

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590353
 研究課題名（和文） 胃腸管間質腫瘍(GIST)におけるアンギオポエチンとTIE受容体の発現と作用
 研究課題名（英文） Expression and role of Angiopoietin family and Tie receptors in Gastrointestinal stromal tumor (GIST)
 研究代表者：中山 敏幸（NAKAYAMA TOSHIYUKI）
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：30284673

研究成果の概要：

手術により切除されたヒト GIST（30 例）のパラフィン固定標本を用い、アンギオポエチン (Ang)-1 及び Ang-2 の免疫組織化学染色を行った。Ang-1 は約 68%、Ang-2 は約 84% に発現が認められた。また、アンギオポエチンの特異的受容体である Tie-2 の免疫染色を行い、約 10% 発現が認められた。腫瘍の悪性度、腫瘍サイズや核分裂数等の悪性に関する臨床病理学的指標との関連を検討中である。同時に、比較検討のため、良性腫瘍である消化管に発生した平滑筋腫 17 例、神経鞘腫 6 例にて Ang-1、Ang-2 および Tie-2 の免疫組織化学染色を行い、GIST では、平滑筋腫と比べて Tie-2 発現が有意に低い結果が得られた ($p < 0.001$)。

また、手術切除標本からのヒト GIST 細胞の Primary culture を試行中である。

同時に、ヒト線維芽細胞培養細胞 (TIG109) を用い、Ang-1, 2、Tie-2 の発現と発現量を Western blot 法により検討を行ったところ、Ang-2 と Tie-2 の発現が認められた。現在、アンギオポエチン投与による細胞増殖・分化・浸潤能への影響、アンギオポエチン投与による腫瘍細胞内シグナリング（特に、MAPkinase 系、PI3kinase 系の活性化）への作用の解明、シグナリング阻害剤の効果等の検討を継続中である。

詳細な検討結果をまとめ、研究会等にて報告予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：胃腸管間質腫瘍、アンギオポエチン、TIE 受容体

1. 研究開始当初の背景

胃腸管間質細胞系腫瘍 (Gastrointestinal stromal tumor, GIST) は、近年新たに分類された新しい概念の腫瘍で、消化管を中心に

広く全身の間質に発生する腫瘍である。c-Kit 受容体や CD34 等の過剰発現や遺伝子異常と Tyrosine kinase 活性化の関与が多く報告されているが、基礎的な腫瘍病態は不明の

点が多い。近年提示された化学薬品(STI-571, Gleevec 等)による治療方法の導入とともに、本来は比較的良性とされている腫瘍ではあるが、多くの薬品無効症例や転移・再発等の悪性化症例が報告されていて、新たな治療法の確立とともに病態の解明が急がれる。申請者は、GIST において PTHrP(副甲状腺ホルモン関連蛋白)や Hedgehog 等の増殖関連因子の検討を既に報告し (Scand J Gastroenterol, 2004, World J Gastroenterol, 2006 等) 研究方法は確立している。

また、アンジオポエチンは、当初は血管内皮細胞増殖作用をもつ蛋白として同定され、Tyrosine kinase 膜型受容体である Tie 受容体に特異的に結合し、近年、種々の腫瘍細胞増殖・浸潤・転移への関与が報告されている。申請者は、胃癌におけるアンジオポエチン・Tie の浸潤促進効果に関する基礎的研究をいち早く手掛け、既に報告も行っている (Histopathol, 2004)。アンジオポエチンの受容体 Tie はチロシンキナーゼであり、MAPkinase 系や PI3kinase 系を介した細胞内シグナル伝達系に關与して、悪性腫瘍の浸潤・転移をが引き起こされることが報告されているが、詳細な検討はまだなされていない。アンジオポエチン・Tie の研究は世界的に見ても少数の報告が見られるのみで、今後の研究成果が期待される領域である。

今回申請した GIST におけるアンジオポエチン・Tie の発現と分子機構に関する研究はまだ手掛けられておらず、本研究の成果は他の消化管や他臓器の悪性間質腫瘍の研究にも応用できる有用な結果が得られると考える。アンジオポエチン・Tie の正常組織・細胞における作用機序の解明への努力はいくつかの研究機関で精力的に進められているが、悪性腫瘍における作用の解明を行う研究は世界的に見ても少なく、上記に述べた解析は国外においても報告はなく国際的競争にも十分に対応できるものと考えられる。

2 . 研究の目的

ヒト GIST 手術標本や GIST 培養細胞を用いアンジオポエチンと Tie の発現を検討し、腫瘍細胞の増殖や転移の作用機序を検討する。

Tie 受容体系は、PI3kinase、MAPkinase 系を介し、細胞の増殖、分化、腫瘍の進展等に関与することが既に明らかになっている。GIST において、少数の研究報告が認められるが、その研究は途に就いたばかりであり、不十分である。

