

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591011

研究課題名(和文) アディポネクチンを用いた膵癌のリスク因子解析および新規治療法開発

研究課題名(英文) study on pancreatic cancer using adiponectin: risk factor analysis and development of new treatment

研究代表者

渡部 健二 (Kenji, WATABE)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50379244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：わが国では、毎年3万人以上が膵臓がんで亡くなり、その診断と治療はいまだに難しいことが知られています。膵臓がんを起こす危険因子の1つに肥満が知られていますが、この研究では内臓脂肪から分泌されるアディポネクチンと呼ばれる物質に注目し、膵臓がんとの関係を調べました。

マウスを用いた実験により、アディポネクチンが血液中に存在しないと膵臓がんの成長が早まることを明らかにしました。この理由として、アディポネクチンが一部の膵臓がん細胞にアポトーシスと呼ばれる細胞死を引き起こして、膵臓がんの成長を抑えている可能性が考えられました。

研究成果の概要(英文)：In Japan, more than 30,000 people die from pancreatic cancer. Obesity is a risk factor for the development and growth of pancreatic cancer. The mechanisms underlying the association between obesity and pancreatic cancer have been investigated through hormonal, inflammatory and immunological changes in obesity. Adiponectin is an adipose tissue-derived secretory hormone. In this study, we investigated the role of adiponectin in the growth of pancreatic cancer.

We examined the effect of adiponectin on the growth of Pan02 murine pancreatic cancer cells using recombinant adiponectin and adiponectin knockout mice. The in vitro treatment of Pan02 cells with adiponectin inhibited cellular proliferation that was accompanied by increased apoptosis. Transplantation of Pan02 cells into the pancreas of knockout mice resulted in a larger tumor volume with fewer apoptotic cells compared with wild type mice. The results indicate that adiponectin directly suppresses the proliferation of Pan02 cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵臓癌 肥満 内臓脂肪 アディポネクチン アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

膵癌と肥満の関係が注目されている。肥満は膵癌の発症におけるリスク因子であり、予後悪化因子でもあることを示す報告が相次ぎ、その分子機序を明らかにしようという機運が高まりつつある。

生活習慣病の代表に、過栄養、高脂肪食、運動不足を背景に様々な代謝異常症を合併するメタボリックシンドロームが挙げられる。その主因は肥満であるが、病態形成の中心に位置するのは内臓脂肪から分泌されるアディポサイトカインである。我々はその代表的分子であり唯一の善玉アディポサイトカインであるアディポネクチンに注目し、消化器におけるアディポネクチンの抗炎症効果や抗腫瘍効果を系統的に解析してきた。

我々はアディポネクチンの欠損が急性および慢性の膵炎の発症を強めることを明らかにし、その機序として膵内線維化の亢進、活性型膵星細胞の増加を示した。興味深いことに、これらの機序はいずれも膵癌の発生、進展に関わることが報告されており、アディポネクチンの欠損は膵炎のみならず膵癌の発生、進展にも関与する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

アディポネクチンが膵癌の進展および予後に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

1) マウス膵癌同所性移植モデルにおけるアディポネクチンの役割

膵癌細胞株をアディポネクチンノックアウトマウスの膵臓に同所性移植し、腫瘍の成長を対照マウスと比較する。成長した膵腫瘍を摘出し、癌細胞の増殖能とアポトーシス、線維化の程度、活性型膵星細胞数を検討する。その他、アディポネクチンの腫瘍における関与が知られる血管新生、マクロファージ浸潤についても検討する。

2) 膵癌細胞に対するアディポネクチン作用  
膵癌細胞株を用いてアディポネクチンが細胞増殖能およびアポトーシスに及ぼす作用を検討し、その分子機序を解析する。

3) 膵星細胞に対するアディポネクチン作用  
膵線維化に関わる膵星細胞を用いてアディポネクチンが細胞増殖に及ぼす影響を検討する。膵星細胞の分泌する因子が膵癌細胞の増殖能に及ぼす影響、それに対するアディポネクチンの作用を検討する。

