

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462071

研究課題名(和文) アディポネクチン動態からみた膵癌発癌機序の解明

研究課題名(英文) Relationship between pancreatic cancer and adiponectin

研究代表者

谷 眞至 (Masaji, Tani)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：60236677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥満者内臓脂肪は線維性癒着が多く、膵癌は線維化が多い腫瘍である。そこで胃癌大腸癌を用いたpreliminaryな検討を行った。血中adiponectin値は $8.6\pm 10.9\mu\text{g/ml}$ で、術後に血中濃度が減少した。一方、大腸癌Stage Ⅱ例の線維化を SMA染色陽性部分の面積で算出し、原発腫瘍の SMA陽性率20%をカットオフとすると、低陽性率で全生存率が低下した(SMA陽性率低値60.5%vs高値88.2%; $p<0.05$)。腫瘍の線維化は分化度と異なった予後予測因子であり、線維化の多い膵癌でも同様であるのか、adiponectinが関連するのかを引き続き検討する意義がある。

研究成果の概要(英文)：Fibrosis is the important factors for fibrous adhesion in fatty patients, and pancreatic cancer is fibrous tumor. Therefore, we performed preliminary study of both serum adiponectin concentration and influence of fibrosis. Preoperative serum adiponectin concentration was $8.6\pm 10.9\mu\text{g/ml}$ and they were decreased after operation. On the other hands, we estimated fibrosis at the positive area using SMA. When cut-off value of SMA positive cells was 20%, patients with low SMA positive cells (<20%) significantly demonstrated poor survival than high SMA patients ($p<0.05$). Fibrosis is the independent risk factor of the cancer survival.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 線維化 大腸癌 -SMA adiponectin

1. 研究開始当初の背景

膵癌は本邦の癌死亡第5位の疾患であるにもかかわらず、症状に乏しいことや、各種の画像診断において小膵癌の同定は極めて難しく、現状では早期発見が困難である。そのため、診断された時点ですでに進行癌であることがほとんどであり、現在でも切除不能例が切除可能例より多い現状がある。

膵癌の予後は以前からのものとほぼ同じであり、種々の抗癌剤をはじめとする薬剤が開発されたにもかかわらず、大きな改善効果を認めない。診断された膵癌患者の生命予後を延長させるために、有効な治療法の開発は重要な課題であるが、さらなる予後改善のためには早期に診断し治療することが最も効果的であることは容易に想像が可能である。膵癌の予後を改善する有効な新規治療法の開発のためには、膵癌の発癌機序からみた膵癌生物学的特性を解析することで、新たな標的分子を見つけ出せる可能性がある。

膵癌診療ガイドラインの中にも述べられているように、肥満・過体重は膵癌の危険因子である。わが国で行われた大規模コホート研究によると、body mass index (BMI) が $30\text{kg}/\text{m}^2$ 以上の20歳男性では、正常BMIの男性に比べ膵癌危険率が3.5倍増加し (Int J Cancer, 2007)、諸外国では、BMIが $5\text{kg}/\text{m}^2$ 増加すると膵癌危険率が1.12倍上昇する (Int J Cancer, 2007)。また、膵癌危険率をBMI $25\text{kg}/\text{m}^2$ 以下と比較するとBMI $30\text{kg}/\text{m}^2$ 以上で1.81倍、男性ではBMI $35\text{kg}/\text{m}^2$ 以上で2.61倍、女性ではBMI $40\text{kg}/\text{m}^2$ 以上で2.76倍と著増し、ウエストヒップ比やウエスト周囲径と膵癌危険率との相関性も報告されている (N Engl J Med, 2003)。肥満と運動との関連性から、激しい運動は必要ないが、適度の運動は膵癌発症リスクを低下させる (JAMA, 2001)。マウスモデルでも肥満は膵癌の増殖や播種に促すことが報告されている (Surgery, 2009)。

adiponectin は、脂肪細胞で産生され分泌されるアディポサイトカイン (アディポカイン) の一種であり、244個のアミノ酸より成る 30kDa のタンパク質である。adiponectin は、脂肪組織に特異的に発現する遺伝子 apM1 (adipose most abundant gene transcript)

