in human pancreatic adenocarcinoma cells *in vivo* and *in vitro*.

学会名: ISW

発表年月日: 2011/8/30

発表場所: 横浜

②発表者: 藤崎洋人

発表タイトル: DHMEQ封入抗EGFR抗体結合PMBNポリマーを用いたマウス膵癌肝転移モデルに対する抗腫瘍効果の検討

学会名: 癌転移学会

発表年月日: 2011/6/30

発表場所: 浜松

③発表者: Hiroto Fujisaki

発表タイトル: Active enhancement of anti-tumor effect by NF- κ B inhibitor DHMEQ using PMBN conjugated with anti-EGFR antibody in human pancreatic adenocarcinoma cells *in vivo* and *in vitro*

学会名: American Association for Cancer Research 102nd annual meeting 2011

発表年月日: 2011/4/5

発表場所: Orland

④発表者: Noriyuki Tani

発表タイトル: Anticancer Effects of Unfractionated Heparin in the Experimental Metastasis of the Pancreatic Cancer Model

学会名: The 4th Scientific Meeting of the Japan-Hungary Surgical Society

発表年月日: 2010/11/19

発表場所: Pccifico Yokohama

⑤発表者：Noriyuki Tani
発表標題：Anticancer Effects of Heparin
in the Experimental Metastasis of the
Pancreatic Cancer Model with Enhanced
Potency of Gemcitabine
学会名：American Association for Cancer
Research 101st annual meeting 2010
発表年月日：2010/4/20
発表場所：Walter E. Washington
Convention Center

⑥発表者：谷 紀幸
発表標題：ヒト膵癌株マウス肝転移モデル
におけるヘパリン単独の抗腫瘍効果とジ
ェムシタビンとの相乗効果
学会名：第110回日本外科学会定期学術集
会
発表年月日：2010年4月10日
発表場所：名古屋

⑦発表者：鈴木慶一
発表標題：NF- κ B の膵癌肝転移形式にお
ける役割およびNF- κ B阻害剤の臨床応用
可能性の評価
学会名：第47回日本癌治療学会学術集会
発表年月日：2009年10月22日
発表場所：横浜

[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]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相浦 浩一 (AIURA KOICHI)

慶應義塾大学・医学部・講師 (非常勤)

研究者番号：00184010

(2) 研究分担者

谷 紀幸 (TANI NORIYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50445384

鈴木 慶一 (SUZUKI KEIICHI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：30296602