

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462128

研究課題名(和文) 膵癌に対する化学療法感受性の検討 術前化学療法の確立を目指してー

研究課題名(英文) Sensitivity of chemotherapy in pancreatic cancer cells

研究代表者

佐々木 隆光 (Sasaki, Takamitsu)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00382284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌細胞株から塩酸ジェムシタピン耐性株MIA-GEMRを樹立し、KRAS変異に關与する細胞シグナルを検討した。MIA-GEMRは上皮間質転換様の形質変化と浸潤性増加を示しており、大腸癌のKRAS変異の誘導に類似していた。とりわけ、変異KRASの調整は幹細胞特異的遺伝子とTGF- β 1標的遺伝子と重複しており、KRASが形態や周囲微小環境に影響を与えていることが示唆された。さらに、ホスホジエステラーゼ阻害剤はMIA-GEMRの増殖を抑制した。これらの結果は、KRASの下流シグナルTGF- β 1が膵癌細胞株MIA PaCa-2の塩酸ジェムシタピン耐性に關与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We established GEM-resistant cells (MIA-GEMR) from MIA PaCa-2 cells and analyzed signaling pathway associated with the KRAS mutation. MIA-GEMR cells showed the epithelial-mesenchymal transition phenotype and invasiveness, which were similarly induced by the KRAS mutation in colorectal cancer cells. The genes differentially expressed between MIA-GEMR and MIA PaCa-2 cells were compared with those observed between the human colorectal cancer HCT116 cells and HKe3 cells. Notably, the common genes associated with mutant KRAS regulation overlapped with stem cell-specific genes and TGF- β 1 target genes, suggesting the crucial role of mutant KRAS in determining the morphology and microenvironment. Furthermore, the phosphodiesterase inhibitor resveratrol suppressed the growth of MIA-GEMR. These results suggest that TGF- β 1 signaling downstream of oncogenic KRAS is involved in the onset of GEM resistance in MIA PaCa-2 cells.

研究分野：胆膵外科

キーワード：Gemcitabine耐性膵癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌は悪性度の高い癌の一つであり、わが国では、毎年 26,000 人以上が膵癌で死亡しており、癌関連死の第 5 位である。切除が唯一の根治療法であるが、早期診断が困難であり、診断時に根治手術を受けられるのは、全体の 10~20%程度である。日本膵臓学会膵癌登録による通常型膵癌全症例の 5 年生存率は 11.6%と消化器癌のなかで最も予後不良である。したがって、早急な治療戦略を確立することが望まれている。

(2) 膵癌治療の成績を改善するために、治癒切除 (R0, R1) が行われた膵癌に対し gemcitabine を用いた術後補助化学療法の有効性と毒性を評価する臨床試験 (CONKO-001) がおこなわれ、gemcitabine 投与群は無治療観察に比べ有意に膵癌術後の再発を減少させる結果が得られ標準治療となっている。しかし、術後補助化学療法を施行されても、術後早期に局所再発と転移をきたす症例があり、それらはいわゆる Borderline resectable 膵癌と定義された。(NCCN 膵癌ガイドライン 2011)それらは、Resectable 膵癌と比較して、切除後の予後が不良であり、切除の適応や追加の補助療法が検討されている。

(3) Borderline resectable 膵癌に対する治療戦略として、術前化学療法が検討されるようになってきた。しかし、それらに対する術前化学療法は、症例によっては腫瘍増大により unresectable となり、根治切除の機会を失うこととなる危険性がある。よって、Borderline resectable 膵癌に対する術前化学療法は、Gemcitabine の感受性や耐性などの十分な科学的根拠が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究は Borderline resectable 膵癌の術前化学療法の確立を目指して、膵癌に対する Gemcitabine 耐性のメカニズムを明らかにする。Gemcitabine 耐性膵癌細胞株を用いて、

どのような分子構造によって膵癌に対する Gemcitabine の感受性が規定されるのか、また耐性を取得するのかを解明する。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵癌細胞株 KP2, KP4, KP8, SUIT-2, PANC-1, MIA PaCa-2 を用いた。塩酸ゲムシタビン (GEM) を IC_{50} の濃度で持続的に投与し、GEM 耐性膵癌細胞株を樹立する。

(2) GEM 耐性膵癌細胞株の形態変化を観察し、浸潤能の変化を 8.0- μ m polycarbonate membrane filters を用いて検討する。

(3) GEM 耐性膵癌細胞株を 2 次元および 3 次元で培養を行い、RNA を採取する。Human Genome U133 Plus 2.0 Array 6800 GeneChips を用いて、GEM 耐性に及ぼす遺伝子変化を検討する。

4. 研究成果

(1) GEM 耐性膵癌細胞株の樹立

MIA PaCa-2 が高濃度 GEM (1000 nM) に耐性を示した。(図 1)

