

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592018

研究課題名(和文)膵癌間質のプロテオーム解析

研究課題名(英文)Proteomic analysis targeting stroma of pancreatic cancer

研究代表者

遠藤 格 (ENDO, Itaru)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60211091

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)：膵癌は予後不良な疾患であり、新規治療薬の開発が期待されている。近年、膵癌間質が癌の進展を多面的に促進させ、抗癌剤耐性にも関与している事が実証された。本研究において、膵癌間質と正常膵間質で発現に差のある蛋白を網羅的に解析し、CRMP4という候補蛋白を選出した。膵癌においてCRMP4の発現は強力な予後、再発予測因子であり、静脈浸潤、肝転移とも相関を認めた。また、細胞実験系において、CRMP4の発現低下が増殖には変化を認めないが、浸潤能を低下させることを発見した。これらの結果から、CRMP4が膵癌細胞の浸潤を促進し、静脈浸潤、肝転移を増加させ、膵癌患者の予後を増悪させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer has an aggressive malignancy. Recently, stroma in tumor is reported to be associated with cancer-cell proliferation, apoptosis, differentiation and invasion in several cancers. In this project, we comprehensively examined proteins expressing in the stroma of pancreatic tumors or of normal pancreas, and found that CRMP4 differentially expressed in pancreatic tumor stroma compared to normal pancreatic tissue. Of all the CRMPs, only crmp4 was differentially expressed in pancreatic cancer tissues. CRMP4 staining was highly correlated with poor differentiation and liver metastasis. Multivariate analyses suggested that venous invasion and CRMP4 overexpression were prognostic factors for survival. CRMP4 knockdown using siRNA reduced cellular invasion, but did not affect proliferation. Our results suggested that CRMP4 is significantly associated with poor prognosis by increasing pancreatic cancer cell invasiveness, and can be a novel therapeutic target for pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科

キーワード：膵癌 癌微小環境 転移 浸潤

1. 研究開始当初の背景

膵癌の特徴の一つに desmoplasia と呼ばれる現象がある。これは、著名に間質の線維芽細胞が増殖し、細胞外マトリックス(ECM)が沈着することによって腫瘍の成長と浸潤を促進するというものである。類似した現象は他の癌種でも認められており、間質の構造は癌細胞によって積極的に構築され、様々な側面から癌の進展(増殖、生存、浸潤、転移)を促進させることが知られている。癌間質を正常化することができれば、間接的に癌の進展を抑制することが可能と考えられ、実際に腫瘍血管新生を抑制する薬剤が臨床応用されて一定の効果を上げている。線維芽細胞は癌間質の主要な構成細胞であり、CAF (cancer associated fibroblast) と称される。癌細胞と CAF の共培養やマウスへの混合移植モデルを活用した研究によって、CAF が癌の進展を多面的に促進させ、抗癌剤耐性にも関与していることが実証され、CAF は癌治療の新たな標的として注目を集めている。CAF を標的とした治療法は、既存の癌治療に相乗効果を見込めると考えられている。また、従来の癌細胞を標的とした治療は、遺伝子異常の頻度が高く、薬剤耐性を生じやすいが、CAF を標的とした場合には治療抵抗性を生じにくいとも期待されている。具体例として、間葉系幹細胞(MSC)が癌間質に積極的に取り込まれることを利用し、MSC に癌抑制作用のある IFN- γ を発現させ、マウスに投与することによって腫瘍形成や転移の抑制効果を得た報告や抗原提示能の高い樹状細胞に CAF のマーカーである FAP の mRNA を導入し、これを担癌マウスに投与して CAF に対する免疫反応を誘導させることで治療効果を示した報告があり、FAP に対する抗体を用いた臨床応用の試みも見られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌間質と正常膵間質で発現に差のある蛋白を網羅的に解析し、その結果から候補蛋白を選出し、その機能を膵癌組織サンプルを用いた実験(免疫組織化学、RT-PCR、Western blot)、細胞株を用いた実験(Proliferation, Invasion assay)、ノックアウトマウスの系で解明することにより、治療標的の可能性を追求することである。

