

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10709

研究課題名（和文）臨床応用を目指した膵癌の局所進展・神経浸潤に与えるGirdinの作用機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of the Role of Girdin in Pancreatic Cancer Invasion

研究代表者

佐藤 崇文（Sato, Takafumi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：10747257

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：アクチン結合タンパクGirdinは、主に細胞運動に関与していることで知られている。近年では、複数の癌種において、浸潤および転移への関与が報告されている。本研究では、Girdinが膵癌における遊走能および血管新生に深く関与していることが示唆された。また、膵癌における遊走にはEGFシグナルを介したGirdinの活性化が関わっていることも推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は消化器癌の中でも悪性度が極めて高く、既存の治療を行っても5年生存率が20%にも満たない。他の消化器癌では、その進展における分子メカニズムが解明されつつあり、それに対する分子標的治療薬も標準治療となってきたが、膵癌においてははまだ実用化に至っていない。膵癌は特に局所浸潤能が高いことがその悪性度の理由の一つと考えられ、本研究では、細胞運動に関するGirdinの機能解析を中心に行い、膵癌遊走能および血管新生能への関与が示唆された。これにより、Girdinが膵癌の新たな治療ターゲットとなり、膵癌治療におけるブレイクスルーとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Girdin, an actin-binding protein, is known to be mainly involved in cell motility. In recent years, Girdin is reported to involve in cancer invasion and metastasis in multiple carcinomas. This study suggests that Girdin is deeply involved in the cancer migration and angiogenesis in pancreatic cancer. It was also speculated that the migration in pancreatic cancer involves activation of Girdin via the EGF signal.

研究分野：消化器外科

キーワード：Girdin 膵癌 遊走能 血管新生能 VEGF-A

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

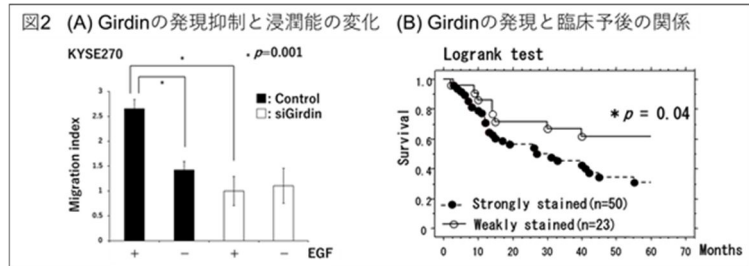
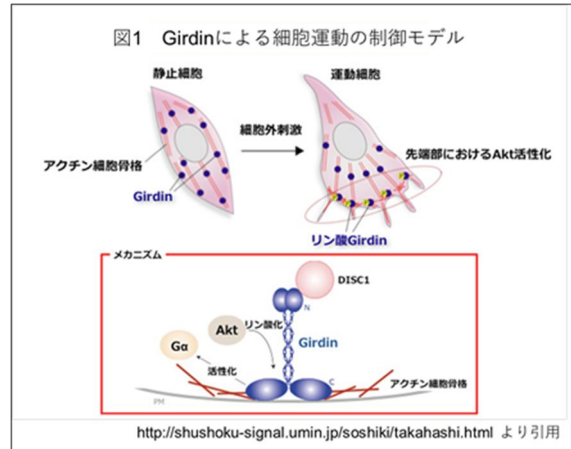
1. 研究開始当初の背景

消化器癌のなかでも膵癌は悪性度が非常に高い。その理由として、膵癌は隣接する主要血管や神経叢に浸潤しやすいことが挙げられ、遠隔転移がないのにも関わらず切除不能となることが多い。

一方、癌原遺伝子 Akt の発現が、様々な癌腫における悪性度に関与していることが報告されているが、そのメカニズムの解明はまだまだ十分とはいえない。Akt の新規基質 Girdin は、細胞運動に強く関連するタンパクとして、2005 年に本邦の高橋らにより同定・報告された¹⁾。Akt により活性化された Girdin は、細胞運動の重要な過程である葉状仮足の形成を誘導している(図1)。

