

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670582

研究課題名(和文) 両刃の剣GLP-1の膵癌治療への応用

研究課題名(英文) Application of GLP-1 on the treatment of pancreatic cancer

## 研究代表者

大塚 隆生(OHTSUKA, Takao)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20372766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：GLP-1受容体発現を切除膵癌標本を用いて免疫染色法で評価し、臨床病理学的項目との関連を調べた。また膵癌細胞株でGLP-1受容体発現を抑制した際の膵癌悪性度に及ぼす影響を調べた。GLP-1受容体は膵癌の48%に認められた。GLP-1受容体発現は膵癌の臨床像や予後に影響を及ぼさなかった。一方、リンパ節転移巣の73%でGLP-1受容体発現を認めた。また神経浸潤、血管浸潤部位での発現も認められた。GLP-1発現抑制により、膵癌細胞の増殖、浸潤、遊走能は抑制された。以上より、GLP-1受容体は膵癌患者の予後予測因子ではないものの、転移能に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the potential role of glucagon-like peptide 1(GLP-1) in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). GLP-1R expression was semiquantitatively evaluated by immunohistochemistry in 48 PDAC samples, and its correlations with clinicopathological features were investigated. CFPAC-1 cells were used for GLP-1R knockdown to evaluate its effects on cell proliferation, migration and invasion. GLP-1R expression was positive in 23 tumors and negative in 25 tumors. No correlations were found between GLP-1R expression status and clinicopathological characteristics. The majority of lymph node metastases (73%) were positive for GLP-1R expression. Immunoreactivity for GLP-1R was also noted in sites of perineural and lymphovascular invasion. GLP-1R knockdown significantly reduced the proliferation, migration and invasion of CFPAC-1 cells. In conclusion, although GLP-1R is not an independent prognostic factor in PDAC patients, it appears to have some implications for PDAC metastatic ability.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 インクレチン GLP-1

1. 研究開始当初の背景

膵癌は 60~70%が診断時に切除不能であり、切除されても 5 年生存率 10~20%と極めて予後不良である。原因の一つに手術操作や術後合併症により癌の転移、浸潤能が亢進することが挙げられるが、そのメカニズムについては十分に解明されていない。一つの仮説として手術侵襲に伴い上昇するケミカルメディエーターによる癌の転移・増殖能亢進があり、実験的に TNF- $\alpha$  が癌の肝転移を促進する報告がされている。術後は宿主の免疫能低下などの複合的な要素も絡んで、遺残した癌細胞の転移再発形成を促進しており、このメカニズムを解明し制御することが膵癌の治療成績を上げる一つのカギとなる。そこで我々は GLP-1 に着目した。GLP-1 はインクレチンの一種で膵細胞の肥大・安定化作用もありラ氏移植や再生医療領域においてもその効果が期待されている。一方、GLP-1 には細胞増殖やアポトーシス抑制作用があり、発癌や癌の進行への影響が懸念されている。膵癌切除術後には膵切除術による膵細胞減少の代償機構として GLP-1 が上昇するが、この GLP-1 が遺残膵癌細胞の転移・再発を促進しているのではないかとこの点に着目した。

2. 研究の目的

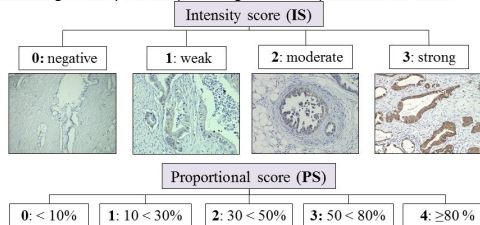
本研究の目的は、膵癌切除術後に起こる膵  $\beta$  細胞の絶対量減少に対する代償機構として誘導されるインクレチンの一つである GLP-1 による、もう一つの作用である腫瘍増殖・進展作用に着目し、膵癌周術期の転移・再発促進のメカニズムを明らかにし、GLP-1 の膵  $\beta$  細胞代償機能は残しつつ、膵癌への有害作用のみを特異的に阻害するという、膵癌治療の領域において全く新しい治療法の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

当該施設で切除した膵癌組織パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いて GLP-1R の免疫染色を行い、膵癌における GLP-1R の発現頻度、発現部位を調べ、臨床・病理学的因子との関係を調べた。評価方法は以下の通りである (図 1)。

図 1 Immunohistochemical evaluation

GLP-1R immunoreactivity was evaluated using the following scores according to the staining intensity and the percentage of GLP-1R positive cancer cells:



The final score (FS) was calculated by the formula  $IS \times PS$  and graded as follows:

Final Score (FS)	GLP-1R expression
ISxPS= 0 - 3	Negative
ISxPS= 4 - 12	Positive

また膵癌細胞株に GLP-1R の siRNA を導入し、GLP-1R の発現を抑制した状態での膵癌細胞の浸潤能、遊走能、増殖能を調べた。

4. 研究成果

本研究対象患者の特徴を表 1 に示す。

Clinicopathologic characteristics of patients with pancreatic cancer and evaluation of GLP-1R expression (n=48)

