

平成 21年 5月 21日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591597
 研究課題名 (和文) 膵癌における低酸素環境下での網羅的遺伝子解析による
 抗癌剤耐性機序の解明
 研究課題名 (英文) Exhaustive gene analysis on mechanism of resistance for anti-cancer
 agents under hypoxic condition
 研究代表者
 谷 眞至 (TANI MASAJI)
 和歌山県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：60236677

研究成果の概要：

ヒト膵癌株化腫瘍細胞である CIPT1 細胞と MiaPaCa2 細胞を膵癌化学療法標準治療薬である gemcitabine と長期間かつ gemcitabine 濃度を段階的に上昇させることで gemcitabine 耐性の CIPT1 細胞と MiaPaCa2 細胞を作成した。この 2 種類の親株ならびに耐性株を用いて網羅的遺伝子解析を施行したところ、CIPT1 と MiaPaCa2 両方の細胞株で gemcitabine の耐性化とともに発現が変化した遺伝子は FLT1, SMAD3, PDGFB, EGLN1, STAT5B, KCNMA, ATP1B1 であった。

膵癌細胞株が gemcitabine 耐性を獲得するに従い、PDBFB や EGLN1 の遺伝子発現が変化することから、元来、低酸素状態にある膵癌組織が gemcitabine に対する耐性を獲得していくに従い、低酸素環境にも抵抗性を増強させることから、集学的治療の治療効果を減弱させている一因となることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：膵臓

キーワード：膵癌、抗癌剤感受性、耐性、低酸素、網羅的遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

膵癌は世界的にも代表的難治癌の 1 つである。また、膵癌は日本の悪性新生物による死亡原因の第 5 位に位置づけられ、決して稀な疾患ではない。癌治療における生存率の向上には早期診断が有効であることは容易に

想像できるが、残念ながら、膵癌の多くは無症状で進行するため、膵癌の早期診断は困難で、診断時に切除不能進行癌が 60%以上を占め、化学療法または放射線化学療法が主な治療となる。しかし、

膵癌に対する化学療法は以前から 5-FU による標準化学療法であったが、近年、

gemcitabine が進行・再発膵癌に対する標準化学療法になってきた。しかし、5-FU と gemcitabine のアメリカでの比較試験における gemcitabine の奏功率はたかだか 20% 以下で、gemcitabine 群の生存期間中央値も約 5 ヶ月という短いものであり、決して膵癌の予後を改善するには至っていないのが現状である。すなわち、gemcitabine の耐性機序の解明と克服が必要である。

以前から、われわれは種々の消化器悪性腫瘍に対し、MTT を用いた抗癌剤感受性試験を施行してきた。手術時に切除した膵癌の原発巣から単離した腫瘍細胞を 96 時間培養の MTT 法で抗癌剤感受性を測定したところ、単離した膵癌細胞は他の消化器癌と同等の抗癌剤に対する感受性を示すことが判明した (Yamaue H, et al. *Pancreas* 24: 366-372, 2002)。また、膵癌の術後に肝転移で再発することが多いことから、われわれは、膵癌の転移頻度の高い肝臓に対し、術後肝動脈注リザーバーを留置し、肝転移の予防のためにリザーバーからの抗癌剤の動注化学療法を施行した結果、肝転移の頻度が低下した。さらに肝転移の高危険群である門脈浸潤例の予後を有意に改善すること (Yamaue H, et al. *Pancreas* 24: 366-372, 2002) を明らかにした。さらに、われわれは術後の補助化学療法より組織学的に stage IV の進行膵癌でさえ、切除後の予後が改善すること (Tani M, et al. *J Surg Oncol.* 93: 485-490, 2006) を報告した。すなわち、その結果から考察すると、膵癌の細胞自身は抗癌化学療法に必ずしも抵抗性を示さないと考えられる。われわれは抗癌剤に対する感受性は、癌細胞自身が元来保有している特徴のみで規定されるわけではないと考えている。すなわち、もともとの癌細胞自身の抗癌剤に対する感受性も重要であるが、MTT 法による単離した癌細胞が抗癌剤に対する感受性を有していることから、それ以外に、膵癌の局所の環境因子による別の原因で抗癌剤に対する抵抗性が增强しているものと推測される。

