

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591898

研究課題名(和文)膵分泌性トリプシンインヒビター抗体を用いた膵癌に対する分子標的治療の開発

研究課題名(英文)Developing pancreatic secretory trypsin inhibitor of molecular target therapy for pancreatic cancer with pancreatic secretory trypsin inhibitor antibodies.

研究代表者

堀野 敬 (HORINO, Kei)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：60452900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マウスミエロームSp2/OAg-14細胞と免疫マウスの脾臓細胞をPEG溶液内で融合、培地交換を行い2週間後に抗体産生の有無を確認し抗体の産生を試行錯誤したが、ハイブリドーマ作成に難渋したため、メスBalb/Cマウスに抗原(PSTI)を8週間に8回腹腔内に投与し、感作させた既存のPSTIモノクローナル抗体を用いて実験を行った。単回の投与では膵炎を惹起させ投与量により重症度が変化するだけだった。SPINKの新たな機能としてオートファジー制御を介して膵癌の発育促進に関与している可能性のもと研究を進めたが、ヒトPSTIモノクローナル抗体として単回投与では一過性のオートファジーの機能亢進を認めるのみだった。

研究成果の概要(英文)：The fusion with PEG solution in the spleen cells of immunized mice and Sp2/OAg-14 cell mouse myeloma, and to confirm the presence or absence of antibody production in two weeks after the medium was replaced, it was trial and error the production of antibodies, but because it was bogged down in hybridoma create, was administered to 8 times intraperitoneally 8 weeks antigen (PSTI) to female Balb/C mice were subjected to experiments with PSTI existing monoclonal antibodies that were sensitized. It allowed to induce pancreatitis in the administration of a single, severity was only varies with the dose. As a new function of SPINK, proceeded under study may be involved in growth promotion of pancreatic cancer via autophagy control, but woven transient in a single dose as human PSTI monoclonal antibodies - the Tofaji it was only acknowledge hyperactivity.

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：膵癌 PSTI SPINK1 分子標的治療薬 オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

### 膵分泌性トリプシンインヒビター

(Pancreatic secretory inhibitor: PSTI) は膵腺房細胞で産生される膵に特異的なペプチドであり、トリプシノーゲンが活性化されてトリプシンになった場合、その活性を阻害して膵を自己消化から守る役割を担っている。近年の報告で PSTI は膵以外の臓器にも広く存在し生体の防護反応や増殖因子として作用していることが解明されている(Gastroenterology 129: 696-705. 2005)。また、PSTI が様々な癌腫で発現しており、特に膵癌ではヒト上皮成長因子受容体 EGFR (主に MAP キナーゼカスケード) を介して細胞増殖を促進し、癌の発育・進展に関与していることが報告された。

(Fig.1-3) (Mol Cancer Res 7(9): 1572-81. 2009)。

一方、EGFR を標的とするモノクローナル抗体は分子標的薬として切除不能進行・再発大腸癌の治療に用いられている。また、進行膵癌に対する化学療法として Gemcitabine 併用により EGFR 抗体に生存期間を延長する効果があることが報告され、現在切除不能膵癌に対し比較試験が行われているが、大腸癌に対し EGFR 抗体を併用する場合 KRAS 遺伝子に変異があると効果が減ずることも報告されている(Cancer Res 66: 3992-3995. 2006)。膵癌の場合 80-90% の症例に KRAS 遺伝子変異を伴っており (Cell 53: 549-554. 1988)、EGFR 抗体を分子標的薬として用いた治療は有効な抗癌剤と併用しても限界があるものと推察できる。そこで、膵に特異性の高いペプチドである PSTI を標的とするモノクローナル抗体を用いた膵癌に対する分子標的治療の可能性が示唆された。もちろん膵の自己消化の制御など生命維持にとって重要な役割を担っている酵素のため酵素活性に与える影響は厳密に吟味されなければならないが、膵との親和性を考えると放射性同位元素ラベルによって膵外分泌機能を視覚的評価することも可能と考える。

## 2. 研究の目的

既存の PSTI 抗体を用い膵癌細胞の増殖または浸潤が抑制されるか否かを培養細胞で

確認し、抑制されたなら至適濃度を求める。可能であれば新たに PSTI に対するモノクローナル抗体を作成し使用する。抑制効果が確認出来たならば動物モデルに投与し生体反応及び臨床効果を確認する。