その後、Girdin は様々な癌腫における血管新生や増殖・浸潤および転移に関与していることに加え、臨床的予後との関連も報告されてきた²⁻⁷⁾。当科ではこれまで、食道癌における Girdin の機能解析を行い、Girdin が食道癌の浸潤能に関与すること、ならびに臨床検体の免疫染色において、Girdin 強発現群で有意に予後不良となることを明らかにした⁸⁾(図2)。

しかし、膵癌における報告はいまだ認めておらず、膵癌の浸潤における Girdin の役割を分子生物学的に解明し、膵癌治療の新たなターゲットとして臨床応用を目指す。



Reference:

1. Enomoto A, Takahashi M, et al. Dev Cell. 2005.
2. Kitamura T, et al. Nat Cell Biol. 2008.
3. Jiang P, et al. Cancer Res. 2008.
4. Jun BY, et al. Dis Colon Rectum. 2013.
5. Wang C, et al. Mol Clin Oncol. 2014.
6. Song JY, et al. Oncol Lett. 2014.
7. Nishimae K, et al. Breast Cancer. 2015.
8. Shibata T, Matsuo Y, et al. Oncol Rep. 2013.

2. 研究の目的

膵癌は5年生存率が5%前後と消化器癌の中で最も予後の悪い疾患の一つであり、その治療には難渋することが多い。その原因の一つは、膵癌は遠隔転移がなくても、局所の浸潤だけで容易に切除不能に陥るという点にある。遠隔転移のない膵癌に対する膵切除術の適応は、切断が生命維持に関わるような主要血管(腹腔動脈・総肝動脈・上腸間膜動脈など)に浸潤があるか否かが基準となる。膵は解剖学的にこれらの主要血管と隣接しているため、膵癌は、その強い浸潤性と相まって容易に浸潤してしまう。進行膵癌に対する手術では、その切離断端は膵周囲の主要血管を取り囲む神経叢が主体となるため、膵癌の浸潤、特に神経浸潤機構の解明が重要となってくる。

本研究では、膵癌におけるGirdinの機能を、浸潤能を中心に解析を進め、その分子メカニズムを解明することを主目的とする。これにより、Girdin制御が臨床応用されることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 膵癌臨床検体に対する免疫組織染色

当科にて手術を行った膵癌臨床検体に対しGirdin抗体で免疫染色を行い、膵癌におけるGirdinの発現を検証した。

(2) 膵癌細胞株におけるGirdinの発現解析

各種膵癌細胞株に対し、qRT-PCR法でGirdinの発現を検証した。

(3) Girdinの発現抑制による膵癌遊走能の変化

膵癌細胞株に対し、siRNA法でGirdinを選択的にノックダウンした(siGirdin膵癌細胞株の作成)。Boyden double chamber法を用いてsiGirdin膵癌細胞株における遊走能の変化を検討した。

(4) Girdinは浸潤以外に血管新生にも関与することが報告されている⁹⁾。われわれの膵癌研究グループではこれまでに、膵癌血管新生について研究を重ねており、膵癌の転移能と血管新生能に相関があることを定量的に解明した¹⁰⁾。そのため、膵癌の悪性度を規定する転移能、すなわち血管新生能にもGirdinが関与している可能性を考え、解析を行った。

