

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790489

研究課題名 (和文) 膵癌における PPAR ガンマの作用解析

研究課題名 (英文) Analysis of the PPAR gamma interaction in pancreatic carcinoma

研究代表者

高橋宏和 (TAKAHASHI HIROKAZU)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：70438159

研究成果の概要：

核内受容体スーパーファミリーである Peroxisome Proliferator-Activated receptor (PPAR) γ リガンドの膵癌細胞に対する作用解析を目的とした。膵癌細胞において PPAR γ リガンドは細胞運動、転移能を減少させ、マウスモデルでは転移巣を減少させた。膵癌のみならず大腸癌、乳癌、前立腺癌などにおいても抗腫瘍効果が示唆されており、今後臨床応用へ向け既存の抗がん剤との併用療法などの無作為化比較試験を行う必要がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,700,000	0	1,700,000
20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：化学発癌予防

科研費の分科・細目：膵癌，大腸癌

キーワード：膵癌，PPAR γ ，浸潤，細胞運動，転移

1. 研究開始当初の背景

Peroxisome Proliferator-Activated receptor (PPAR) は核内受容体スーパーファミリーの一員であり、リガンド依存的に活性化され標的遺伝子の発現を調節している。PPAR γ は脂肪組織以外にも各種癌細胞などにも多量に発現しており、消化器の分野においても、各種疾患の発症メカニズムや分子標的治療のターゲットとして大いに注目されている。PPAR γ と消化器疾患に関してはわれわれのグループは世界で先駆的な仕事をしてきた。PPAR γ が消化管とくに大腸に

多量に発現していることに着目し、PPAR γ リガンドが炎症性疾患の治療や大腸癌の化学発癌予防に有用であることを報告してきた。PPAR γ は大腸上皮に多量に存在するが膵管上皮には少なく、膵癌では高発現していることが知られている。今回の研究では膵癌における PPAR γ の機能解明のため次の点を期間内に解明することを目指す。

2. 研究の目的

(1) 膵癌細胞 Capan-1 の cell growth に低濃度 (0.01～1 μ M) の PPAR γ 特異的阻害薬 T0070907 が影響を与えないことを MTT assay

にて明らかにする. (薬物毒性の否定) (2) 膵癌細胞の cell motility が (1) と同濃度で低下するかを transwell migration assay, wound-healing ability assay, 金コロイド法などを用いて明らかにする. (3) PPAR γ の活性阻害が cell motility に重要な役割を果たす Rho ファミリー, 特に Cdc-42, Rac-1 に影響を与えるか検討する. また影響を及ぼすのであれば, これに p-120 カテニン (p120-ctn) が関与することを示す. (4) PPAR γ の特異的阻害剤 T0070907 が, マウスゼノグラフト膵癌転移モデルにおいて転移抑制作用があることを示す.

3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞において PPAR γ のノックダウン・阻害が膵癌細胞増殖に与える影響解析
細胞運動と増殖の関心の解析ため PPAR γ のノックダウン・阻害の細胞増殖への影響を MTT assay (テトラゾリウム化合物を用いて生細胞数を定量化する), BrdU incorporate assay (細胞増殖定量化) で解析する.

(2) 膵癌細胞において PPAR γ のノックダウン・阻害による cell motility の低下の解析
膵癌細胞 (Panc-1, Capan-1) を用い Western blotting にて PPAR γ , p120-ctn, E-, N-, P-cadherin の発現量を確認する. 膵癌細胞株の中で PPAR γ の発現量の多いものと少ないものを選び PPAR γ 阻害剤 T0070907 (濃度は 0.01~10 μ M) の投与および PPAR γ siRNA を用いた遺伝子発現のノックダウンによる cell motility への影響を ① Transwell migration assay, ② Wound-filling ability assay, iii) 金コロイド法にて解析定量化する. Transwell migration assay は B-D 社のマトリゲルを用いて 22 時間で判定する.