3. 研究の方法

(1) 膵癌間質と正常膵間質における発現蛋白を網羅的に解析する。膵組織の間質部を sampling(LMD)。発現蛋白解析(LC FT-LTQ MS)。候補蛋白選出。

(2) 候補蛋白 CRMP4 について 裏付け実験 i) RT-PCR, ii) 免疫組織化学, iii) Western blot と in vitro での機能解析実験。

CRMP4 遺伝子欠損マウスの作製。ノックアウトマウスを用いた in vivo での機能解析実験を施行し、膵癌微小環境における CRMP4 の

機能を解明する。

4. 研究成果

(1) 膵癌間質と正常膵間質における発現蛋白の網羅的解析

組織からのサンプリング：膵切除検体から凍結切片を作成し、LMD(Laser captured microdissection, Leica LMD 7000)にて間質部分のみをサンプリングした。対象検体は、2009年に当施設で切除された膵癌切除例の病変部10例とコントロール群として IPMA(膵管内乳頭腺腫)切除例の非病変部8例とした。

発現蛋白の網羅的解析：LMD サンプルから蛋白を抽出し、液体クロマトグラフィーにて抽出蛋白を分離、質量分析器にて発現蛋白を同定、定量した(LC FT-LTQ MS)。

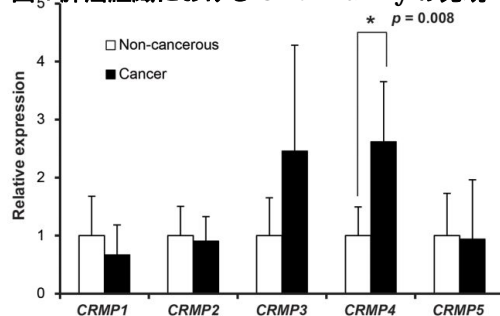
候補蛋白の選出：発現蛋白の網羅的解析を施行し、1498種類(up regulation:522、down:976)の蛋白を同定した。そのうち病変部と非病変部の間で発現差が大きく、文献的に悪性疾患との関連が示唆され、かつ、膵癌との関係性が報告されていない蛋白(CRMP4)を候補蛋白として選出した。

(2) 候補蛋白 CRMP4 の裏付け実験ならびに機能解析実験。

裏付け実験。

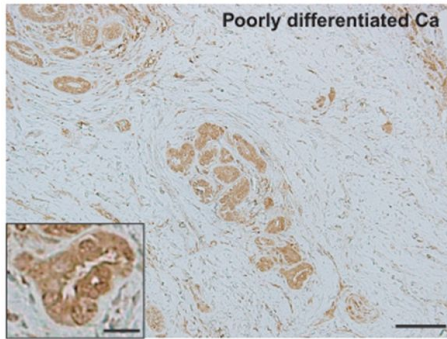
i) RT-PCR：膵癌切除症例の癌部と非癌部から肉眼で検体を採取し、抽出した Total RNA を逆転写し、cDNA を作成する。作成した cDNA を CRMP family の Taqman primer を用いて Real time PCR を施行し、各 subtype の癌部、非癌部での発現の差を検討した。11症例(22 sample)について RT-PCR を施行し、CRMP4 のみ有意差をもって癌部での発現上昇を認めた(図1)。

図1 膵癌組織における CRMP family の発現



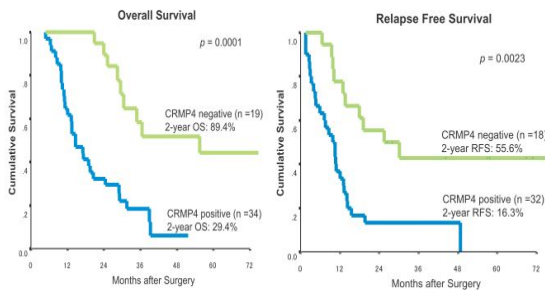
ii) 免疫組織化学：癌組織における CRMP4 の発現の局在を検証するため、膵癌組織と正常膵組織で免疫組織化学を施行した。その結果、間質細胞(癌部非癌部ともに軽~中等度)だけでなく、膵癌細胞(強発現)においても CRMP4 の発現が確認され(図2)、膵癌細胞自体において、CRMP4 が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

