

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 21 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790675

研究課題名（和文）ルミカンの糖鎖制御による膵臓癌細胞増殖・転移機構制御法の開発と治療応用

研究課題名（英文）Application of control method to inhibit pancreatic cancer cell growth and metastasis by the regulation of lumican glycosylation.

研究代表者

山本 哲志（YAMAMOTO TETSUSHI）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20453920

研究成果の概要（和文）：浸潤性膵管癌の間質におけるルミカンの発現は、癌の浸潤や予後の悪化と関連があることが報告されている。今回、遺伝子導入法を用いて、培養膵臓癌細胞によって分泌されるルミカンの機能について検討した。ルミカン過剰発現膵臓癌細胞は、分子量 70kDa のルミカンを過剰に分泌し、それに伴い ERK が活性化した。また、遺伝子導入したことにより細胞増殖能が亢進するとともにラミニンに対する接着能が増加した。さらに細胞浸潤能が抑制され、それに関連して MMP-9 の活性が抑制された。一方、siRNA を用いてルミカンの発現を抑制すると逆の結果が得られた。このことから、膵臓癌細胞によって分泌される 70kDa のルミカンは、膵臓癌細胞の増殖や浸潤に重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Lumican expression in the stromal tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) correlates with tumor invasion, and tends to correlate with poor prognosis. We used gene transfection techniques to examine the biological roles of lumican secreted from PDAC cells. Lumican-transfected PDAC cells secreted a 70-kDa lumican protein and had an active ERK pathway. Transfection stimulated PDAC cell growth, increased cell adhesion to laminin, inhibited cell invasion, and decreased active matrix metalloproteinase-9. Down-regulation of lumican using siRNA resulted in opposite cell behavior. Thus, the 70-kDa lumican secreted by PDAC cells plays important roles in cell growth and invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：ルミカン、膵臓癌、細胞増殖、細胞浸潤、MMP-9

1. 研究開始当初の背景

ルミカンは小型ロイシンリッチプロテオグリカンファミリーに属しているプロテオグリカンの1種であり、そのコアタンパク内に10

個のロイシンリッチリピート構造と4カ所の糖鎖修飾が可能な部位を持っている。皮膚の真皮や目の角膜においては、ケラタン硫酸鎖が付加したルミカンが豊富に存在し、膠原線

維の配列を調整している。そのため、眼科領域では角膜の創傷治癒と関連して研究が進められている。

腫瘍領域においては、大腸癌、乳癌、子宮頸癌、悪性黒色腫細胞や骨肉腫細胞など様々な腫瘍でルミカンの発現が報告されている。大腸癌や乳癌においては、ルミカンの発現は癌の発症年齢の若年化や予後の悪化等と関連しているとの報告がある。一方、骨肉腫細胞や悪性黒色腫細胞ではルミカンの発現により癌細胞の増殖抑制やアポトーシスを誘導することが報告されている。さらに、悪性黒色腫細胞ではルミカンのコアタンパク質投与により細胞の遊走能を抑制するとの報告もあり、近年ルミカンのコアタンパクの配列をモデルにしたペプチド (lumcorin) により同様に遊走能を抑制できることが報告されている (Zeltz C, et.al. **FEBS Lett.**, 2009)。このようにいくつかの癌においてはルミカンにより癌の進行や転移を抑制できる可能性が報告されており、悪性黒色腫細胞に対してはルミカンモデルにしたペプチド製剤までもが開発されようとしている。しかし、その一方ではルミカンの発現が癌の進行や悪性度を増加させるような報告もあり、癌におけるルミカンの発現の意義とその機能については一致した見解が得られていない。

膵臓癌組織におけるルミカンの発現とその機能については、免疫組織化学染色法を用いた検討が行われており、癌周囲の間質でのルミカンの発現が、十二指腸や後腹膜への浸潤や予後の悪化と関連することが報告されている (Ishiwata T, et.al. **Oncol Rep.**, 2007)。また、培養膵臓癌細胞を用いた検討により、膵臓癌細胞は分子量 70kDa の単一の糖鎖修飾されたルミカンを産生・分泌していることも明らかとなった。しかし、糖鎖修飾されたルミカンの膵臓癌細胞の増殖・浸潤能への作用については未だ不明な点が多いのが現状である。本研究は、膵臓癌細胞におけるルミカンの機能や作用機序について明らかにすることで、ルミカンの糖鎖修飾制御による膵臓癌治療の新たな臨床応用方法の開発が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