の産物であり、血中濃度は一般的なホルモンに比べて桁違いに高く、 $5\text{-}10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ に達する (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000, J Biol Chem 2002)。adiponectin の作用としては、インスリン受容体を介さない糖取り込み促進作用、脂肪酸の燃焼、細胞内の脂肪酸を減少してインスリン受容体の感受性を上げる作用、肝臓のAMPキナーゼを活性化させることによるインスリン感受性の亢進、動脈硬化抑制、抗炎症、心筋肥大抑制など、多彩である (Nat Med, 2006)。adiponectin は肥満などのメタボリック症候群関連疾患で血中濃度が低下し、炎症性サイトカインであるIL-6、TNF- α 、CRP と負の相関にあることから、膵癌の発癌や膵癌に随伴する線維化に何らかの影響を与えている可能性がある。

2. 研究の目的

これまでの血清 adiponectin 濃度と肥満が膵癌に及ぼす影響に関する報告はなく、本研究においてアディポネクチンやその受容体、内臓脂肪量の解析し、臨床病理学的因子と比較することで、肥満やアディポサイトカインの変動が膵癌発癌や線維化の進展に影響を与えていることを証明し、早期発見の困難な膵癌に対する今までにない全く新しい治療法の開発に発展させるための基礎データを作成することを目的とする。

3. 研究の方法

胆がん患者の血清 adiponectin 濃度の測定

【対象】血清 adiponectin 濃度は肥満などのメタボリック症候群関連疾患で血中濃度が低下することや、炎症性サイトカインであるIL-6、TNF- α 、CRP と負の相関にあることから、担癌状態という慢性炎症状態に生体が長期間暴露されることで減少している可能性がある。とくに膵癌は糖尿病の合併率が高いこと、随伴する膵炎が広範囲に存在することなどから、通常の担癌状態に加え desmoplastic reaction 関連の影響を置けていると思われる。しかし、担癌状態が血清 adiponectin 濃度に及ぼす影響に関する報告はないことから、担癌状態での血清

adiponectin を確定するために症例数の多い胃癌と大腸癌患者の術前に同意をいただいた方を対象に測定を行った。

【測定方法】血清 adiponectin 濃度は術前に患者採血検体の余剰検体を用い、latex particle-enhanced turbidimetric assay (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) で計測した。本アッセイ法はラテックス・ビーズに rabbit anti-human adiponectin polyclonal antibodies を固相化し、抗原-抗体反応による凝集を応用したものである。すなわち、2 μ L の血清と 90 μ L の reagent 1 (0.1 M Tris-HCl buffer containing 0.9% NaCl; pH 8.0) を 5 分・37°C インキュベーションした後に、90 μ L の reagent 2 (antibody-immobilized latex bead suspension in 0.01 M Tris-HCl buffer; pH 8.0) を加え、turbidimetric immunoreaction を開始した。adiponectin 濃度は 2 つの時間ポイント; 5 分、10 分で測定を 2 つの異なる波長 (primary wavelength, 570 nm; secondary wavelength, 800 nm) を用いて吸光度を測定した。

癌組織の線維化が臨床的因子や予後に与える影響の解析

癌間質組織に特異的に存在する線維芽細胞を癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts: CAF) と呼び、標的臓器の微小環境を改築・再構成し、癌の浸潤・転移を促進することが知られている。一般的には CAF の多くは筋線維芽細胞のマーカーである -smooth muscle actin(SMA) を発現している。癌と線維化の関連性については明らかではない。

【対象】今回、仮説を証明するために症例数の多い大腸癌を対象とした preliminary な検討を本研究の基礎実験として行った。また、原発巣における原発腫瘍の先進部と中央部の間質の線維化について検討した。