図2 膵癌組織における CRMP4 の発現



そこで、膵癌切除症例 53 例において、免疫組織化学を行い、膵癌細胞における CRMP4 の発現と臨床プロファイルとの関連を検証した。その結果、膵癌において CRMP4 の発現は強力な予後、再発予測因子であり、静脈浸潤、肝転移とも相関を認めた。(図3)

図3 CRMP4 発現と予後



in vitro での機能解析実験

CRMP4 高発現膵癌細胞株 (Capan-1) (図4) を Knock down し (図5) proliferation assay (図6), invasion assay (図7) を施行した結果、CRMP4 の発現低下により、増殖には変化を認めなかったが、浸潤能の低下が認められた。

図4 膵癌細胞株における CRMP4 の発現解析

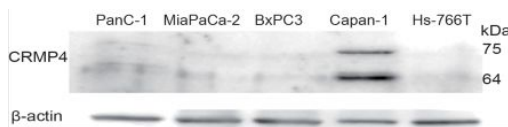


図5 Capan-1 の CRMP4 ノックダウン

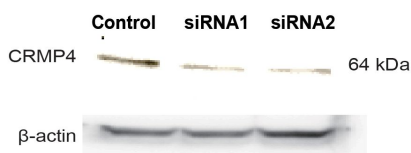


図6 CRMP4 ノックダウンと細胞増殖能

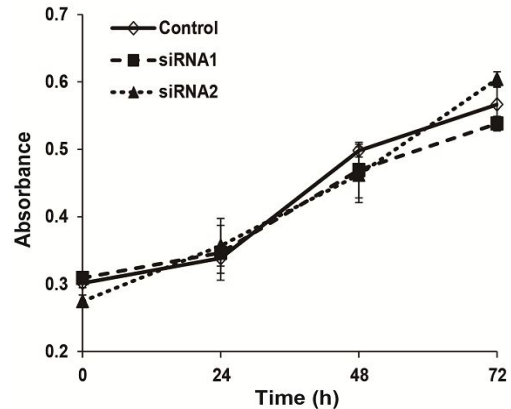
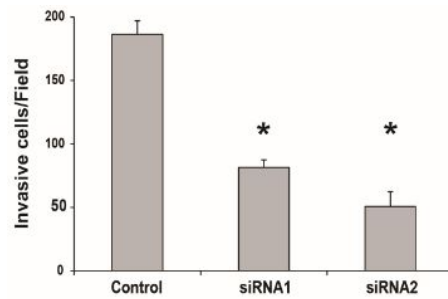


図7 CRMP4 ノックダウンと細胞浸潤能



これらの結果から、CRMP4 が膵癌細胞の浸潤を促進し、静脈浸潤、肝転移を増加させ、膵癌患者の予後を増悪させていることが示唆された。

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4件)

Hand-Held High-Resolution Fluorescence Imaging System for Fluorescence-Guided Surgery of Patient and Cell-Line Pancreatic Tumors Growing Orthotopically in Nude Mice.

Yukihiko Hiroshima, Ali Maawy, Sho Sato, Takashi Murakami, Fuminari Uehara, Shinji Miwa, Shuya Yano, Masashi Momiyama, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo and Robert M. Hoffman.

J Surg Res. 査読有, in press, 2013.

Successful fluorescence-guided surgery on human colon cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse models using a fluorophore-conjugated anti-CEA antibody and a portable imaging system.

Yukihiko Hiroshima, Ali Maawy, Cristina A. Metildi, Yong Zhang, Fuminari Uehara, Shinji Miwa, Shuya Yano, Sho Sato, Takashi Murakami,

Masashi Momiyama, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo and Robert M. Hoffman.