一方、膵癌は血管造影検査や経静脈的造影 CT 検査でもわかるように無血管像を示し、他の固形癌と比較しても膵癌の癌組織の血流は乏しく、膵癌原発巣の腫瘍内の酸素分圧も極めて低い。しかし、他の固形癌と異なり、膵癌の原発巣が中心壊死を起こすことはなく、膵癌は低酸素環境下ならびに低栄養下で増殖する能力を獲得している事が予想される。

放射線や抗癌剤の主な作用機序としてフリー・ラジカルを挙げることができるが、低酸素環境下ではフリー・ラジカルの産生が低下していると考えられ、治療効果が乏しいといわれてきた。さらに HIF が vascular endothelial growth factor (VEGF) や

platelet-derived growth factor (PDGF) などの増殖性因子を増強することや HIF 自身が apoptosis を抑制することが報告されており、癌の増殖に深く関与している。

2. 研究の目的

ヒト全遺伝子型 DNA chip を用いて、低酸素濃度でヒト膵癌株化腫瘍細胞を培養し、低酸素環境におけるヒト膵癌株化腫瘍細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、低酸素環境下での、膵癌の放射線療法抵抗性や化学療法抵抗性や予後不良に関わるシグナル伝達経路や遺伝子群を同定する。さらに、gemcitabine 耐性ヒト膵癌株化腫瘍細胞を樹立し、ヒト全遺伝子型 DNA chip を用いて同様に網羅的遺伝子解析を行い、親株と耐性株間で発現変化の認められた遺伝子について検討する。また、gemcitabine 耐性機序と低酸素環境における遺伝子変化とを比較検討し、低酸素で誘導される遺伝子が gemcitabine に対する耐性を誘導する遺伝子と、同じか否かを比較検討する。それぞれから得られた結果の中から、膵癌治療の新たな translational research の候補遺伝子を決定する。

3. 研究の方法

ヒト株化膵癌細胞株としては、抗癌剤感受性試験には CIPT1 と MiaPaCa2 の 2 株を用いた。ヒト膵癌株化腫瘍細胞を用い、gemcitabine 耐性株を樹立する。その方法は、ヒト膵癌株化腫瘍細胞の培養液中に、低濃度の gemcitabine 濃度を添加し、トリパンブルー色素排泄法で生細胞数を測定し、約 1 週間の培養で細胞数が 2 倍以上に増加することが確認できた細胞株を選択する。低濃度の gemcitabine 添加培養液中で増殖可能なヒト膵癌株化腫瘍細胞を、漸次、培養液中の gemcitabine 濃度を増加し同様のトリパンブルー色素排泄法で十分細胞が増殖可能なことを確認し、最終的には 1~2 μ g/ml という高濃度の gemcitabine を添加した状態でも、十分に増殖可能なことを確認する。

gemcitabine に対する感受性は MTT 法にて測定する。すなわち、各種抗癌剤を各種濃度にてヒト膵癌株化腫瘍細胞の培養液中に添加し、96 時間培養後、ヒト膵癌株化腫瘍細胞の succinate dehydrogenase 活性を吸光度計で測定し、各種濃度における細胞増殖抑制率ならびに IC50 を求める。この gemcitabine 添加培養後のヒト膵癌株化腫瘍細胞の IC50 が、親株であるヒト膵癌株化腫瘍細胞の IC50 の 50 倍以上の耐性を有することが確認できた時点で、gemcitabine に対する耐性が獲得で

きたと判断する。さらに、この作成したヒト膵癌株化腫瘍細胞のgemcitabineに対する耐性が、gemcitabine無添加の状態でも獲得耐性が6ヶ月以上持続することを確認し、はじめてgemcitabine耐性株とする。

親株とgemcitabine耐性株を用い、gemcitabine、5-FU、CDDPに対する薬剤感受性をMTT法で検討し、それぞれのIC50を求め、gemcitabine耐性と他の薬剤（この場合は5-FUとCDDP）との間に交差耐性が存在するか否かを確認する。

作成したgemcitabine耐性株、ならびに親株からRNAを抽出し、RT-PCRの手法を用いてcDNAを増幅させる。IVT-Labeling Kitを使い、Biotin-labeled nucleotideを使用してin vitro transcriptionを行う。

FragmentationはビオチンでラベルされたcRNA 20ugを用いる。Fragmentation Buffer 0.5 ug/ulを使用してcRNAを断片化する。バイオアナライザー（アジレント）にて平均100bpのサイズになっていることを確認する。