## 3. 研究の方法

(1) マウスミエローマ Sp2/OAg-14 細胞と免疫マウスの脾臓細胞を PEG 溶液内で融合  
(2) 膵癌培養細胞株と PSTI モノクローナルの親和性の確認

(3) 既存 PSTI モノクローナル抗体を用いた抗腫瘍効果の確認

(4) PSTI とオートファジーの相互作用の確認

## 4. 研究成果

(1) 細胞融合

マウスミエローマ Sp2/OAg-14 細胞と免疫マウスの脾臓細胞を PEG 溶液内で融合し、培地交換を行い2週間後に抗体産生の有無を確認し、抗体の産生を試行錯誤している。しかし、細胞融合の実験系が当教室では確立された方法がなく、ハイブリドーマ作成に難渋している。そのため、メス Balb/C マウスに抗原(PSTI)を8週間に8回腹腔内に投与し、感作させた既存の PSTI モノクローナル抗体を用いて実験を進めていくこととした。

(2) 既存の PSTI モノクローナル抗体を標識し、膵癌培養細胞株 PANC-1 および MiaPaCa2 について、親和性を免疫染色にて確認したところ、いずれの細胞株も同等に良好な親和性を示した。

(3) PSTI モノクローナル抗体投与時の抗腫瘍効果の確認

ヌードマウスに PANC-1 および MiaPaCa2 を移植した膵癌モデルマウスの作成を試みたが、ヒト PSTI モノクローナル抗体をマウスに投与すると、高率に膵炎を惹起させるため、正常細胞における耐用量と癌細胞における指摘投与量の検討が必要である。特に癌細胞における PSTI モノクローナル抗体の感受性は重要であるため、十分な検討が必要である。ヒト PSTI モノクローナル抗体として単回の投与では膵炎を惹起させることは投与量により重症度が変化するだけで

あった。そこで、パラメーターとして投与頻度および投与期間を新たに設定し、引き続き抗腫瘍効果の確認をすることとした。

#### (4) PSTI とオートファジーの相互作用の確認

オートファジーと膵癌、SPINKとオートファジーの関係についてはそれぞれの関係につき報告している文献がある。そこで、SPINKの新たな機能として、オートファジー制御を介して膵癌の発育促進に関与している可能性のもとさらなる研究を進めている。しかし、ヒトPSTIモノクローナル抗体として単回の投与では一過性のオートファジーの機能亢進を認めるのみであった。

#### 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9件)

Horino K, Takamori H, Ikuta Y, Nakahara O, Chikamoto A, Ishiko T, Beppu T, Baba H. Cutaneous metastases secondary to pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2012 15;4(7):176-80. 査読有  
DOI: 10.4251/wjgo.v4.i7.176.

Horino K, Beppu T, Komori H, Masuda T, Hayashi H, Okabe H, Takamori H, Baba H. Evaluation of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma with viral hepatitis. *Hepatogastroenterology*. 2012 Jun; 59(116):1217-9. 査読有  
DOI: 10.5754/hge09739.

Tanaka H, Takamori H, Kanemitsu K, Chikamoto A, Beppu T, Baba H. An autopsy study to clarify characteristics of local recurrence after extended pancreatectomy with intraoperative radiation therapy in patients with pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 2012;397(6):927-32. 査読有  
DOI: 10.1007/s00423-012-0934-8.

Nakahara O, Takamori H, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Tanaka H, Chikamoto A, Horino K, Beppu T, Kanemitsu K, Honda Y, Iyama K, Baba H. Carcinogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasm

of the pancreas: loss of microRNA-101 promotes overexpression of histone methyltransferase EZH2. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jul;19 Suppl 3:S565-71. 査読有  
DOI: 10.1245/s10434-011-2068-6.

Furuhashi S, Sugita H, Takamori H, Horino K, Nakahara O, Okabe H, Miyake K, Tanaka H, Beppu T, Baba H. NO donor and MEK inhibitor synergistically inhibit proliferation and invasion of cancer cells. *Int J Oncol*. 2012 40(3):807-15. 査読有  
DOI: 10.3892/ijo.2011.1243.

