

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19947

研究課題名(和文) 臨床応用を目的とした膵癌リンパ管新生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of pancreatic cancer lymphangiogenesis

研究代表者

齊藤 健太 (Saito, Kenta)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10770240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌のリンパ節転移メカニズムの解明を目的に以下の研究を行った。膵癌細胞株を VEGF-C 強発現株と VEGF-C 低発現株に分類した。VEGF-C 強発現株は VEGF-C 低発現株にくらべてリンパ管内皮細胞の浸潤能と管腔形成能を亢進した。また、K-ras mutation に着目して検討したところ、K-ras wild よりも K-ras mutation の膵癌細胞株でリンパ管新生能が高かった。これらは VEGF-C/VEGF-R3 (VEGF-C のレセプター) シグナルの抑制により低下し、このシグナルの膵癌リンパ管新生への関与と新たな治療ターゲットへの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism of lymph node metastasis of pancreatic cancer (PaCa), the following study was conducted. Pancreatic cancer cell lines were classified into VEGF-C strong expression strains and VEGF-C low expression strains. PaCa with high VEGF-C enhanced the invasive ability and tube formation of lymphatic endothelial cells compared with PaCa with weak VEGF-C. In addition, focusing on K-ras mutation, PaCa with K-ras mutation showed higher lymphangiogenesis potential than K-ras wild. The suppression of VEGF-C / VEGF-R3 (VEGF-C receptor) signal reduced the enhanced lymphangiogenesis by PaCa. So these results suggested that this signal may contribute to PaCa lymphangiogenesis and might become a new therapeutic target.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 リンパ管新生 K-ras mutation , VEGF-C

1. 研究開始当初の背景

膵癌は消化器癌の中で最も予後の悪い癌であり、その予後規定因子にはリンパ節転移、肝転移、神経浸潤がある。当教室では現在までに膵癌の予後向上を目的に臨床的、基礎的研究を継続して行ってきた。しかしリンパ節転移機構に関する分子生物学的解析はいまだ十分ではない。その理由として、

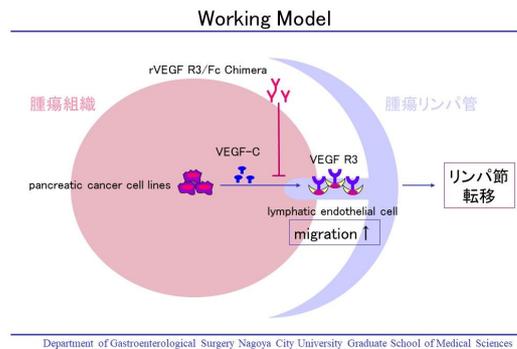
(1) リンパ管内皮細胞の分離培養法が確立されていなかった。

(2) 免疫染色で用いる抗リンパ管内皮細胞抗体の特異性が必ずしも高くなかった。などがあげられる。

近年、リンパ管内皮細胞の分離継代培養が可能になり、VEGF-C や VEGF-D といったリンパ管新生増殖因子も同定された。また、リンパ管内皮細胞に特異性の高い抗体も確立された。

2. 研究の目的

上記の背景をもとにリンパ節転移能の異なる膵癌細胞株の分子生物学的特徴を検討し、そこに関わる既知及び未知の因子の同定およびその抑制による抗体や分子標的薬剤を使用した抗リンパ節転移治療の確立を目的とした。



3. 研究の方法

(1) リンパ管新生因子の発現の検討

膵癌細胞株における VEGF-C の発現を real time RT-PCR、Western blotting (WB) ELISA で検討する。

上記により、リンパ管新生促進因子高産生株と低産生株に分類する。

(2) 膵癌細胞によるリンパ管新生能 (増殖能・遊走能・毛細管形成能) の検討

リンパ管内皮細胞の増殖能の検討

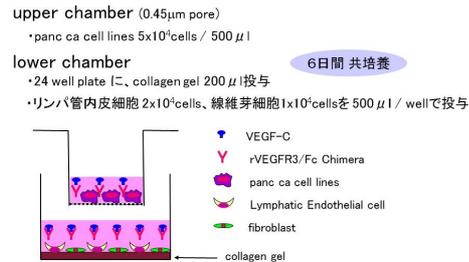
WST-1 Assay を用いて、rVEGF-C 刺激によるリンパ管内皮細胞の増殖試験を施行する。

リンパ管内皮細胞の遊走能の検討

double chamber 法を用いて、rVEGF-C 刺激によるリンパ管内皮細胞の遊走能亢進を確認する。さらにリンパ管内皮細胞を、膵癌細胞株の培養上清を用いて作成した調整培地で刺激、あるいは膵癌細胞と共培養することにより腫瘍由来 VEGF-C で刺激し、リンパ管内皮細胞の遊走能の変化を比較検討する。

リンパ管内皮細胞の毛細管形成能の検討
リンパ管内皮細胞と線維芽細胞を共培養し、rVEGF-C および腫瘍由来 VEGF-C で刺激し、リンパ管内皮細胞の毛細管形成能を比較検討する。この方法により、生体内により近い環境で癌-間質相互作用を含めたリンパ管新生能が定量比較できる。

LEC/fibroblast co-culture system (panc. ca.)