【方法】当院で 2011 年 1 月から 2012 年 12 月に施行した大腸癌切除術を施行した、組織型が腺癌であり、病理学的 Stage III・IV の 55 症例を後方視的に検討した。腺癌以外の組織型、同時多発癌の症例は除外した。線維化

の評価は、腫瘍最大断面において -SMA による免疫組織化学染色を施行し、癌と正常部位を x200 視野で 5 か所ずつランダムに採取し、-SMA 染色陽性部分の面積(%)の平均を算出し、染色率と臨床病理学的因子、全生存率、無再発生存率について検討した。

4. 研究成果

胆がん患者(胃癌・大腸癌)血清 adiponectin 濃度の測定

胃癌 150 例、大腸癌 131 例からの血清をもちいて血清 adiponectin 濃度を測定した。平均値は 9.07 μ g/mL (標準偏差 +/-5.4 μ g/mL) であった。とくに胃癌と大腸癌の間では癌腫による差を認めなかった。また、手術後第 1 病日に血清 adiponectin 濃度は減少し、術前値で除した adiponectin 比は 0.78 +/-0.2 であった。

大腸癌患者において高 adiponectin 比となる因子に関する多変量解析を行ったところ、術中出血量と術後第 1 病日の CRP 値が有意な因子として同定された。

Determinant factors of high ADN ratio

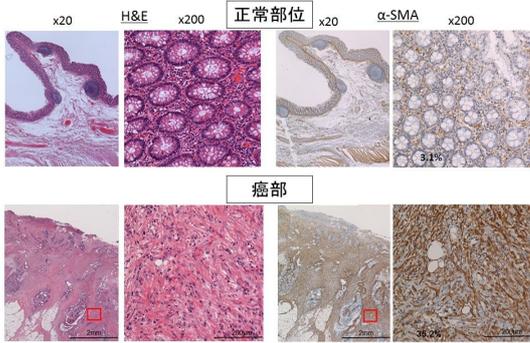
Risk factor	Crude		Multivariable (adjusted)*	
	Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p
Age	0.91 (0.64-1.30)	0.590		
Female vs. male	1.03 (0.49-2.17)	0.937		
BMI	1.08 (0.76-1.55)	0.664		
Diabetes	1.88 (0.78-4.52)	0.159		
Location of cancer				
Rectal vs. colon	5.89 (2.59-13.42)	<0.0001	2.34 (0.58-6.48)	0.102
Others vs. colon	4.55 (0.98-21.03)	0.053	1.84 (0.28-11.96)	0.521
Open surgery	5.43 (2.18-13.49)	0.0003	1.57 (0.54-4.62)	0.411
Blood loss	10.99 (3.83-31.58)	<0.0001	2.09 (0.98-4.46)	0.002
CRP POD1	1.72 (1.18-2.52)	0.005	1.61 (1.03-2.53)	0.039

今回の血清 adiponectin 値に関する知見は、将来的に隣癌など炎症変化の強い癌腫に関する診断や発癌機序を解明する際の一助になる可能性を示唆している。

癌組織の線維化が臨床的因子や予後に与える影響の解析

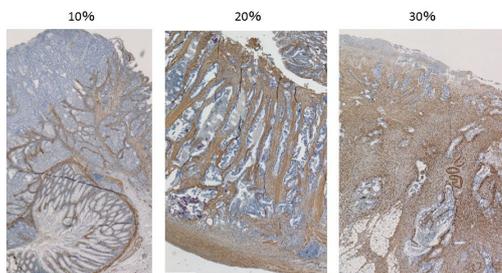
癌部の -SMA 発現率は 15.39%であるのに対し、平常部位は 1.24%と有意に低かった (p<0.01)。

正常および癌部のα-SMA染色



病理学的分化度において、高分化群 (tub1, tub2) が 16.23%であるのに対し、低分化群 (por, sig) が 6.94%と有意に低かった ($p < 0.01$)。