多くの培養膵臓癌細胞においてルミカンが発現していることが報告されている。そこで、これらの細胞により産生されるルミカンの糖鎖修飾構造を酵素消化を行うことによって確認する。また、培養膵臓癌細胞にルミカンの cDNA を組み込んだ発現ベクターを導入することでルミカン過剰発現細胞を作成し、対照細胞と細胞増殖能や遊走・浸潤能等の細胞動態について比較検討することでルミカンの機能を明らかにする。また、膵臓癌細胞のルミカンの発現を siRNA の導入により抑制した際の

細胞動態も併せて解析することで、より詳細にルミカンの機能を解析する。そして、それらを制御しているシグナル伝達経路の解析も行う。これらの研究により、ルミカンの糖鎖制御による膵臓癌細胞の増殖・転移の抑制法の開発を検討する。

3. 研究の方法

(1) ルミカンの糖鎖修飾解析

培養膵臓癌細胞である PANC-1、MIA PaCa-2 及び KLM-1 細胞の培養上清を採取し、エンド-β-グリコシダーゼまたはケラターゼを用いて酵素消化することでルミカンにケラタン硫酸鎖が修飾されているかを検討した。また、他の糖鎖修飾を検討するため、PNGase 及び O-7 グリコシダーゼを用いて同様に酵素消化を行った。

(2) ルミカン過剰発現細胞の作製

pIRES2-EGFP vector にルミカンの cDNA を組み込んだルミカン発現ベクターを作成し、PANC-1 細胞に、FuGENE HD を用い化学的に遺伝子導入した。対照細胞にはルミカンの cDNA を組み込んでいない空ベクターを導入した (Mock 細胞)。ルミカンの過剰発現は real-time PCR 法と Western blot 法及び ELISA 法を用いて検討した。

(3) ルミカン発現抑制細胞の作製

ルミカンの siRNA (Applied 社) を PANC-1 細胞に Trans IT-siQUEST を用い化学的に遺伝子導入した。対照細胞には他の遺伝子発現に影響を与えない negative control siRNA を導入した (NC 細胞)。発現抑制は real-time PCR 法と Western blot 法及び ELISA 法を用いて検討した。

(4) ルミカンの発現調節による細胞増殖能の検討

過剰発現細胞、発現抑制細胞を 24 時間、48 時間、72 時間、96 時間培養した時の細胞増殖能を MTT アッセイ及び細胞数計測法を用いてそれぞれの対照細胞と比較検討した。

(5) ルミカン発現調整細胞における細胞増殖関連シグナル伝達経路の活性測定

ルミカン発現調整細胞より培養 72 時間後にタンパク質を採取した。その時の ERK 及び AKT の活性を Western blot 法で比較検討した。

(6) ルミカンの発現調節による細胞遊走・浸潤能の検討

過剰発現細胞、発現抑制細胞を用い、タイムラプス解析による細胞の遊走能を検討した。また、boyden chamber を用いて細胞の遊走能及びマトリゲルに対する浸潤能も検討した。

(7) ルミカンの発現調節細胞における MMP-2

及び MMP-9 の発現量と活性の検討
過剰発現細胞、発現抑制細胞の培養上清
し、そこに含まれている MMP-2 と MMP-9
の活性体と総量を測定した。

(8) ルミカンの発現調節による細胞接着能
の検討

過剰発現細胞、発現抑制細胞を用い、
細胞外基質 (Type I コラーゲン、Type IV
コラーゲン、ラミニン、フィブロネク
チン) に対する接着能を検討した。

4. 研究成果

小型ロイシンリッチプロテオグリカンであるルミカンの膵臓癌における機能を検討するために、培養膵臓癌細胞により産生・分泌されるルミカンの糖鎖修飾を糖鎖切断酵素を用いて解析を行った。その結果、ルミカンには硫酸化の少ないポリラクタサミン鎖が結合していた。また、それ以外にも N-結合型の糖鎖修飾が行われていることが分かった。一方、O-結合型の糖鎖についても検討を行ったが、今回の検討に用いた酵素で切断される O-型糖鎖修飾は認められなかった。

次に、培養膵臓癌細胞株の一つである PANC-1 細胞にルミカン発現ベクターを導入した過剰発現細胞を作成し、細胞増殖能について検討した所、ルミカンの過剰発現により、細胞増殖能が亢進することが明らかになった。また、PANC-1 細胞に siRNA を投与し、ルミカンの発現抑制細胞を調製し、細胞増殖能について検討した所、ルミカンの発現抑制により細胞増殖能が低下することが明らかとなった。そこでルミカンにより制御される細胞増殖に関わるシグナル伝達経路を検討したところ、細胞増殖を制御している ERK のリン酸化とルミカンの発現に正の相関関係が認められた。