表 1

Characteristic	Count	Percentage
Median age	64 y	(range, 36-82 y)
Gender		
Female	22	46%
Male	26	54%
pT category		
pT1	1	2%
pT2	1	2%
pT3	43	90%
pT4	3	6%
pN category		
pN0	6	12%
pN1	42	88%
UICC Stage		
I	1	2%
II	42	88%
III	3	6%
IV	2	4%
Histological grade		
G1	8	17%
G2	16	33%
G3	24	50%
Lymphatic invasion		
Negative	8	17%
Positive	40	83%
Vascular invasion		
Negative	8	17%
Positive	40	83%
Neural invasion		
Negative	5	10%
Positive	43	90%
Surgical margin		
Negative	29	60%
Positive	19	40%
GLP-1R expression		
Negative	25	52%
Positive	23	48%

GLP-1 受容体は膵癌 48 例中 48%に認められたが、GLP-1 受容体発現は膵癌の臨床像 (表 2) や予後 (図 2) に影響を及ぼさなかった。

Relationship between GLP-1R expression and clinicopathologic factors (n=48)

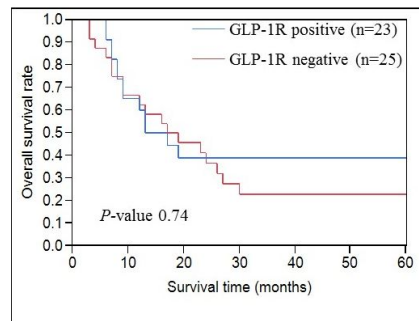
表 2

Characteristics	GLP-1R Positive (n=23)	GLP-1R Negative (n=25)	P-value
Age			0.77
$\geq$ 65 y	11 (46%)	13 (54%)	
< 65 y	12 (50%)	12 (50%)	
Gender			0.153
Female	13 (59%)	9 (41%)	
Male	10 (38%)	16 (62%)	
pT category			0.043*
pT1-pT3	23 (51%)	22 (49%)	
pT4	0	3	
pN category			0.44
pN0	2 (33%)	4 (67%)	
pN1	21 (50%)	21 (50%)	
UICC Stage			0.45
I	0	0	
II	20 (48%)	22 (52%)	
III/IV	2 (40%)	3 (60%)	
Histological grade			0.77
G1/G2	12 (50%)	12 (50%)	
G3	11 (46%)	13 (54%)	
Lymphatic invasion			0.36
Negative	5 (63%)	3 (37%)	
Positive	18 (45%)	22 (55%)	
Vascular invasion			0.516
Negative	3 (37%)	5 (63%)	
Positive	20 (50%)	20 (50%)	
Neural invasion			0.71
Negative	2 (40%)	3 (60%)	
Positive	21 (49%)	22 (51%)	
Surgical margin			0.514
Negative	15 (52%)	14 (48%)	
Positive	8 (42%)	11 (58%)	

\*P< 0.05

Overall Survival curves of patients with diagnosis of pancreatic cancer, stratified according to the expression of GLP-1R in primary tumor.

図 2

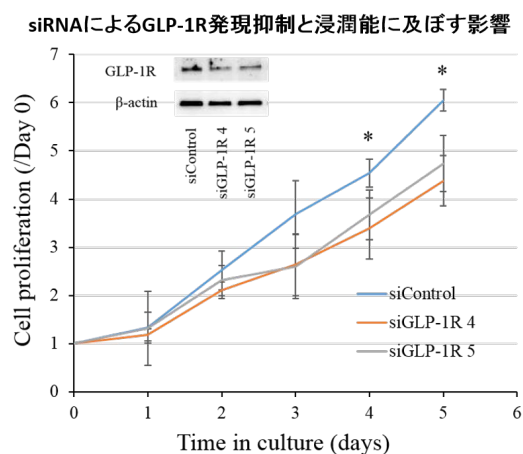


一方、リンパ節転移巢の73%でGLP-1受容体発現を認めた(表3)。また神経浸潤、血管浸潤部位での発現も認めた。

表3. Immunohistochemical evaluation of GLP-1R in metastatic site: analysis of 15 samples from 42 cases with lymph node metastasis.