(3) 膵癌細胞における PPAR γ ノックダウン・阻害の Rho-GTPase への影響
PPAR γ 阻害剤 T0070907 投与およびノックダウンを行い膵癌細胞の Rac1/Cdc42 活性を GST-PULL DOWN 法を用いて測定する.

(4) マウス膵癌ゼノグラフト転移モデルを用いた T0070907 の転移抑制作用の検討
SCID (Severe combined Immuno-deficient: 重症免疫不全) マウスを部分開腹後, 膵癌細胞 Capan-1 を膵体部に同細胞数移植後閉腹する. 各グループに T0070907 を経口投与し, 4~6 週後開腹し, 転移巣の数, 体積を解析定量化する. 薬剤濃度は 4 段階に振り, dose response を検討できるようにする.

4. 研究成果

(1) 膵癌における PPAR γ の発現
膵癌培養細胞 (PK-1, Capan-1, Panc-1, HS766T, MPanc96, SW1990, HPAF-2, KLM, HPAK) において PPAR γ の発現が認められた (Fig. 1(a)).

ヒト術後検体の免疫染色において特に膵癌部で高発現を認めた (Fig. 1(c)).

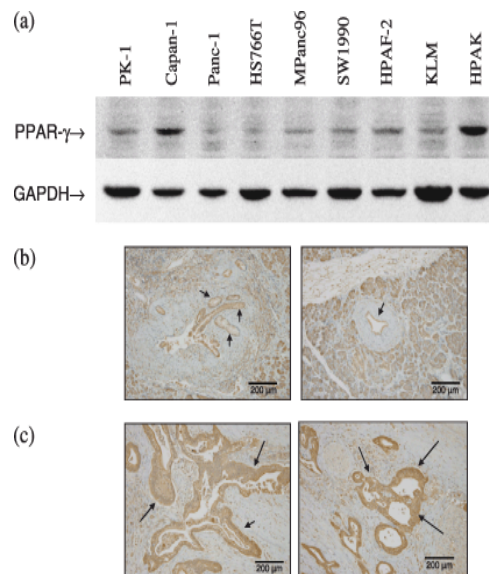


Fig. 1

(2) PPAR γ のノックダウン・阻害による cell motility の解析
膵癌培養細胞 (Capan-1, Panc-1) を用い Wound-filling assay を行った. PPAR γ 特異的阻害薬または siRNA によるノックダウンにより細胞運動能は低下した (Fig. 2).

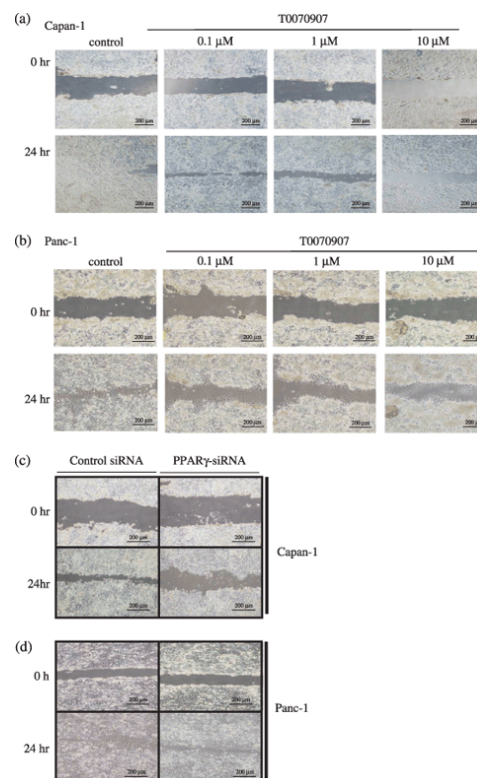


Fig. 2

(3) PPAR γ のノックダウン・阻害による細胞浸潤能の解析

膵癌培養細胞(Capan-1, Panc-1)を用い cellmigration assay を行った. PPAR γ 特異的阻害薬または siRNA によるノックダウンにより細胞浸潤能は低下した(Fig. 3).