Department of Gastroenterological Surgery Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

(3) K-Ras 癌遺伝子の活性化とリンパ管新生刺激因子産生との関連の検討

Kras mutation 膵癌細胞株と Kras wild 膵癌細胞株でリンパ管新生能の差異を前述の方法で検討した。

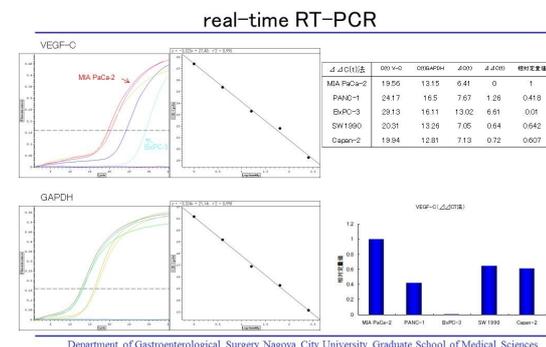
(4) VEGF-C/VEGF-R3 (VEGF-C のレセプター) シグナルの関与

VEGF-C/VEGF-R3 シグナルの関与を検討するために、rVEGF-R3 を用いてこのシグナルの抑制を行い、リンパ管新生能の変化を検討した。

4. 研究成果

(1)

膵癌細胞株を定量 PCR を用いて VEGF-C の mRNA 発現量の差異を比較検討し、同様に膵癌細胞株の培養上清を用いて ELISA で VEGF-C 蛋白の発現量の差異を検討した。これらより、膵癌細胞株を VEGF-C 強発現株 (PaCa-VEGFC-S) と低発現株 (PaCa-VEGFC-W) に分類した。



Department of Gastroenterological Surgery Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

(2)

膵癌細胞株とリンパ管上皮細胞、線維芽細胞を double chamber を用いて約 2 週間共培養し、また、リンパ管上皮細胞に特異的に反応する podoplanin 抗体を用いてリンパ管上皮

細胞を染色し、リンパ管上皮細胞の管腔形成を比較した。PaCa-VEGFC-W に比べ PaCa-VEGFC-S との共培養で、リンパ管新生は亢進していることが確認できた。また、VEGF-C/VEGF-R3 (VEGF-C のレセプター) シグナルの抑制は膵癌由来のリンパ管新生を抑制した。

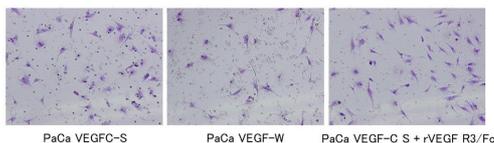
Capillary formation (panc. ca.)



Department of Gastroenterological Surgery Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

同様にリンパ管内皮細胞の遊走能に対する PaCa VEGF-S と PaCa VEGF-W の作用を比較したところ、PaCa VEGF-S の作用が高いことが確認できた。またこれは rVEGF R3 による VEGF-C/VEGF-R3 シグナルの抑制により低下した。

Migration Assay (Sup) 100x



Department of Gastroenterological Surgery Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

(4) 同様に K-ras mutation を認める膵癌細胞株は、K-ras wild の膵癌細胞株よりも有意にリンパ管内皮細胞の管腔形成能を亢進した。VEGF-C/VEGF-R3 (VEGF-C のレセプター) シグナルの抑制はこの K-ras mutation を認める膵癌細胞株由来のリンパ管新生を抑制した。

以上の結果より、この VEGF-C/VEGF-R3 シグナルの膵癌血管新生への関与と新たな治療ターゲットへの可能性が示唆された。

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5件)

Saito Kenta, Matsuo Yoichi, Imafuji Hiroyuki, Okubo Tomotaka, Maeda Yuzo,

Sato Takafumi, Shamoto Tomoya, Tsuboi Ken, Morimoto Mamoru, Takahashi Hiroki, Ishiguro Hideyuki, Takiguchi Shuji Xanthohumol inhibits angiogenesis by suppressing nuclear factor- B activation in pancreatic cancer. Cancer Science 査読有 2017年 109:132-140

松尾洋一, 森本守, 坪井謙, 社本智也, 齋藤健太, 今藤裕之, 林祐一, 上田悟郎, 小林勝正, 高橋広城, 石黒秀行, 瀧口修司 化学療法抵抗性膵癌における CXCL12-CXCR4 シグナルの重要性 肝胆膵 査読無 2017年 75:777-783

松尾洋一, 社本智也, 森本守, 坪井謙, 佐藤崇文, 齋藤健太, 今藤裕之, 竹山廣光 Natural food を科学する ~ Zerubone の膵癌に対する化学予防と抗腫瘍効果 栄養-Trends of Nutrition- 査読無 2016年 1:16-19

Morimoto M, Matsuo Y, Koide S, Tsuboi K, Shamoto T, Sato T, Saito K, Takahashi H, Takeyama H. Enhancement of the CXCL12/CXCR4 axis due to acquisition of gemcitabine resistance in pancreatic cancer: effect of CXCR4 antagonists. BMC Cancer 査読有 2016年 16:1-13