堀野 敬, 高森 啓史, 馬場 秀夫, 「特集：生活習慣と膵疾患 喫煙が膵癌周術期に与える影響」, *膵癌* 2012 27:132-138 査読無

URL:[https://www.jstage.jst.go.jp/article/suizo/27/2/27\\_132/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/suizo/27/2/27_132/_pdf)

Furuhashi S, Takamori H, Abe S, Nakahara O, Tanaka H, Horino K, Beppu T, Iyama K, Baba H. Solid-pseudopapillary pancreatic tumor, mimicking submucosal tumor of the stomach: A case report. *World J Gastrointest Surg*. 2011 27;3(12):201-3. 査読有  
DOI: 10.4240/wjgs.v3.i12.201.

Takamori H, Kanemitsu K, Hirota M, Ikeda O, Tanaka H, Beppu T, Yamashita Y, Oya N, Baba H. Perioperative intra-arterial and systemic chemotherapy for pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011 18(4):1110-5. 査読有  
DOI: 10.1245/s10434-010-1384-6.

阿部 真也, 高森 啓史, 田中 洋, 中原 修, 古橋 聡, 美馬 浩介, 堀野 敬, 増田 稔郎, 近本 亮, 石河 隆敏, 別府 透, 馬場 秀夫, 「がん患者の周術期管理のすべて 膵癌術後科学療法の実際」, *外科治療* 2011 104:855-860 査読無  
URL:<http://www.nagaihoten.co.jp/search/geka/B201113.html>

[学会発表](計23件)

坂田 和也, 大村谷 昌樹, 能登原 憲司, 橋本 大輔, 生田 義明, 新田 英利, 今井 克憲, 林 洋光, 近本 亮, 別府 透,

馬場 秀夫、「SPINK1 低発現マウスがもたらす膵障害の解析」、第 44 回日本膵臓学会大会、2013 年 7 月 26 日、仙台国際センター（宮城県）

尾崎 宣之、「膵発癌における Serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) と Epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現とその意義」、第 25 回日本消化器癌発生学会、2012 年 11 月 15 日、徳島ルネッサンスリゾートナルト

大村谷 昌樹、「慢性膵炎モデルマウスでは癌関連遺伝子の異常が引き起こされる」、第 71 回日本癌学会総会、2012 年 9 月 19 日、札幌市教育文化センター（北海道）

高森 啓史、堀野 敬、生田 義明、中原 修、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫、「皮下ドレーンは創部 SSI 防止に寄与するか?」、第 24 回日本外科感染症学会、2011 年 12 月 1 日、合歓の郷 Hotel&Resort（三重県）

Kuroki H, Takamori H, Nakagahara O, Ikuta Y, Chikmoto A, Beppu T, Baba H. 「Impact of duration of antimicrobial prophylaxis on surgical site infection after.」, IASGO, 2011.11.10, 京王プラザホテル（東京都）

Horino K, 「Does smoking have an influence on a peri-operative course for the pancreatic cancer?」, IASGO, 2011 年 11 月 10 日, 京王プラザホテル（東京都）

高森 啓史、生田 義明、中原 修、清住雄希、近本 亮、土居 浩一、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫、「膵頭十二指腸切除術における膵胃吻合部のドレーン管理」、第 73 回日本臨床外科学会総会、2011 年 11 月 8 日、京王プラザホテル（東京都）

黒木 秀幸、高森 啓史、生田 義明、中原 修、別府 透、馬場 秀夫、「転移性膵腫瘍の臨床病理学的特徴」、第 49 回日本癌治療学会学術集会、2011 年 10 月 27 日、名古屋国際会議場（愛知県）

高森 啓史、中原 修、生田 義明、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫、「膵癌切除症例検討における性差からみた臨床病理学的特徴」、第 49 回日本癌治療学会学術集会、2011 年 10 月 27 日、名古屋国際会議場（愛知県）

高森 啓史、生田 義明、中原 修、阿

部 真也、田中 洋、近本 亮、堀野 敬、別府 透、馬場 秀夫、「高齢者に対する膵頭十二指腸切除術」、JDDW2011、2011 年 10 月 23 日、マリンメッセ福岡

中原 修、高森 啓史、生田 義明、近本 亮、別府 透、馬場 秀夫、「切除不能膵癌におけるバイオマーカーとしての microRNA-21 発現の意義」、JDDW2011、2011 年 10 月 22 日、マリンメッセ福岡

Kosumi K, 「Is preoperative biliary drainage for obstructive jaundice in patient with cancer of the head of the pancreas justified?」, INTERNATIONAL SURGICAL WEEK 2011, 2011 年 8 月 28 日~9 月 1 日, パシフィコ横浜（神奈川県）