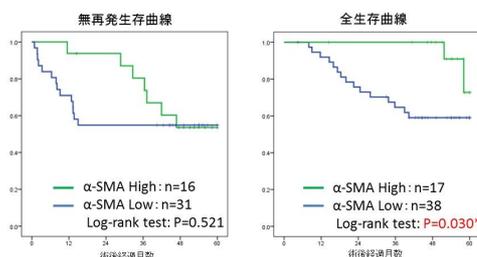
α-SMA発現率



腫瘍中央部における α-SMA の違いで高発現群と低発現群の 2 群に分け検討をおこなった。腫瘍先進部における臨床病理学的因子の検討では α-SMA 高発現群が低発現群と比較して、病理学的リンパ節転移が高度であり (N1/2(UICC 第 7 版)、 $P=0.092$)、再発が多い傾向があったが ($P=0.058$)、有意差のある項目は認めなかった。2 群間における比較検討では、その他の臨床病理学的因子においても有意差を認める項目はなかった。

Log-rank 試験を用いた無再発生存率と全生存率の比較検討では全生存において

α-SMA発現率による生存曲線

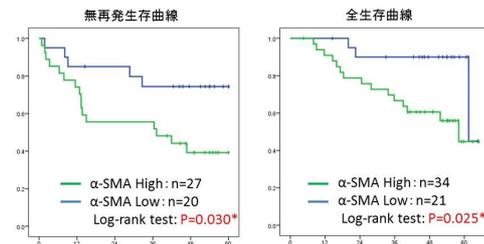


α-SMA 低発現群の方が高発現群より有意に予後が改善した (無再発生存 $p=0.521$ 、全生 $=0.030$)。

一般的に大腸癌をはじめとする腫瘍は heterogeneity を有しており、腫瘍の局在によっても α-SMA 発現率が異なっていた。また、腫瘍の先進部が腫瘍自体の病態を最も反映するという報告が散見されることから、腫瘍先進部での α-SMA 発現率と予後との関連を再度、検討した。しかし、Log-rank 試験を用いた無再発生存率と全生存率の比較検討では無再発生存・全生存ともに α-SMA 低発現群の方が高発現群より有意に予後が改善した (無再発生存 $p=0.030$ 、全生存 $p=0.025$)。

α-SMA の腫瘍先進部における発現率の違いにより、高発現群は予後不良因子であることが判明した (hazard ratio 3.48、95%信頼区間 1.26-9.61、 $p = 0.016$)。

腫瘍先進部のα-SMA発現率による生存曲線



このことは、線維化の著しい膵癌においても同様の現象を確認する意義があることが明らかとなった。

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 1 件)

Yamamoto H, Maeda K, Arima H, Sonoda H, Shimizu T, Mekata E, Kaida S, Yamaguchi T, Murata S, Miura K, Kadowaki M, Tani M Perioperative Adiponectin Measurement is Useful for Prediction of Postoperative Infection in Patients with Colorectal Cancer . Ann Surg Oncol . 2016

Aug;23(Suppl 4):540-545. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

生田大二、三宅亨、徳田彩、植木智之、貝田佐知子、飯田洋也、北村直美、赤堀浩也、山口剛、森毅、園田寛道、清水智治、仲成幸、谷眞至：ヒト大腸癌の組織型と線維化の関連性の検討．第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017.4.27 横浜市

徳田彩、三宅亨、生田大二、清水智治、園田寛道、植木智之、飯田洋也、貝田佐知子、山口剛、谷眞至：大腸癌における上皮間葉系転換 (EMT) の臨床的意義．第117回日本外科学会定期学術集会、2017.4.27 横浜市

〔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

谷 眞至 (TANI, Masaji)
滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：60236677

(2)研究分担者

三宅 亨 (MIYAKE, Toru)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：70581924

山上 裕機 (YAMAUE, Hiroki)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20191190

川井 学 (KAWAI, Manabu)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40398459

岡田 健一 (OKADA, Ken-ichi)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：50407988

廣野 誠子 (HIRONO, Seiko)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：60468288

清水 敦史 (SHIMIZU, Atsushi)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：00637910

宮澤 基樹 (MIYAZAWA, Motoki)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：90549734