J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 査読有 2013 Oct. [Epub ahead of print]

Comparison of efficacy of Salmonella typhimurium A1-R and chemotherapy on stem-like and non-stem human pancreatic cancer cells.

Hiroshima Y, Zhao M, Zhang Y, Maawy A, Hassanein MK, Uehara F, Miwa S, Yano S, Momiyama M, Suetsugu A, Chishima T, Tanaka K, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM.

Cell Cycle. 査読有 2013 Sep 1;12(17):2774-80. doi: 10.4161/cc.25872. Epub 2013 Aug 6.

Collapsin Response Mediator Protein 4 Expression is Associated with Liver Metastasis and Poor Survival in Pancreatic Cancer.

Hiroshima Y, Nakamura F, Miyamoto H, Mori R, Taniguchi K, Matsuyama R, Akiyama H, Tanaka K, Ichikawa Y, Kato S, Kobayashi N, Kubota K, Nagashima Y, Goshima Y, Endo I.

Ann Surg Oncol. 査読有 2013 Dec;20 Suppl 3:S369-78. doi:10.1245/s10434-012-2491-3. Epub 2012 Jul 18. -3

〔学会発表〕(計7件)

Salmonella typhimurium A1-R effectively targets human-patient pancreatic tumorgrafts in nude mice.

Ming Zhao, Matthew H. G. Katz, Jason B. Fleming, Atsushi Suetsugu, Yong Zhang, Ali Maawy, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman, Yukihiko Hiroshima

ASCO annual meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago, IL.

Salmonella typhimurium A1-R targets chemoresistant stem-like human pancreatic cancer cells.

Yukihiko Hiroshima, Ming Zhao, Yong Zhang, Ali Maawy, Mohamed K. Hassanein, Atsushi Suetsugu, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman

ASCO annual meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago, IL.

Efficacy of Salmonella typhimurium A1-R on chemoresistant stem-like human pancreatic cancer cells

Yukihiko Hiroshima, Ming Zhao, Yong Zhang, Ali Maawy, Mohamed Hassanein, Atsushi Suetsugu, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman.

AACR annual meeting, April 6-April 10, 2013, Washington, DC.

Fluorescence-guided surgery for human-patient colon cancer tumorgrafts using a fluorophore-conjugated anti-CEA antibody

Yukihiko Hiroshima, Ali Maawy, Yong Zhang, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman.

AACR annual meeting, April 6-April 10, 2013, Washington, DC.

Tumor-educated macrophages promote proliferation of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo

Yukihiko Hiroshima, Masashi Momiyama, Mohamed Hassanein, Ali Maawy, Rhiana Menen, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman.

AACR annual meeting, April 6-April 10, 2013, Washington, DC.

Efficacy of Salmonella typhimurium A1-R treatment on human patient pancreatic tumorgrafts

Yukihiko Hiroshima, Ming Zhao, Matthew H.G. Katz, Jason B. Fleming, Atsushi Suetsugu, Yong Zhang, Ali Maawy, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman.

AACR annual meeting, April 6-April 10, 2013, Washington, DC.

Collapsin response mediator protein 4 promotes tumor cell invasion and lethality of pancreatic cancer

Yukihiko Hiroshima, Fumio Nakamura, Hiroshi Miyamoto, Ryutaro Mori, Koichi Taniguchi, Ryusei Matsuyama, Kazuhisa Takeda, Hirotohi Akiyama, Kuniya Tanaka, Yasushi Ichikawa, Yoji Nagashima, Yoshio Goshima, Itaru Endo.

AACR annual meeting, March 31-April 4, 2012, Chicago, IL.

〔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

<http://www.ycusurg2.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 格 (ENDO, Itaru)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：60211091

(2)研究分担者

平野 久 (HIRANO, Hisashi)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究
科・教授
研究者番号：00275075

森 隆太郎 (MORI, Ryutaro)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号：90596412

廣島 幸彦 (HIROSHIMA, Yukihiro)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：60718021

(3)連携研究者