Girdin の発現抑制に伴う腫瘍由来の血管新生因子の発現変化

siGirdin 膵癌細胞株における血管新生因子 VEGF-A および IL-8 の発現変化を qRT-PCR にて検証した。

Girdin 発現抑制に伴う腫瘍由来の血管新生因子の産生変化

siGirdin 膵癌細胞株の上清を用いて血管新生因子 VEGF-A および IL-8 の産生変化を ELISA で検証した。

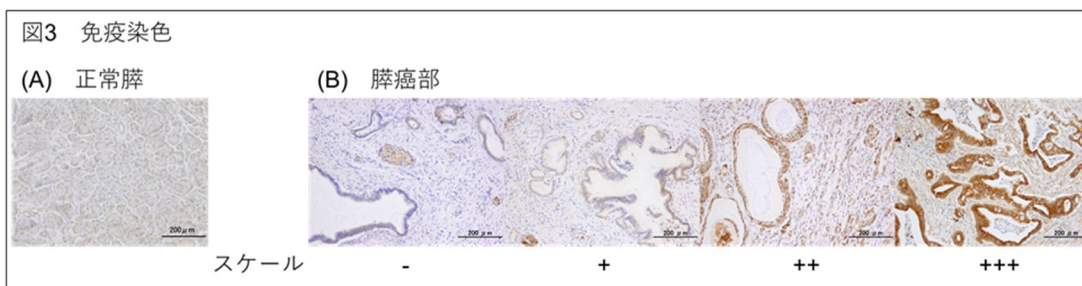
Girdin 発現抑制に伴う血管内皮細胞 (HUVEC) の血管新生能への影響

siGirdin 膵癌細胞株の上清を用いた調整培地で HUVEC を培養し, on matrigel tube formation assay で血管新生能への影響を検証した。

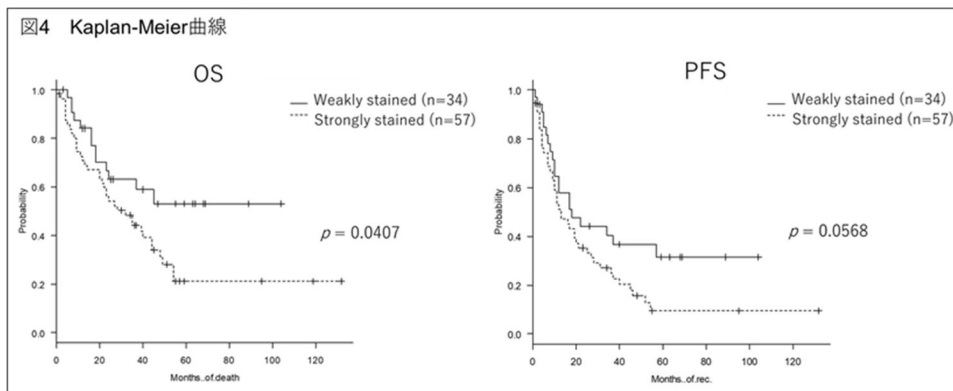
4. 研究成果

(1) 膵癌臨床検体に対する免疫組織染色

当科にて手術を行った膵癌臨床検体 91 例に対し Girdin 抗体で免疫染色を行った。膵正常部と比較して、膵癌部において Girdin の発現が高い傾向を認めた。一方、膵癌において Girdin の染色強度に差を認め、染色強度を 4 段階にスケール化し (-, +, ++, +++), 弱発現群 (-, +), および強発現群 (++, +++) に分類した (図 3)。

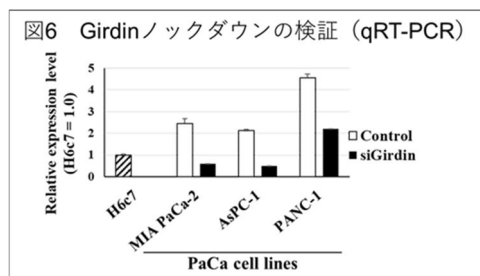
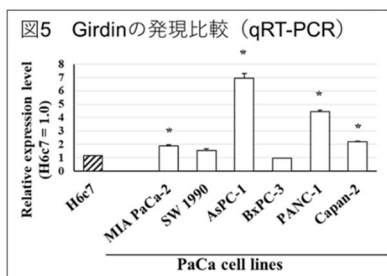


Girdin の発現強度による臨床的予後の変化を Kaplan-Meier 曲線で検討した (Logrank 検定) (図 4)。全生存期間 (OS) においては、Girdin 強発現群で有意に予後が不良であった ($p=0.0407$)。また、無増悪生存期間 (PFS) では、有意差はないものの Girdin 強発現群のほうが予後不良であった ($p=0.0568$)。



(2) 膵癌細胞株における Girdin の発現解析

膵癌細胞株 (MIA PaCa-2, SW 1990, AsPC-1, BxPC-3, PANC-1, Capan-2) を用いて、Girdin の発現を qRT-PCR で検証した。対照として用いた正常膵管上皮細胞株 (HPDE) の H6c7 と比べ、多くの膵癌細胞株において Girdin の発現亢進を認めた (図 5)。そのうち、発現の高い MIA PaCa-2, AsPC-1, PANC-1 に対し実験を進めた。