4) ヒト臨床研究

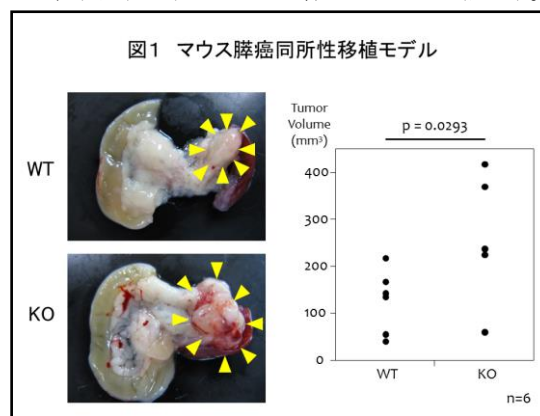
膵癌の患者を対象として、内臓脂肪が膵癌の予後因子であるか検討する。

4. 研究成果

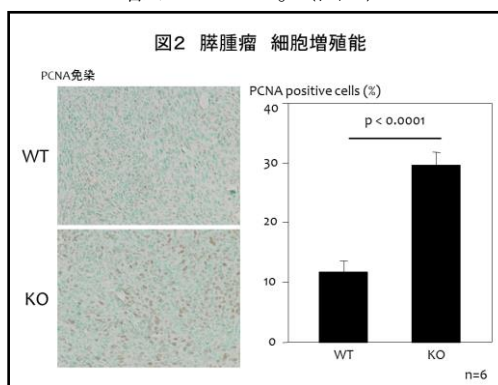
1) マウス膵癌同所性移植モデルにおけるアディポネクチンの役割

膵癌細胞 PAN02 を膵臓尾部に接種し、5週間後に膵臓を評価した。アディポネクチンノックアウトマウス (KO) で形成された腫瘍

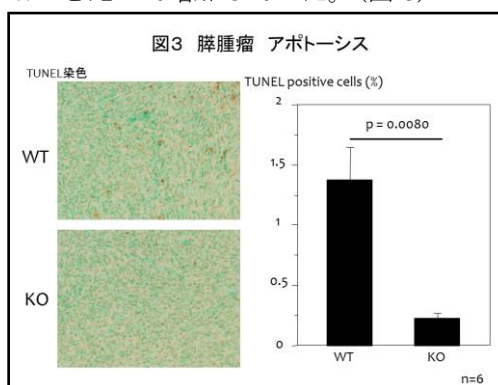
は、対照 (WT) と比べて増大していた (図 1)。



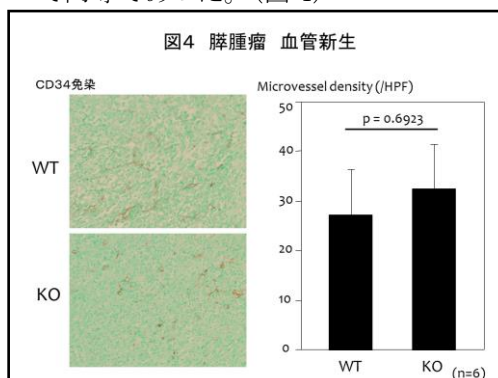
次に、腫瘍を摘出して組織学的な検討を行った。細胞増殖能を PCNA 免疫染色で検討すると、KO の腫瘍における PCNA 陽性細胞数は WT と比べて増加していた。(図 2)



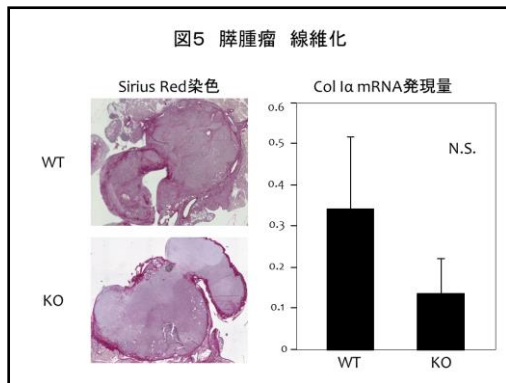
アポトーシスを TUNEL 染色で検討すると、KO の腫瘍における TUNEL 陽性細胞数は WT と比べて増加していた。(図 3)



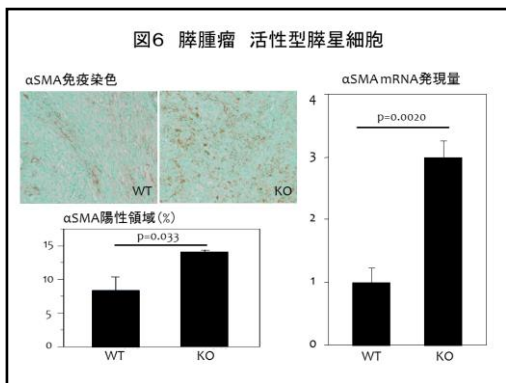
血管新生を CD34 免疫染色で検討すると、KO の腫瘍における CD34 陽性細胞密度は WT と比べて同等であった。(図 4)