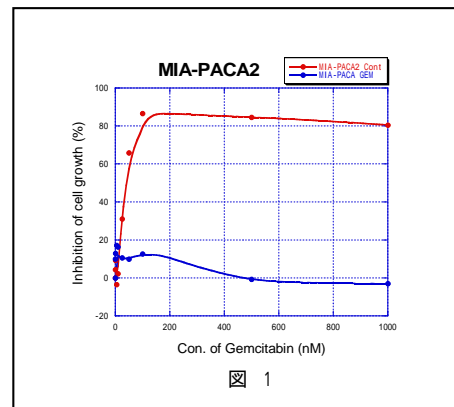


図 1

(2) GEM 耐性膵癌細胞株の形態変化

GEM に耐性を獲得した膵癌細胞株 MIA PaCa-2 (MIA-GEMR) は上皮間質転換様の形質変化を示した。(図 2)

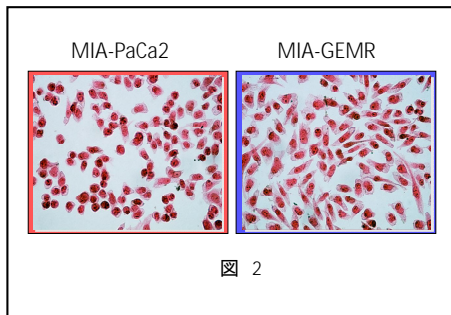


図 2

(3) GEM 耐性膵癌細胞株の浸潤能

MIA-GEMR の浸潤能は、耐性取得前と比較して有意に増加していた。(図3)

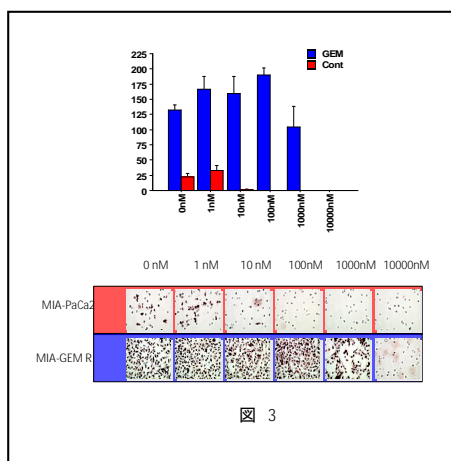


図 3

(4) MIA PaCa-2 と MIA-GEMR の遺伝子発現の相違を図4に示す。

Up-regulated genes		Down-regulated genes	
Gene Symbol	Log Fold change	Gene Symbol	Log Fold change
MAST4	7.1782656	IFI16	-8.182869
MAST4	6.558419	IFI16	-8.05105
GJA1	6.209089	ATPBD4	-5.3832583
PDE1A	6.1802254	PTPRZ1	-5.1480074
FLI1	6.1545668	ACSL6	-5.0153513
PDE1A	6.0702252	AQP4	-4.8476763
ELOVL6	6.0397415	COL1A1	-4.837364
MMP1	5.802817	GIT2	-4.766745
SYTL4	5.648421	LOC644242	-4.5996995
ADD3	5.6095138	LPHN3	-4.380941

図 4

(5) MIA-GEMR で発現が増加している mRNA と 2 次元培養および 3 次元培養で発現が増加している mRNA の比較ダイアグラムを図5に示す。

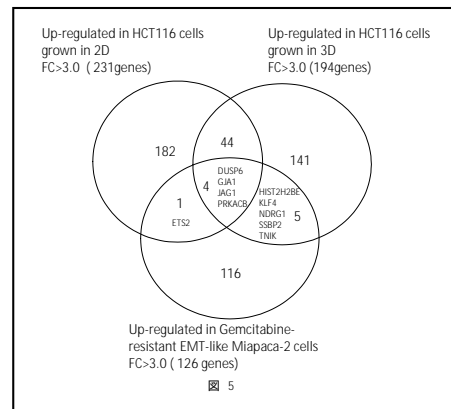


図 5

(6) ホスホジエステラーゼ阻害剤による腫瘍抑制効果

ホスホジエステラーゼ阻害剤(resveratrol)は GEM に耐性を示す MIA-GEMR においても増殖を抑制した。(図6)

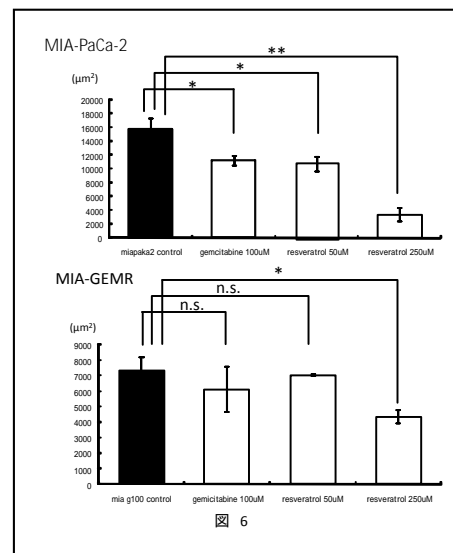


図 6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Fujiwara R, Luo Y, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Cancer Therapeutic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Are Associated with Oxidative Stress and Cytokine Induction. Pathobiology. (2015, 82:243-251) 査読あり