Affymetrix社製 Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用い、網羅的遺伝子解析を行う。Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayを使う理由としては、このたった1枚のアレイでゲノムワイドな発現を幅広く解析できると考えるからである。その特徴としては 1) 1枚のアレイで、ヒトゲノム転写産物を幅広くカバーすること、2) 特徴が明らかなヒト遺伝子 38,500 個を含む、転写産物およびバリエーション 47,000 個以上の発現レベルを解析できること、3) 含まれるプローブセットは 54,000 以上、異なるオリゴヌクレオチドプローブセル数は 1,300,000 以上であること、4) 1つの転写産物について複数の独立した測定を行うことで、あらゆるマイクロアレイプラットフォームの中で高いレベルの精度と再現性を実現できることなどが挙げられる。

検体から増幅させたcDNAをAffymetrixの推奨プロトコールに従って、17時間hybridizationする。

Fluidics Station(affymetrix社)を使用し、Affymetrixのプロトコールに従いSAPEで染色する。

DNA ChipとハイブリダイゼーションさせたDNA chip Human Genome U133 Plus 2.0 ArrayをFluorometric scanner(Hewlett Packard Gene Array Scanner)にてscanする。読み取ったScan ImageをAffymetrix Gene Chip Operating Softwareにて解析する。同Affymetrix社の発現解析ソフトウェアを使用し、発現の増強・減弱を測定し、引き続きデータの管理等も行うものとする。

親株と耐性株間で発現強度が1.5倍以上の遺伝子群を同定し、上位50位内の遺伝子を明らかにする。2倍以上の発現強度を呈する遺

伝子数が多い場合は、発現強度を2倍、5倍と絞り込んでいくことを計画する。

この2つの上位50位内の遺伝子を比較し、gemcitabine耐性機序と低酸素環境における遺伝子変化の相同性と相違性を明らかにする。また、それらの結果の中から、治療に応用できそうな候補遺伝子を見つけ出す。

gemcitabine耐性ヒト膵癌株化腫瘍細胞の定義として、6ヶ月のgemcitabine無添加培養でも獲得耐性が持続していることとした。gemcitabine耐性ヒト膵癌株化腫瘍細胞を前述の濃度を漸増する方法で作成・樹立する。樹立できた時点で、各種条件下での網羅的遺伝子解析を施行し、異なるものを見つけ出し、どの程度、発現しているかを比較・検討を行い、将来の標的分子となり得るか否かを検討する。

4. 研究成果

(1) Gemcitabine 耐性膵癌細胞株の樹立

膵癌細胞株 CIPT1 の gemcitabine に対する IC50 は 5 ng/ml であった。CIPT1 の gemcitabine に対する 10 倍耐性である CIPT1-G50、100 倍耐性である CIPT1-G500 を樹立することに成功した。また、膵癌細胞株 MiaPaCa2 の gemcitabine に対する IC50 は 30.5 ng/ml であった。MiaPaCa2 の gemcitabine に対する 10 倍耐性である MiaPaCa2-G300、gemcitabine に対する 250 倍耐性である MiaPaCa2-G8000 を樹立することに成功した。

また、ヒト膵癌細胞株 CIPT1、MiaPaCa2 から樹立した gemcitabine 耐性株は 2 株ともに gemcitabine の存在下で安定した培養が継続可能であることを確認した。

(2) Gemcitabine 耐性膵癌腫瘍株に対する網羅的遺伝子発現の結果

ヒト由来膵癌細胞株である CIPT1 と MiaPaCa2 を gemcitabine 濃度を漸増しながら、持続的に gemcitabine と接触させ、gemcitabine に対する耐性株を作成したところ、100 倍以上の耐性を有する細胞株が樹立できた。そこで、これらの細胞株を使って Affymetrix U133Plus 2.0 Array を用い網羅的遺伝子解析を施行し、G0: response to Hypoxia (G00001666) を持つ遺伝子群である 143 遺伝子の発現を比較検討した。

CIPT1 細胞では感受性の低下とともに発現が低下した遺伝子は BNIP3 FLT1 CDC24A ERCC3 GABAT HMOX2 LIPA NOL3 NR4A2 PKCQ PLGF PLOD2 PPIA1 RAF1 XRCC1 であった。感受性の低下とともに発現が増加した遺伝子は HSP90B1