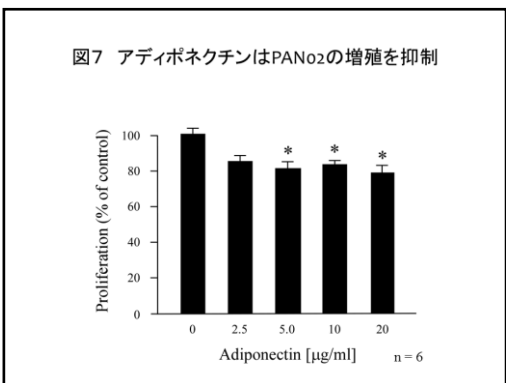
線維化をシリウスレッド染色および I 型コラーゲン mRNA 発現量で検討したが、KO の腫瘍における線維化は WT と比べて同等であった。(図 5)



活性型膵星細胞を  $\alpha$ SMA の免疫染色および mRNA 発現量で検討すると、KO の腫瘍における活性型膵星細胞数は WT と比べて増加していた。(図 6)



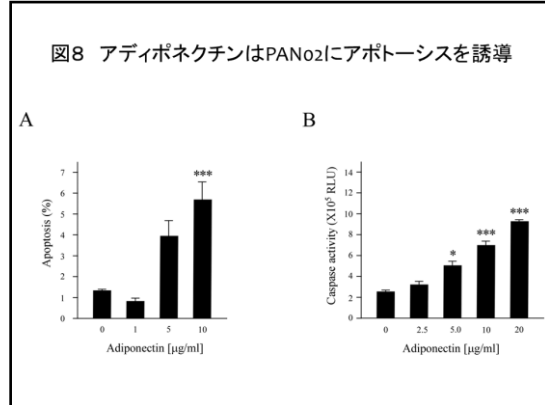
2) 膵癌細胞に対するアディポネクチン作用  
細胞培養条件下でマウス膵癌細胞 PAN02 にアディポネクチン受容体 1,2 が発現していることを確認した(データ省略)。アディポネクチンが細胞増殖に及ぼす影響を WST アッセイで検討した。アディポネクチンは  $5 \mu\text{g/ml}$  以上の濃度で PAN02 の細胞増殖を抑制した(図 7,  $*p < 0.05$ )。



一方、ヒト膵癌細胞株 BxPC3 で同様の検討を行ったが、アディポネクチンは増殖抑制効果を示さなかった(データ省略)。

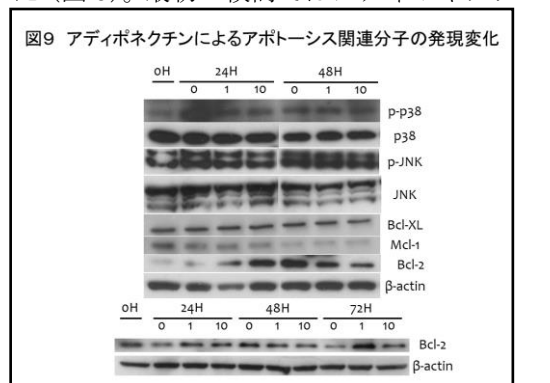
アディポネクチンが PAN02 の増殖を抑制する機序としてアポトーシスの関与を検討するために、アネキシン V 陽性細胞数およびカスパーゼ活性を測定した。アネキシン V 細

胞数はアディポネクチン濃度  $10 \mu\text{g/ml}$  以上で増加し(図 8A,  $*** p < 0.001$ )、カスパーゼ活性はアディポネクチン濃度  $5 \mu\text{g/ml}$  以上で増加した(図 8B,  $* p < 0.05$ ,  $*** p < 0.001$ )。