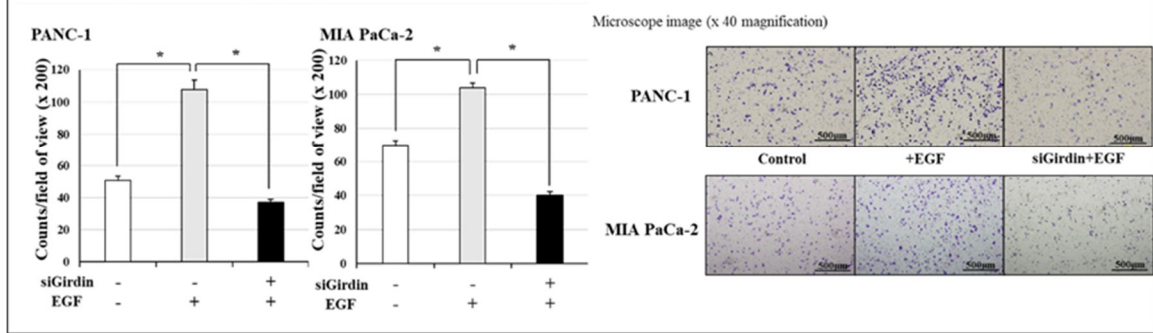


(3) Girdin の発現抑制による膵癌遊走能の変化

膵癌細胞株 (MIA PaCa-2, AsPC-1, PANC-1) に対し、Girdin siRNA をトランスフェクションし、Girdin をノックダウンした (図 6)。

siGirdin 膵癌細胞株を用いて、Boyden double chamber で遊走能の変化を検証した。EGF 投与下 (EGF 0.1ng/mL) で、膵癌遊走能の亢進を認めたが、siGirdin 膵癌細胞株では、EGF 刺激下でも遊走能は抑制された (図 7)。

図7 Migration assay (Boyden double chamber)



(4) 膵癌血管新生における Girdin の役割 (図 8)

Girdin の発現抑制に伴う腫瘍由来の血管新生因子の発現変化

qRT-PCR により, siGirdin 膵癌細胞株における血管新生因子 VEGF-A および IL-8 の発現はいずれの膵癌細胞株においても有意に低下した (図 8A).