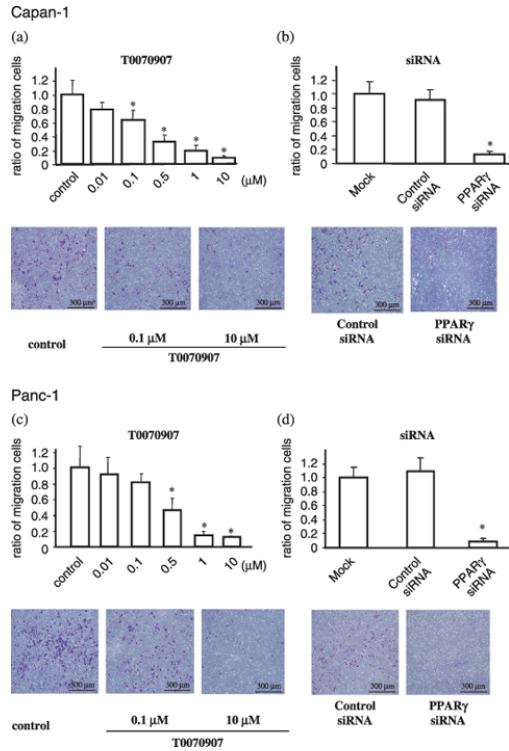


Fig. 3

(4) PPAR γ 阻害薬による細胞増殖, アポトーシスへの作用解析

PPAR γ 阻害薬は膵癌培養細胞にたいし細胞増殖, アポトーシスに影響を与えなかった(Fig. 4).

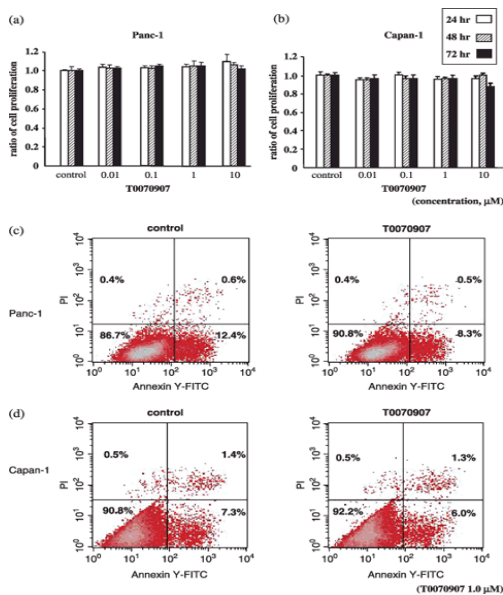


Fig. 4

(5) PPAR γ 阻害薬の細胞内シグナルへの作用解析

共焦点顕微鏡によると p120ctn の局在は PPAR γ 阻害薬により細胞質より細胞膜に移った. この作用には PPAR の標的部位である PPRE の低下を伴っていた(Fig. 5).

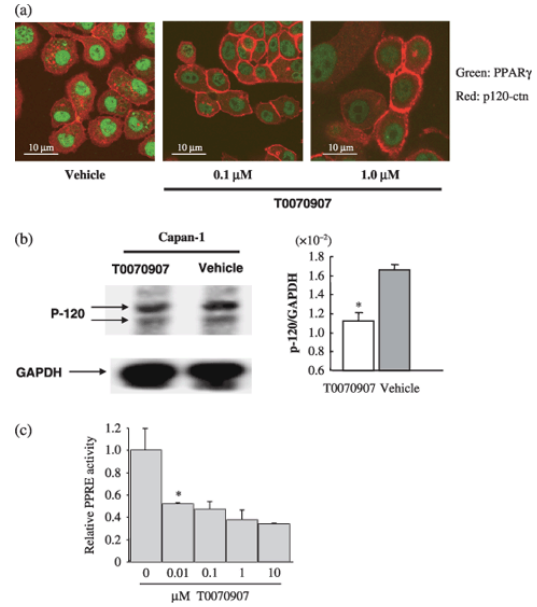


Fig. 5

(6) PPAR γ 阻害薬の細胞運動シグナルへの作用解析

細胞運動に関与する Cdc42, Rac-1 は PPAR γ 阻害薬により有意に減少した(Fig. 6).

