

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 6月10日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791310

研究課題名（和文） 膵癌に対する neuropilin-1 を標的とした新たな治療法の開発

研究課題名（英文） Neuropilin-1 is an important therapeutic target in pancreatic cancer

研究代表者

松下 晃 (MATSUSHITA AKIRA)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70449263

研究成果の概要（和文）：膵癌では多くの増殖因子レセプターやそのリガンドの発現が認められ、その悪性度との関連が報告されている。Neuropilin-1 (Np-1)は増殖因子である VEGF-A と軸索の伸長阻害因子である semaphorin3A の co-receptor として働く膜蛋白である。Np-1 は膵癌において過剰発現が報告されているが、その生物学的役割は明らかでない。Np-1 高発現株 PANC-1 を用い Np-1 発現を antisense 法にて低下させたところ、Np-1 antisense clone(Np-1AS)ではその増殖、接着、浸潤が低下し、アポトーシスが有意に誘導された。さらに抗 integrin β 1 抗体の投与により PANC-1 の接着は Np-1AS に類似して減少した。IP および WB にて Np-1 は integrin β 1 と蛋白複合体を形成していた。また PANC-1 では HGF により浸潤が誘導され、Np-1AS ではその浸潤が減少した。COLO-357 を用いて Np-1 高発現株を作成したところ、HGF による浸潤は有意に増加し、その浸潤は HGF 受容体 c-Met に対する siRNA の投与により抑制された。IP と WB により Np-1 と c-Met は蛋白複合体を形成していた。また HGF と Np-1 の結合を阻害する抗 Np-1 抗体を用いた invasion assay では PANC-1 の HGF による浸潤が有意に抑制された。Np-1 は integrin β 1、c-Met と結合して膵癌の増殖、接着、浸潤、アポトーシスに關与する。Np-1 は膵癌の治療標的に成りうると思われた。

研究成果の概要（英文）：

Neuropilin-1 (Np-1) is a co-receptor for VEGF-A that is overexpressed in PDAC, but its role in PDAC is not clearly defined. PANC-1 pancreatic cancer cells, which express high levels of Np-1, were transfected with the Np-1 antisense cDNA. By comparison with sham transfected cells, Np-1 antisense expressing clones (Np-1AS) exhibited decreased adhesion and invasiveness. Np-1 associated with integrin β 1, and integrin β 1 blockade attenuated adhesion, mimicking the effects observed in Np-1AS clones. Furthermore, HGF promoted cell invasion in PANC-1 cells, and this effect was dependent on Np-1. Conversely, COLO-357 pancreatic cancer cells, which express low levels of Np-1, were stably transfected with the Np-1 cDNA. Overexpression of Np-1 was associated with enhanced invasiveness in response to HGF, and these effects could be abolished either by siRNA-mediated down-regulation of c-Met, or by an anti-Np-1 antibody. Np-1 associated with c-Met, and this association occurred on the plasma membrane. Moreover, HGF promoted the internalization of Np-1-c-Met complex. Np-1 is a co-receptor of integrin β 1 and c-Met that promotes pancreatic cancer cell adhesion and invasion. Targeting Np-1 may lead to novel therapeutic strategies in PDAC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：neuropilin-1、膵癌

1. 研究開始当初の背景、研究の目的

膵癌の予後は不良であり、その治療は非常に困難である。膵癌では多くの増殖因子レセプターやそのリガンドの発現が認められ、その悪性度との関連性が報告されている。Neuropilin-1 (Np-1)は増殖因子 VEGF-A と神経軸索伸長阻害因子 semaphorin3A の co-receptor として働く膜蛋白である。Np-1 の膵癌における発現は報告されているが、その生物学的役割は明らかではない。Np-1 が膵癌の新たな治療標的と成り得るかを検討した。