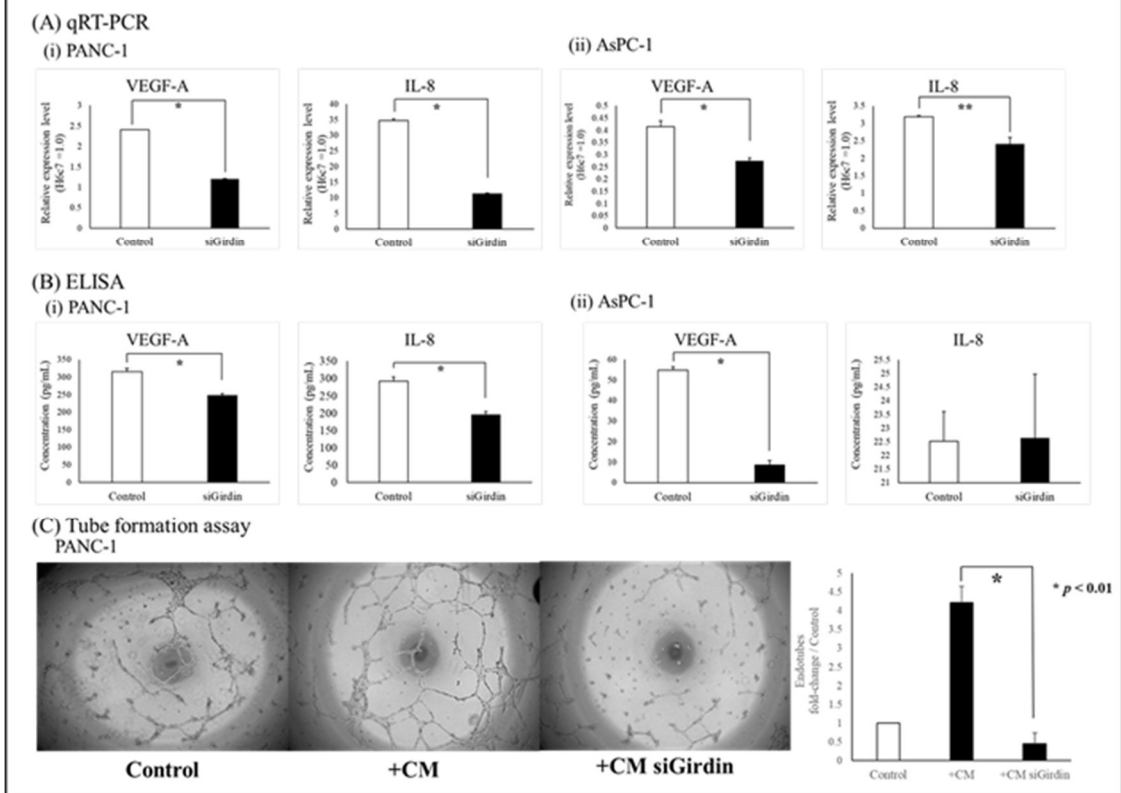
Girdin 発現抑制に伴う腫瘍由来の血管新生因子の産生変化

ELISA では, PANC-1 については, Girdin のノックダウンにより VEGF-A および IL-8 の産生抑制を認めた. 一方, AsPC-1 では, VEGF-A のみ産生抑制を認めたが, IL-8 については差を認めなかった (図 8B).

Girdin 発現抑制に伴う血管内皮細胞 (HUVEC) の血管新生能への影響

PANC-1 を用いた実験では, 細胞上清による調整培地を加えることにより, 管腔形成能の亢進を認めたが, siGirdin 株の上清で作成した調整培地では管腔形成が抑制された (図 8C).

図8 膵癌血管新生におけるGirdinの役割



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林祐一, 松尾洋一, 上田悟郎, 大見関, 今藤裕之, 齊藤健太, 社本智也, 坪井謙, 森本守, 高橋広城, 石黒秀行, 瀧口修司
2. 発表標題 膵癌におけるアクチン結合タンパクGirdinの役割の検討
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林祐一, 松尾洋一, 上田悟郎, 大見関, 今藤裕之, 齊藤健太, 坪井謙, 森本守, 高橋広城, 石黒秀行, 瀧口修司
2. 発表標題 膵血管新生におけるアクチン結合タンパク質Girdinの役割
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林祐一, 松尾洋一, 上田悟郎, 大見関, 今藤裕之, 齊藤健太, 社本智也, 坪井謙, 森本守, 高橋広城, 石黒秀行, 瀧口修司
2. 発表標題 膵癌血管新生におけるアクチン結合蛋白Girdinの役割の検討
3. 学会等名 第16回日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林祐一, 松尾洋一, 前田杏梨, 上田悟郎, 大見関, 今藤裕之, 齊藤健太, 坪井謙, 森本守, 小川了, 高橋広城, 瀧口修司
2. 発表標題 膵癌進展におけるアクチン結合蛋白Girdinの役割の検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林祐一, 松尾洋一, 大場杏梨, 上田悟郎, 大見関, 今藤裕之, 齊藤健太, 坪井謙, 森本守, 小川了, 高橋広城, 瀧口修司
2. 発表標題 肺癌におけるアクチン結合タンパクGirdinの機能解析
3. 学会等名 第40回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 林祐一, 松尾洋一, 前田杏梨, 上田悟郎, 大見関, 今藤裕之, 齊藤健太, 佐藤崇文, 坪井謙, 森本守, 瀧口修司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 飯田橋パピルス	5. 総ページ数 243
3. 書名 分子細胞治療フロンティア	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齊藤 健太 (SAITO Kenta) (10770240)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	松尾 洋一 (MATSUO Yoichi) (40381800)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	今藤 裕之 (IMAFUJI Hiroyuki) (80790641)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	