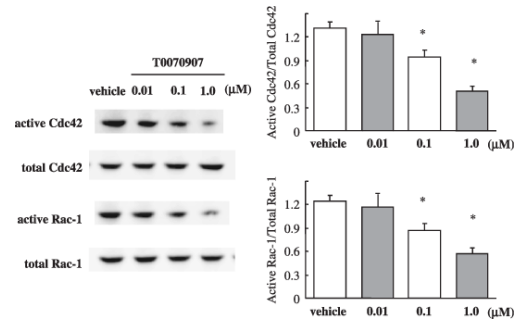
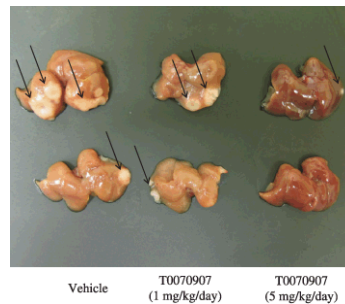


Fig. 6

(7) マウス膵癌転移モデルによる PPAR γ 阻害薬による転移抑制作用

PPAR γ 阻害薬により転移巣の数, 体積は有意に減少した(Fig. 7).



Vehicle T0070907 (1 mg/kg/day) T0070907 (5 mg/kg/day)

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 11 件)

1. Kitai Y, Takahashi H, Goto A, Iida H, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Kobayashi N, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Nakajima A.

Chemotherapeutic treatment of priapism in metastatic rectal cancer

Cace Rep Gastroenterol. 2008; 2: 505-508.

2. Hattori Y, Kobayashi S, Takahashi H, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Kubota K, Saito S, Nakajima A.

Gastric Inflammatory Fibroid Polyp Treated by Endoscopic Submucosal Dissection.

Cace Rep Gastroenterol. 2008; 2: 283-286.

3. Hattori Y, Higurashi T, Takahashi H, Inamori M, Abe Y, Rino Y, Nakajima, A. Gastric Varices with Remarkable Collateral Veins in Valpronic Acid-Induced Chronic Pancreatitis.

Cace Rep Gastroenterol. 2008; 2: 279-282.

4. Suzuki A, Yabushita Y, Takahashi H, Inamori M, Nakao S, Suzuki K, Iida H, Endo H, Akiyama T, Ikeda T, Sakamoto Y, Fujita K, Yoneda M, Goto A, Abe Y, Kirikoshi H, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Nakajima A.

Education and imaging. Gastrointestinal: ascariasis.

J Gastroenterol Hepatol. 2008; 23: 1770.

5. Yumori A, Okubo H, Takahashi H, Iida H, Mawatari H, Yoneda M, Inamori M, Abe Y,

Kobayashi N, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Nakajima A.

Education and imaging. Gastrointestinal: mantle cell lymphoma diagnosed by balloon enteroscopy.

J Gastroenterol Hepatol. 2008; 23: 1623.

6. Nakajima A, Takahashi H, Inamori M, Abe Y, Kobayashi N, Kubota K, Yamanaka S. Anaplastic carcinoma of the pancreas producing granulocyte-colony stimulating factor: a case report.

J Med Case Reports. 2008; 2: 391.

7. Fujisawa T, Sugiyama M, Tomimoto A, Wada K, Endo H, Takahashi H, Yoneda K, Yoneda M, Inamori M, Saito S, Terauchi Y, Kadowaki T, Tsuchiya N, Nakagama H, Nakajima A.

Inhibition of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Promotes Tumorigenesis Through Activation of the beta-Catenin / T Cell Factor (TCF) Pathway in the Mouse Intestine.