Horino K, Takamori H, Nakagahara O, Chikmoto A, Tanaka H, Ishiko T, Beppu T, Baba H. 「Utility of a critical pathway for pancreaticoduodenectomy.」, INTERNATIONAL SURGICAL WEEK 2011, 2011 年 8 月 28 日~9 月 1 日, パシフィコ横浜（神奈川県）

高森 啓史、生田 義明、中原 修、清住雄希、阿部 真也、田中 洋、堀野 敬、近本 亮、馬場 秀夫、「膵頭十二指腸切除術後の膵消化管吻合とドレーン留置定型化による安全な修練医手術の取り組み」、第 38 回日本膵切研究会、2011 年 8 月 26 日~8 月 27 日、久留米米萃香園ホテル（福岡県）

中原 修、高森 啓史、堀野 敬、近本 亮、田中 洋、古橋 聡、阿部 真也、別府 透、馬場 秀夫、「膵切除前後の膵外分泌機能の変化と術後肝臓脂肪沈着への影響」、第 42 回日本膵臓学会大会、2011 年 7 月 30 日、ホテルニューキャッスル（青森県）

堀野 敬、高森 啓史、阿部 真也、中原 修、増田 稔郎、近本 亮、田中 洋、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫、「喫煙が膵癌周術期に与える影響」、第 42 回日本膵臓学会大会、2011 年 7 月 29 日、ホテルニューキャッスル（青森県）

高森 啓史、田中 洋、中原 修、阿部 真也、堀野 敬、生田 義明、坂本 快郎、井田 智、増田 稔郎、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫、「門脈浸潤を伴う膵癌に対する集学的治療例における門脈合併切除の意義」、第 42 回日本膵臓学会大会、2011 年 7 月 29 日、ホテルニューキャ

ッスル(青森県)

堀野 敬、高森 啓史、田中 洋、中原修、阿部 真也、古橋 聡、増田 稔郎、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫、「膵頭十二指腸切除術前の減黄術と合併症」、第66回日本消化器外科学会総会、2011年7月15日、名古屋国際会議場(愛知県)

高森 啓史、田中 洋、阿部 真也、中原 修、堀野 敬、増田 稔郎、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫、「浸潤性膵肝臓に対する治療戦略」、第66回日本消化器外科学会総会、2011年7月14日、名古屋国際会議場(愛知県)

高森 啓史、「Randomized phase study of gemcitabine plus S-1 versus gemcitabine in unresectable advanced pancreatic cancer:GESTstudy」、第3回熊本消化器癌研究会、2011年7月11日、ホテル日航熊本

21堀野 敬、高森 啓史、田中 洋、中原修、阿部 真也、古橋 聡、増田 稔郎、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫、「術前減黄処置法と膵頭十二指腸切除術後感染症」、第23回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2011年6月10日、京王プラザホテル(東京都)

22高森 啓史、田中 洋、阿部 真也、中原 修、井田 智、古橋 聡、堀野 敬、別府 透、馬場 秀夫、「膵癌補助療法における抗癌剤のRelative Dose Intensityの意義/Does Relative dose intensity of perioperative chemotherapeutic agents correlate survival in patients with pancreatic cancer?」、第111回日本外科学会定期学術総会、2011年5月26日~5月28日(紙上発表)

23堀野 敬、高森 啓史、田中 洋、中原修、阿部 真也、徳永 竜馬、小澄 敬祐、宮田 辰徳、古橋 聡、増田 稔郎、近本 亮、別府 透、馬場 秀夫、「当院における輸血マニュアルに準じた膵頭十二指腸切除術時の輸血の現況/ Perioperative blood transfusion followed the manual in the pancreaticoduodenectomy.」、第111回日本外科学会定期学術総会、2011年5月26日~5月28日(紙上発表)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀野 敬(HORINO, Kei)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療  
医師  
研究者番号：60452900

### (2) 研究分担者

高森 啓史(TAKAMORI, Hiroshi)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療  
医師  
研究者番号：90363514

大村谷 昌樹(OHMURAYA, Masaki)  
熊本大学・生命資源研究・支援センター・  
准教授  
研究者番号：60398229

別府 透(BEPPU, Toru)  
熊本大学・医学部附属病院・特任教授  
研究者番号：70301372

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：