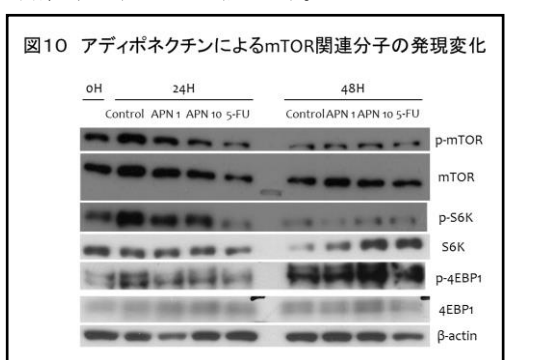
肝癌細胞株を対象とした他の研究者の発表によれば、アディポネクチンはサイクリン D1、PCNA の発現を抑制する。我々も PAN02 で検討を行ったが、アディポネクチンによる同遺伝子の発現抑制効果を認めなかった(データ省略)。

アディポネクチンが PAN02 の細胞内シグナルに及ぼす影響を検討するために、アポトーシス関連分子として p38, JNK, bcl-XL, mcl-1, bcl-2 のウエスタンブロットで解析した(図 9)。最初の検討ではアディポネクチン

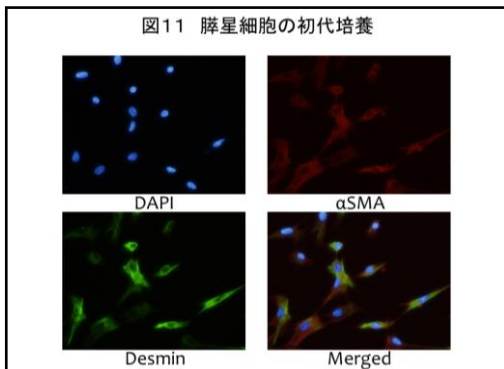


が bcl-2 の発現を誘導する結果が得られたが、再現性は得られなかった。結論として、アディポネクチンは今回検討したアポトーシス関連分子の発現に変化を与えなかった。

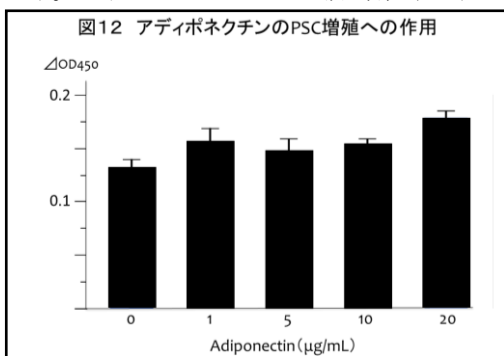
肝癌細胞を対象とした他の研究者の発表によれば、アディポネクチンは mTOR のリン酸化を抑制する。我々も PAN02 で検討した結果、軽度ながらも mTOR のリン酸化抑制効果を認めた(図 10)。



3) 膵星細胞に対するアディポネクチン作用  
マウス膵組織をコラゲナーゼ処理して、膵星細胞 (PSC) の初代培養を行った (図 11)。

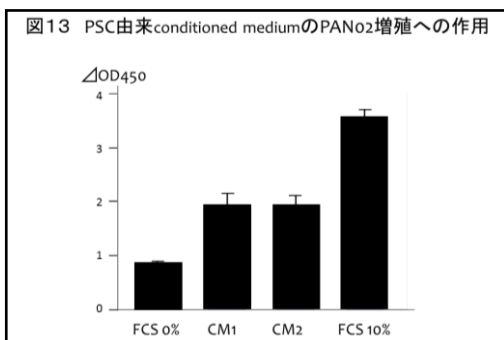


アディポネクチンの PSC 増殖への影響を検討すると、増殖抑制効果を認めなかった (図 12)。同様にアポトーシス誘導効果も認めな



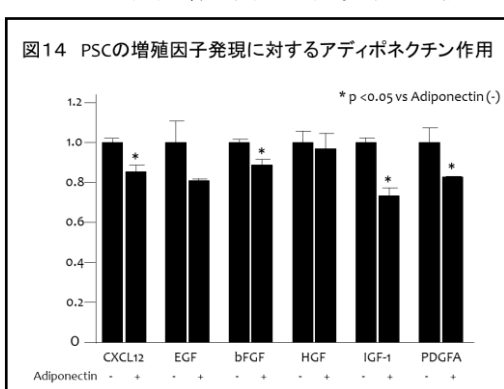
かった (データ省略)。

PSC の膵癌細胞増殖に対する影響を調べるために、PSC の conditioned medium (CM) が PAN02 の増殖に対する作用を WST アッセイで検討した (図 13)。PSC は血清なしで



も増殖するが、CM で培養すると血清なしと比べて 2 倍以上の増殖効果を示した。

PSC は各種増殖因子を発現する (図 14)