2. 方法、研究成果

Np-1 高発現膵癌細胞株 PANC-1 を用い Np-1 発現を antisense 法にて低下させたところ、Np-1 antisense clone (Np-1AS) では sham に比し、MTT assay, soft agar assay による増殖、adhesion assay による細胞外基質に対する接着、invasion assay による浸潤が低下し、Act D によるアポトーシスが有意に誘導された(図1、2、3、4、5)。さらに抗 integrin $\beta 1$ 抗体の投与により、adhesion assay における PANC-1 の接着は Np-1AS に類似して減少した(図4)。Immunoprecipitation(IP)および Western blot(WB)にて Np-1 は integrin $\beta 1$ と蛋白複合体を形成していた(図6)。また PANC-1 では VEGF-A ではなく HGF により浸潤を誘導され Np-1AS では HGF による浸潤が減少した(図7)。そこで、Np-1 低発現株 COLO-357 を用いて Np-1 高発現クローンを作成したところ、HGF により誘導される細胞浸潤は sham に比し有意に増加し、その細胞浸潤は HGF の受容体である c-Met に対する siRNA の投与により抑制された(図8、9)。

IP と WB により Np-1 と c-Met は蛋白複合体を形成しており(図10)、confocal microscopy では Np-1-c-Met 蛋白複合体は細胞膜上に局在していた(図11)。また HGF と Np-1 の結合を阻害する抗 Np-1 抗体を用いた invasion assay では PANC-1 の HGF による浸潤が有意に抑制された(図12)。

Effect of Np-1 suppression on cell growth

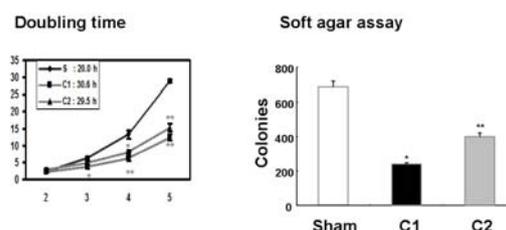


図1

Effect of ActD on cell survival

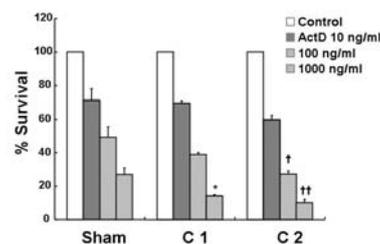
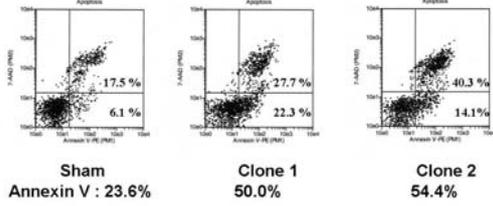


図2

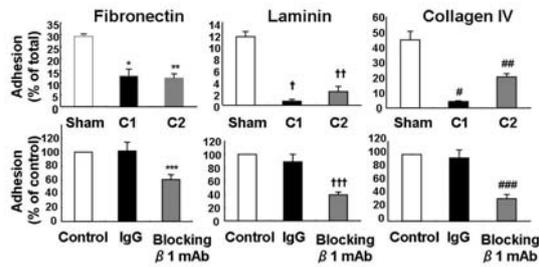
Effect of ActD on pro-apoptotic actions

Annexin V, 7-AAD staining, Act D 500 ng/ml, 24 Hr



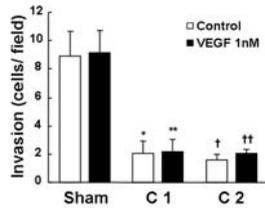
☒ 3

Effect of Np-1 suppression and integrin $\beta 1$ Ab on cell adhesion



☒ 4

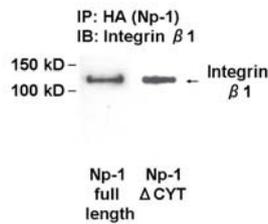
Effect of Np-1 suppression on cell invasion



☒ 5

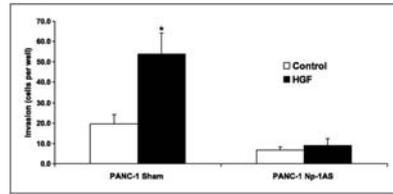
Interactions of integrin $\beta 1$ with Np-1

Transient transfection of pMH vector with full length or extracellular domain of Np-1 in PANC-1 cells