EP300 HIF1A SERPINA1 SMAD3 STAT5B ALAS2 ATP1B1 CCTD CG12598 ECE1 GRP170 HSPG2 INSP3R1 MB MMP13 PLIC1 RYR1 SCNN1B SCNN1G SOD2 TGFB3 であった。一方、gemcitabine 耐性株で発現が低下した遺伝子は BNIP3 CASP1 CXCR4 EDN1 ADA PLOD1 PAK1 PDGFA FLT1 ASL DCP1 HSP60 LDHA CDC24A ERCC3 GABAT HMOX2 NOL3 NR4A2 PKCQ PLGF PLOD2 RAF1 XRCC1 であった。gemcitabine 耐性株で発現が増加した遺伝子は ARNT2 CREBBP HSP90B1 EP300 HIF1A VEGF SERPINA1 BCL2 PDGFB EGLN1 SMAD3 STAT5B TGFB2 PLAT PLAU ACTN4 ADM BIRC2 CAV1 DAP3 IGFBP1 ITGA2 KCNMA CITED2 NF1 ALAS2 ATP1B1 CCTD CG12598 ECE1 GRP170 HSPG2 INSP3R1 MB MMP13 PLIC1 RYR1 SCNN1B SCNN1G SOD2 TGFB3 であった。

次に、MiaPaCa2 細胞では、感受性の低下とともに発現が低下した遺伝子は PRKAA1 HIF1A FLT1 ADM CCTD ERCC3 HSP60 INSP3R1 DDIT4 TACE VLDLR であった。感受性の低下とともに発現が増加した遺伝子は EGLN2 EPAS1 CXCR4 SMAD3 ACTN4 CAV1 CNP LDHA MEN1 CITED2 NF1 SDCBP であった。

一方、gemcitabine 耐性株で発現が低下した遺伝子は PRKAA1 HSP90B1 HIF1A VEGF SERPINA1 SMAD4 FLT1 ALS2 ECE1 GRP170 HMOX1 HMOX2 PPAR PRSS15 ADM CCTD ERCC3 HSP60 INSP3R1 DDIT4 TACE VLDLR であった。gemcitabine 耐性株で発現が増加した遺伝子は EGLN2 EP300 EPAS1 ALDOA CXCR4 EDN1 PDGFB EGLN1 SMAD3 MMP14 STAT5B PAK1 AHCY ASL ATP1B1 KCNMA PDE5 PLGF RAF1 SMAD8 XRCC1 であった。

以上の結果から、CIPT1 と MiaPaCa2 両方の細胞株で gemcitabine の耐性化とともに発現が変化した遺伝子は FLT1, SMAD3, PDGFB, EGLN1, STAT5B, KCNMA, ATP1B1 であった。SMAD3, PDGFB, EGLN1, STAT5B, KCNMA, ATP1B1, FLT1 (fms-related tyrosine kinase 1): VEGFR1 では増強が見られ、発現が減弱した遺伝子は FLT1 であった。膵癌細胞株が gemcitabine 耐性を獲得するに従い、HIF-1 α の下流で血管新生を促進する PDGFB や分解を調節する EGLN1 の遺伝子発現が変化することから、元来、低酸素状態にある膵癌組織が gemcitabine に対する耐性を獲得していくに従い、低酸素環境にもさらなる抵抗性をも増強させることから、化学療法だけでなく放射線療法なども含めた集学的治療の治療効果を減弱させている一因となることが判明した。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①伊奈志乃美、谷 眞至、川井 学、廣野誠子、藤田洋一、内山和久、山上裕機 膵癌の網羅的遺伝子発現プロファイリングによる gemcitabine 感受性規定遺伝子の同定 第 108 回日本外科学会、2008 年 5 月

②伊奈志乃美、山上裕機、谷 眞至、川井 学、廣野誠子 膵癌細胞株の包括遺伝子発現プロファイリングによる gemcitabine 感受性規定遺伝子の同定 第 45 回日本癌治療学会、2007 年 10 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 眞至 (TANI MASAJI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60236677

(2) 研究分担者

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

岩橋 誠 (IWAHASHI MAKOTO)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70244738

川井 学 (KAWAI MANABU)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40398459

(3) 連携研究者

なし