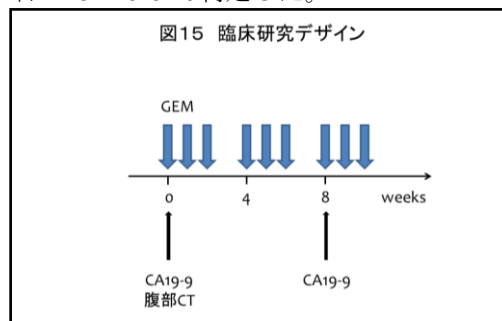


が、アディポネクチンがそれら増殖因子の発現に及ぼす影響を検討すると、一部の増殖因子の発現を抑制することが明らかになった。

#### 4) ヒト臨床研究

アディポネクチンと膵癌の関係を明らかにする疫学研究は、膵癌の発症リスク因子の解析ですでに論文報告されているが、治療の予後因子の解析はまだ報告されていない。そこで、事前調査として内臓脂肪が治療の予後因子であるか検討した。

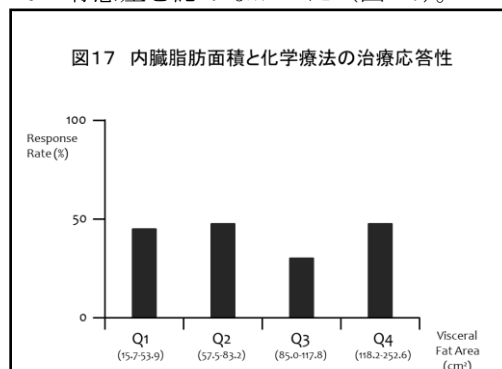
スタディデザインを図 15 に示す。治療内容はゲムシタピンによる化学療法、内臓脂肪はファットスキャンで計測、治療効果は 8 週目の CA19-9 で判定した。



大阪大学医学部附属病院で 2001 年から 2012 年までに膵癌の化学療法を受けた 108 名でこの基準を満たすのは 82 名であった。CA19-9 が半分以下に減少したときに奏功 (responder) と判定すると、responder は 36 名、non-responder は 46 名であった。responder と non-responder で内臓脂肪面積および皮下脂肪面積を比較するとほぼ同等で、有意差を認めなかった (図 16)。

	Responder (N=36)	Non-responder (N=46)
Visceral Fat Area (cm <sup>2</sup> )	92.3 ± 9.4	91.1 ± 6.4 (p = 0.91 vs Responder)
Subcut Fat Area (cm <sup>2</sup> )	94.1 ± 6.7	90.9 ± 6.7 (p = 0.74 vs Responder)

内臓脂肪面積に基づき患者を 4 群に分けてそれぞれの化学療法応答性を検討すると群間での有意差を認めなかった (図 17)。



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 6 件)

(1) Yamamoto S, Watabe K et al. Protective role of adiponectin against ethanol-induced gastric injury in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012;302:G773-780.

(2) Hamano M, Kamada Y, Kiso S, Furuta K, Kizu T, Chatani N, Egawa M, Takemura T, Ezaki H, Yoshida Y, Watabe K et al. Adiponectin negatively correlates with alcoholic and non-alcoholic liver dysfunction: Health checkup study of Japanese men. Hepatol Res. 2013;43:238-248.

(3) Yoshimoto K, Yamada K, Watabe K et al. Gastric contraction imaging system using a 3-D endoscope. IEEE Journal of Translational Engineering in Health and Medicine 2014;2: 1800208-1800215.

(4) Kato M, Watabe K et al. Adiponectin inhibits murine pancreatic cancer growth. Dig Dis Sci. 2014;59:1192-1196.

(5) Akasaka T, Tsujii M et al. 5-FU resistance abrogates the amplified cytotoxic effects induced by inhibiting checkpoint kinase 1 in p53-mutated colon cancer cells. Int J Oncol. 2015;46:63-70.

(6) Ying J, Tsujii M et al. The effectiveness of an anti-human IL-6 receptor monoclonal antibody combined with chemotherapy to target colon cancer stem-like cells. Int J Oncol. 2015;46:1551-1559.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡部健二 (WATABE KENJI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 50379244

(2)研究分担者

辻井正彦 (TSUJII MASAHIKO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 40303937

木曾真一 (KISO SHINNICHI)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号 : 40335352

(3)連携研究者

なし