Patient No	Age	Gender	Degree of Differentiation	GLP-1R expression in primary site	GLP-1R expression in lymph node sample
1	61	F	G3	positive	positive
2	79	F	G3	positive	positive
3	66	M	G3	positive	positive
4	63	F	G1	negative	positive
5	55	M	G3	positive	positive
6	67	F	G3	positive	positive
7	61	M	G3	negative	negative
8	65	M	G3	negative	positive
9	59	M	G3	positive	positive
10	73	M	G2	positive	positive
11	60	F	G3	positive	positive
12	50	F	G2	negative	negative
13	73	M	G2	negative	negative
14	55	F	G3	positive	positive
15	60	M	G3	negative	negative

また膵癌細胞株を用いたGLP-1発現抑制により、膵癌細胞の増殖、浸潤、遊走能は抑制された。下図ではCFPAC1膵癌細胞株にGLP-1Rに対するsiRNAを導入し、GLP-1R蛋白発現が抑制されていることをウエスタンブロット法で示し、浸潤能がGLP-1R-siRNA導入後に低下していることを示している。



以上より、GLP-1受容体は膵癌患者の予後予測因子ではないものの、転移能に関与している可能性が示唆された。

### 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5件)

全て査読有

1. Cases AI, Ohtsuka T, Fujino M, Ideno N, Kozono S, Zhao M, Ohuchida K, Aishima S, Nomura M, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M. Expression of glucagon-like peptide 1 receptor and its effects on biologic behavior in pancreatic neuroendocrine tumors. *Pancreas* 43(1); 1-6, 2014. DOI:10.1097/MPA.0b013e3182a71537
2. Akagawa S, Ohuchida K, Torata N, Hattori M, Eguchi D, Fujiwara K, Kozono S, Cui L,

Ikenaga N, Ohtsuka T, Aishima S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M. Peritoneal myofibroblasts at metastatic foci promote dissemination of pancreatic cancer. *Int J Oncol*, 45(1); 113-120, 2014.

DOI: 10.3892/ijo.2014.2391

3. Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Hashidume M, Tanaka M. Pancreatic cancer: Clinical significance of biomarkers. *Gastrointestinal Tumors* 1(1); 33-40, 2014. DOI:10.1159/000354996
4. Fujiwara K, Ohuchida K, Sada S, Horioka K, Ulrich CD 3rd, Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M. CD166/ALCAM expression is characteristic of tumorigenicity and invasive and migratory activities of pancreatic cancer cells. *PLoS One* 9(9); e107247, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0107247
5. Fujiwara K, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Shindo K, Ikenaga N, Cui L, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. Migratory activity of CD105<sup>+</sup> pancreatic cancer cells is strongly enhanced by pancreatic stellate cells. *Pancreas* 42(8): 1283-1290, 2013. DOI:10.1097/MPA.0b013e318293e7bd

[学会発表](計7件)

1. Cases A.I., Ohtsuka T, Zheng B, Horioka K, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M. Glucagon-like Peptide 1 Receptor in Pancreatic Cancer. 45<sup>th</sup> Anniversary Meeting of APA/JPS, 2014.11.8, Big Island, Hawaii, USA.
2. 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、寅田信博、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、水元一博、田中雅夫。膵癌の肝転移・腹膜播種巣における癌関連線維芽細胞の機能解析。第114回日本外科学会定期学術集会。2014. 4.4 京都。
3. 佐田政史、大内田研宙、堀岡宏平、田中友晴、鄭彪、Cases AI、赤川進、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、大塚隆生、高畑俊一、水元一博、田中雅夫。膵癌間質の線維配列が癌細胞の形態と浸潤方向に与える影響。第114回日本外科学会定期学術集会。2014. 4.4 京都。
4. 堀岡宏平、大内田研宙、江口大樹、佐田政史、田中友晴、赤川進、藤原謙次、鄭彪、仲田興平、宮坂義浩、前山良、大塚隆生、水元一博、田中雅夫。膵癌肝転移におけるFollistatin-like 1の役割。第114回日本外科学会定期学術集会。2014. 4.4 京都。
5. Cases AI, Ohtsuka T, Zheng B, Horioka K, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M. Expression of GLP-1 receptor and biological behavior in pancreatic neuroendocrine tumors. 44<sup>th</sup>

- APA Annual Meeting. 2013.10.31. Miami, FL, USA.
6. Fujiwara K, Ohuchida K, Akagawa S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M. CD166 expression characterized tumorigenicity, and invasive and migratory activities of pancreatic cancer cell lines. 44<sup>th</sup> APA Annual Meeting. 2013.10.31. Miami, FL, USA.
  7. Akagawa S, Ohuchida K, Torada N, Eguchi D, Kozono S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M. Comparisons of characteristics of peritoneal fibroblasts in dissemination with those of mesothelial cells and pancreatic stellate cells in pancreatic cancer. 44<sup>th</sup> APA Annual Meeting. 2013.10.31. Miami, FL, USA.

(3)連携研究者  
なし

〔図書〕(計1件)

1. 佐田政史、水元一博、大内田研宙、大塚隆生、田中雅夫. 「Annual Review 消化器 2014」膵癌の個別化治療を探る. p252-257, 中外医学社、東京、2014.

〔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：  
出願年月日：  
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

大塚 隆生 (OHTSUKA Takao)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：20372766

(2)研究分担者

江上 拓哉 (EGAMI Takuya)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：40507787