Kuwada M, Chihara Y, Luo Y, Li X,

Nishiguchi Y, Fujiwara R, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Fujimoto K, Kondoh M, Kuniyasu H. Pro chemotherapeutic effects of antibody against extracellular domain of claudin-4 in bladder cancer. Cancer Lett. (2015, 369:212-221) 査読あり

Luo Y, Tanabe E, Kitayoshi M, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Matsushima S, Sasaki T, Sasahira T, Chihara Y, Nakae D, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Expression of MAS1 in breast cancer. Cancer Sci. (2015,106:1240-1248) 査読あり

Ohmori,H., Luo,Y., Fujii,K., Sasaki,T., Kuniyasu,H. High motility group box 1 induces cancer aggressiveness and drug resistance. Ann Clin Pathol. (2015, 3: 1042) 査読あり

Luo,Y., Yoneda,J., Sasaki,T., Kawahara,I., Goto,K., Fujii,K., Ohmori,H., Kuniyasu,H. Alteration of the plasma free amino acids profiles in cancer patients is associated with dysregulated metabolism in skeletal muscle. Arch Cancer Res. (2015, 3: 1-5) 査読あり

AKT plays a crucial role in gastric cancer (Review) / Sasaki,T., Yamashita, Y., Kuniyasu,H. Oncol Lett (2015, 10: 607-611) Sasaki,T., Kuniyasu,H., Luo,Y., Kitayoshi,M., Tanabe,E., Kato,D., Shinya,S., Fujii,K., Ohmori,H., Yamashita,Y. AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. Pathobiology. (2014, 81: 36-41) 査読あり

Sasaki,T., Kuniyasu,H., Luo,Y., Kitayoshi,M., Tanabe,E., Kato,D., Shinya,S., Fujii,K., Ohmori,H., Yamashita,Y. AKT activation and telomerase reverse transcriptase

expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. Pathobiology. (2014, 81: 36-41) 査読あり

Sasaki,T., Kuniyasu,H., Luo,Y., Fujiwara,R., Kitayoshi,M., Tanabe,E., Kato,D., Shinya,S., Fujii,K., Ohmori,H., Yamashita,Y. Serum CD10 is associated with liver metastasis in colorectal cancer. J Surg Res. (2014, 192:390-394) 査読あり

Luo,Y., Yoneda,J., Ohmori,H., Sasaki,T., Shimbo,K., Eto,S., Kato,Y., Miyano,H., Kobayashi,T., Sasahira,T., Chihara,Y., Kuniyasu,H Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. Cancer Res. (2014, 74: 330-340) 査読あり

Zhou,L., Luo,Y., Sato,S., Tanabe,E., Kitayoshi,M., Fujiwara,R., Sasaki,T., Fujii,K., Ohmori,H., Kuniyasu,H. Role of Two Types of Angiotensin II Receptors in Colorectal Carcinoma Progression. /Pathobiology. (2014, 81: 169-175) 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

膵管癌における claudin-4 の分子標的化
佐々木 隆光, 國安 弘基, 羅 奕, 加藤 大輔, 新屋 智志, 塩飽洋生, 近藤昌夫, 山下 裕一 第 104 日本病理学会総会 (2015 年 4 月 30 日 - 5 月 2 日、名古屋市)

佐々木 隆光, 國安 弘基, 羅 奕, 千原 良友, 桑田 真臣, 北吉 美沙穂, 田邊 絵里子, 加藤 大輔, 新屋 智志, 山下 裕一 大腸癌における claudin-1 および claudin-4 の発現 第 103 日本病理学会総会 (2014 年 4 月 24 - 26 日、広島市)

EGF 標的化による胆嚢癌 EMT 形質の制御
佐々木 隆光, 國安 弘基, 羅 奕, 田邊 絵里子, 北吉 美沙穂, 大森 斉, 加藤 大輔, 新屋 智志, 山下 裕一 第 103 日本病理学会総会 (2014 年 4 月 24 - 26 日、広島市)

佐々木 隆光, 國安 弘基, 羅 奕, 加藤 大

祐, 新屋 智志, 近藤昌夫, 山下 裕一 膵
癌における claudin-1 および claudin-4 の発
現 第 25 回日本消化器癌発生学会総会
(2014 年 11 月 13 - 14 日、福岡市)

〔図書〕(計 2 件)

Sasaki,T., Yamashita,Y., Kuniyasu,H.
Current Research in Cancer. Significance
of AKT gastric cancer. Transworld Reseach
Network 7-18, 2014

Kuniyasu,H., Luo,Y., Yoneda,J.,
Sasaki,T., Fujii,K., Ohmori,H. Current
Research in Cancer / Significance
Significance and the cause of alteration
of the plasma free amino acids profiles in
cancer. Transworld Reseach Network 19-27,
2014

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 隆光 (SASAKI, Takamitsu)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号 : 382284

(2) 研究分担者

國安 弘基 (KUNIYASU, Hiroki)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 253055