次に、これらのルミカン発現調整細胞を用いてルミカンの発現が細胞の遊走・浸潤能に及ぼす影響を調べるためにタイムラプス解析と boyden chamber を用いたアッセイを行った。その結果、ルミカンの発現量と細胞の遊走能には関連が認められなかったが、浸潤能に関して負の相関が認められた。また、ルミカンの細胞浸潤への作用する機構を解明するために、MMP-2 と MMP-9 の発現量と活性について検討した。MMP-2 に関してはルミカンの関与が認められなかったが、MMP-9 の活性についてルミカンの発現量と負の相関が認められた。

次に、ルミカンの細胞外基質への接着能に対する影響について検討した。ラミニンに対する接着能がルミカンの発現量と正の相関を示したので、主にラミニンの接着に関わるインテグリンとして知られているインテグリン

α3 の発現量について検討を行ったところ、ルミカンの発現量と正の相関性を示した。

糖鎖修飾はタンパク質の構造や機能に重要な役割を果たしていることが知られているが、今回の検討により膵臓癌細胞が産生・分泌している特異的なルミカンには硫酸化の少ないポリラクタサミン鎖や N-結合型の糖鎖修飾がなされていることが明らかとなった。そのため、ルミカンの糖鎖修飾を阻害することで浸潤能を抑制すると共に細胞増殖能も抑制できる可能性が考えられた。

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 4 件)

- ① T. Yamamoto, Y. Matsuda, K. Kawahara, T. Ishiwata, Z. Naito
Secreted 70kDa lumican stimulates growth and inhibits invasion of human pancreatic cancer,
Cancer letters, 査読有, 320 巻, 2012 年, 31-39 ページ
Doi:10.1016/j.canlet.2012.01.023
- ② T. Yamamoto, Y. Matsuda, K. Kawahara, Z. Naito, T. Ishiwata
Keratinocyte growth factor stimulates growth of MIA PaCa-2 cells through extracellular signal-regulated kinase phosphorylation,
Oncology letters, 査読有, 3 巻, 2012 年, 307-310 ページ
Doi: 10.3892/ol.2011.466
- ③ Matsuda Y, Fujii T, Suzuki T, Yamahatsuta K, Kawahara K, Teduka K, Kawamoto Y, Yamamoto T, Ishiwata T, Naito Z.
Comparison of fixation methods for preservation of morphology, RNAs, and proteins from paraffin-embedded human cancer cell-implanted mouse models.
J Histochem Cytochem., 査読有, 59 巻, 2011 年, 68-75 ページ
doi: 10.1369/jhc.2010.957217
- ④ T. Ishiwata, K. Teduka, T. Yamamoto, K. Kawahara, Y. Matsuda, Z. Naito
Neuroepithelial stem cell marker nestin regulates the migration, invasion and growth of human gliomas
Oncol Rep., 査読有, 26 巻, 2011 年, 91-99 ページ
doi: 10.3892/or.2011.1267

[学会発表] (計 5 件)

- ① 山本 哲志, Lumican, a member of small leucine-rich proteoglycan family, as a new target to develop

molecularly-targeted drug for pancreatic cancer, 第 101 回米国癌学会総会, 平成 22 年 4 月 19 日, 米国, ワシントン

- ② 山本 哲志, The role of lumican in the extracellular space of pancreatic cancer, 第 14 回国際膵臓学会・第 41 回日本膵臓学会大会合同会議, 平成 22 年 7 月 12 日, 福岡
- ③ 山本 哲志, Glycoprotein form of lumican induced pancreatic cancer cell growth, 第 28 回内藤記念コンファレンス, 平成 22 年 7 月 28 日, 神奈川
- ④ 山本 哲志, Enhanced expression of secreted type of lumican induced pancreatic cancer cell growth, 第 69 回日本癌学会学術総会, 平成 22 年 9 月 23 日, 大阪
- ⑤ 山本 哲志, 膵癌特異分泌型lumicanの細胞増殖への関与, 第 100 回日本病理学会総会, 平成 23 年 4 月 28 日, 神奈川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 哲志 (YAMAMOTO TETSUSHI)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 20453920

(2) 研究分担者

研究者番号 :

(3) 連携研究者

研究者番号 :