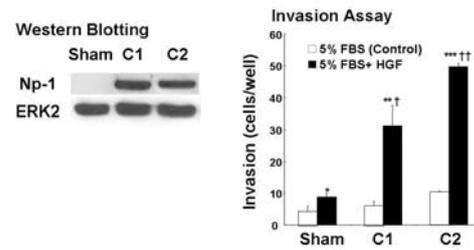
☒ 6

Effect of HGF on invasion in PANC-1 cells



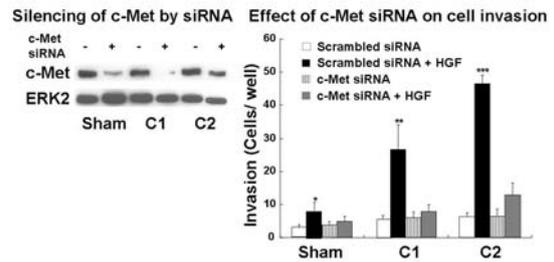
☒ 7

Effects of HGF on cell invasion



☒ 8

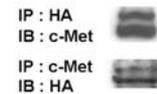
Effects of c-Met siRNA on cell invasion



☒ 9

Immunoprecipitation Analysis

COLO-357 cells stably overexpressing Np-1



☒ 10

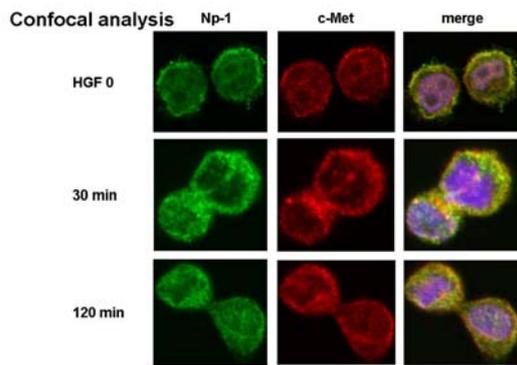


図 1 1

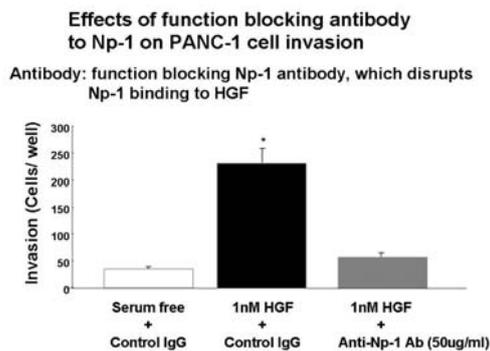


図 1 2

3. 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 4 件)

① 松下 晃、吉田 寛、横山 正、牧野浩司、丸山 弘、松谷 毅、平方敦史、山初和也、川本聖郎、中村慶春、相本隆幸、内田英二. Neuropilin-1 を標的とした新たな膵癌治療. 第 112 回日本外科学会、2012 年 4 月 14 日、幕張

② Matsushita A, Götze T, Kawamoto M, Nakamura Y, Aimoto T, Ishiwata T, Naito Z, Uchida E, Korc M. Neuropilin-1 is an important therapeutic target in pancreatic cancer. 42nd Annual Meeting of the American Pancreatic Association, 2011.11.3, Chicago, USA

③ 松下 晃、吉田 寛、横山 正、丸山 弘、鈴木成治、松谷 毅、平方敦史、石渡俊行、内藤善哉、川本聖郎、中村慶春、相本隆幸、内田英二. Neuropilin-1 を標的とした新たな膵癌治療法の開発. 第 42 回日本膵臓学会、2011. 7. 29、弘前

④ 松下 晃、笹島耕二、横山 正、丸山 弘、鈴木成治、松谷 毅、川本聖郎、中村慶春、相本隆幸、内田英二. 膵癌における neuropilin-1 を治療標的とした浸潤、転移の制御. 第 65 回日本消化器外科学会、2010. 7. 14 ~ 7. 16、下関

4. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 晃 (MATSUSHITA AKIRA)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：70449263

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者