今回の研究において、腫瘍細胞内のシグナリングが解明されれば、GIST の増殖を制御し、悪性 GIST の新たな治療方法の開発へ利

用も可能である。

3 . 研究の方法

1 . ヒト GIST パラフィン固定標本を用い、アンジオポエチン(Ang)-1 及び Ang-2 の発現分布を免疫組織化学染色と In situ hybridization にて検討する。同時に、アンジオポエチンの特異的受容体である Tie-1,-2,-4 の免疫染色と In situ hybridization も行い、腫瘍サイズや核分裂数等の悪性に関する臨床病理学的指標との関連を検討する。

2 . ヒト GIST 手術組織および GIST 培養細胞を用い、Ang-1,2,4、Tie-1,2 の発現と発現量を Western blot 法により明らかにし、組織学的特徴や臨床病理学的指標との関連を検討する。

3 . GIST 培養細胞を用い、アンジオポエチン投与による細胞増殖・分化・浸潤能への影響を検討する。

4 . アンジオポエチン投与による腫瘍細胞内シグナリング (特に、MAPkinase 系、PI3kinase 系の活性化) への作用を解明し、シグナリング阻害剤 (Wortmannin, PD98059 等) の効果を検討する。

5 . GIST 培養細胞へのアンジオポエチン投与による腫瘍細胞の増殖・分化・浸潤能に与える影響を検討する。

6 . Tie に対する siRNA を形質移入することで Tie 発現を抑制し、細胞増殖・分化・浸潤能への作用を明らかにする。

7 . ヌードマウスに移植した GIST 培養細胞へのアンジオポエチン投与による腫瘍増殖・浸潤・転移に対する作用、及び、チロシンキナーゼ阻害剤 (STI-571, Gleevec) の効果を検討する。

4 . 研究成果

Ang-1 は約 68%、Ang-2 は約 84% に発現が認められた。また、アンジオポエチンの特異的受容体である Tie-2 の免疫染色を行い、約 10% 発現が認められた。

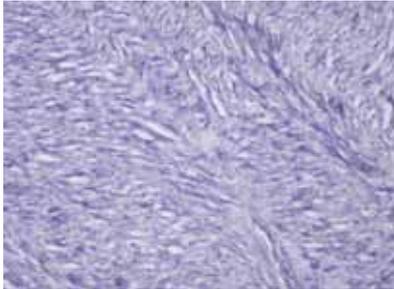
比較検討のため、良性腫瘍である消化管に発生した平滑筋腫 17 例、神経鞘腫 6 例にて Ang-1、Ang-2 および Tie-2 の免疫組織化学染色を行い、GIST では、平滑筋腫と比べて Tie-2 発現が有意に低い結果が得られた ($p < 0.001$)。

ヒト線維芽細胞培養細胞(TIG109)を用い、Ang-1,2、Tie-2 の発現と発現量を Western blot 法により検討を行ったところ、Ang-2 と Tie-2 の発現が認められた。現在、アンジオポエチン投与による細胞増殖・分化・浸潤能への影響、アンジオポエチン投与による腫瘍

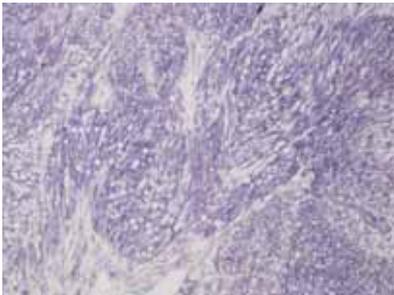
細胞内シグナリング（特に、MAPkinase系、PI3kinase系の活性化）への作用の解明、シグナリング阻害剤の効果等の検討を継続中である。

また、手術切除標本からのヒト GIST 細胞の Primary culture を試行中である。

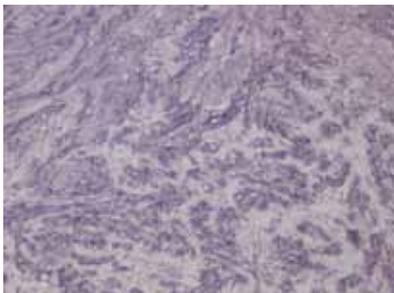
今後、詳細な検討結果をまとめ、研究会等にて報告予定である。



Ang-1



Ang-2



Tie-2

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)

Yoshizaki A, Nakayama T, Naito S, Sekine I. Expression Patterns of Angiopoietin-1, -2, and Tie-2 Receptor in Ulcerative Colitis Support Involvement of the Angiopoietin/Tie Pathway in the Progression of Ulcerative Colitis. Dig Dis Sci. 2008. [Epub ahead of print] (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中山 敏幸 (NAKAYAMA TOSHIYUKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30284673

(2)研究分担者

関根一郎 (SEKINE ICHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60039922

(3)連携研究者