齋藤健太, 竹山廣光 再発・合併症のない手術手技 TAPP 法 消化器外科 査読無 2016年 39:449-457

〔学会発表〕(計12件)

松尾洋一, 森本守, 坪井謙, 社本智也, 佐藤崇文, 齋藤健太, 今藤裕之, 高橋広城, 石黒秀行, 瀧口修司 膵癌肝転移能に関わる血管新生の役割とサイトカインネットワーク 第26回日本がん転移学会 学術集会・総会 グランキューブ大阪 大阪府立国際会議場(大阪府大阪市) 2017年7月27日 - 2017年7月28日

齋藤健太, 松尾洋一, 森本守, 坪井謙, 社本智也, 佐藤崇文, 大久保友貴, 前田祐三, 今藤裕之, 竹山廣光 Xanthohumol の膵癌細胞株における NF B シグナルを介した抗腫瘍効果に対する検討 第72回日本消化器外科学会総会 石川県立音楽堂ほか(石川県金沢市) 2017年7月20日 - 2017年7月22日

松尾洋一, 森本守, 佐藤崇文, 齋藤健太, 今藤裕之, 坪井謙, 社本智也, 坂本宣弘, 石黒秀行, 高橋広城, 竹山廣光 膵癌における血管新生因子発現に関する IGF-1 シグナルの役割 第48回日本膵臓学会大

会 京都市勧業館みやこめっせ（京都市）2017年7月14日 - 2017年7月15日

松尾洋一，今藤裕之，齊藤健太，佐藤崇文，坪井謙，社本智也，森本守，高橋広城，石黒秀行，竹山廣光 膵癌の early biomarker としての Lipocalin-2 の役割とシグナルの解明 第 117 回日本外科学会定期学術集会 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2017年4月27日 - 2017年4月29日

松尾洋一，今藤裕之，齊藤健太，佐藤崇文，坪井謙，社本智也，森本守，小出修司，竹山廣光 ケモカインを標的とした Gemcitabine に続く次世代膵癌治療薬の開発 第 103 回日本消化器病学会総会 京王プラザ（東京都新宿区）2017年4月20日 - 2017年4月22日

松尾洋一，森本守，坪井謙，社本智也，佐藤崇文，齊藤健太，高橋広城，石黒秀行，若杉健弘，坂本宣弘，田中達也，佐川弘之，寺下幸夫，竹山廣光 膵癌血管新生における Gro の役割 第 14 回日本消化器外科学会大会 神戸コンベンションセンター（兵庫県神戸市）2016年11月3日 - 2016年11月6日

松尾洋一，森本守，小出修司，齊藤健太，佐藤崇文，坪井謙，社本智也，高橋広城，竹山廣光 Gemcitabine 耐性に伴う膵癌血管新生・浸潤能の変化とサイトカインシグナルの役割 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会 米子コンベンションセンター BiG Ship（鳥取県米子市）2016年7月21日 - 2016年7月22日

社本智也，松尾洋一，坪井謙，森本守，高橋広城，齊藤健太，佐藤崇文，竹山廣光 腎細胞癌膵転移症例の検討 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会 米子コンベンションセンター BiG Ship（鳥取県米子市）2016年7月21日 - 2016年7月22日

松尾洋一，森本守，坪井謙，社本智也，佐藤崇文，齊藤健太，高橋広城，石黒秀行，若杉健弘，竹山廣光 膵癌血管新生における ENA-78/CXCL5 の役割 第 71 回日本消化器外科学会総会 徳島県郷土文化会館あわぎんホール（徳島県徳島市）2016年7月14日 - 2016年7月16日

社本智也，松尾洋一，中屋誠一，齊藤健太，佐藤崇文，坪井謙，森本守，高橋広城，若杉健弘，竹山廣光 胆嚢摘出術後に仮性肝動脈瘤を認め IVR にて治療した 2 例の検討 第 71 回日本消化器外科学会総会 徳島県郷土文化会館あわぎんホール（徳島県徳島市）2016年7月14日 - 2016年7月16日

松尾洋一，森本守，佐藤崇文，坪井謙，社本智也，齊藤健太，高橋広城，若杉健弘，竹山廣光 膵癌発癌に関わる血管新生因子 ~ Kras 点突然変異の役割と下流シ

グナルの解明 第 116 回日本外科学会定期学術集会 グランキューブ大阪 大阪府立国際会議場（大阪府大阪市）2016年4月14日 - 2016年4月16日

社本智也，松尾洋一，坪井謙，森本守，佐藤崇文，齊藤健太，今藤裕之，石黒秀行，竹山廣光 悪性リンパ腫治療中に膵腫瘍部穿孔による膵液瘻をきたした 1 例 第 78 回日本臨床外科学会総会 グランドプリンスホテル新高輪（東京都港区）2015年4月16日 - 2016年4月18日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤健太 (SAITO Kenta)

名古屋市立大学・医学研究科・助教

研究者番号：10770240