J Pharmacol Sci. 2008; 108: 535-544.

8. Nakajima A, Tomimoto A, Fujita K, Sugiyama M, Takahashi H, Ikeda I, Hosono K, Endo H, Yoneda K, Iida H, Inamori M, Kubota K, Saito S, Nakajima N, Wada K, Nagashima Y, Nakagama H.

Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility.

Cancer Sci. 2008; 99: 1892-1900.

9. Tomimoto A, Endo H, Sugiyama M, Fujisawa T, Hosono K, Takahashi H, Nakajima N,

Nagashima Y, Wada K, Nakagama H, Nakajima A.

Metformin suppresses intestinal polyp growth in Apc(Min/+) mice.

Cancer Sci. 2008; 99: 2136-2141.

10. Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Iida H, Sugiyama M, Takahashi H, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Nakajima N, Wada K, Nagashima Y, Nakagama H, Uozaki H, Fukayama M, Nakajima A.

Expression of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in normal colon epithelium and colon cancer tissue.

Oncol Rep. 2008; 20: 479-83.

11. Fujisawa T, Endo H, Tomimoto A, Sugiyama M, Takahashi H, Saito S, Inamori M, Nakajima N, Watanabe M, Kubota N, Yamauchi T, Kadowaki T, Wada K, Nakagama H, Nakajima A.

Adiponectin Suppresses Colorectal Carcinogenesis under the High-fat Diet Condition.

Gut. 2008; 57: 1531-1538.

[学会発表] (計 6件)

1. Takahashi H, Hosono K, Endo H, Yoneda K, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Abe Y, Inamori M, Kobayashi N, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Nakajima A

Correlation of the plasma level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) with the number of aberrant crypt foci in men

2008 16th UEGW (081020) Vienna

2. Hirokazu Takahashi, Kyoko Yoneda, Hiroki Endo, Hiroshi Iida, Tomoyuki Akiyama, Yasunobu Abe, Masahiko Inamori,

Atsushi Nakajima

Visceral fat obesity and abnormal glucose tolerance correlate with dysplastic aberrant crypt foci in colorectal tumor free male (oral session)

2008 DDW (080518) San Diego

3. Takahashi H, Hosono K, Yoneda K, Endo H, Nozaki Y, Akiyama T, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Saito S, Nakajima A
Abnormal glucose tolerance and plasma IGF-1 correlate with dysplastic aberrant crypt foci in colorectal tumor free male

2008 JCA (081029) Nagoya

4. 高橋宏和, 桐越博之, 米田正人, 稲森正彦, 阿部泰伸, 小林規俊, 窪田賢輔, 斉藤聡, 上野規男, 中島 淳

造影エコーが診断に有用であった 門脈血栓症の1例

日本超音波医学会 関東甲信越地方会第20回 学術集会 (081025) 東京

5. 高橋宏和, 細野邦広, 中島 淳

内臓脂肪およびアディポネクチンと大腸発癌における性差

パネルディスカッション4 性差からみた消化器疾患の病態と予後

第50回日本消化器病学会大会 (081001) 東京

6. 高橋宏和, 馬渡弘典, 加藤真吾, 内山 崇, 飯田 洋, 野崎雄一, 遠藤宏樹, 米田恭子, 秋山智之, 藤田浩司, 米田正人, 後藤 歩, 廣川 智, 稲森正彦, 阿部泰伸, 小林規俊, 桐越博之, 窪田賢輔, 斉藤 聡, 上野規男, 中島 淳

直腸癌に合併した持続勃起症に対して化学療法が著効した1例

第 301 回日本消化器病学会関東支部例会

(080906)東京

〔図書〕(計 3 件)

稲森正彦, 秋山智之, 高橋宏和, 阿部泰伸,
中島淳

【内臓肥満と消化器疾患】 内臓肥満と消化
器疾患(消化管)

日本消化器病学会雑誌 105 巻 12 号
Page1722-1727

野崎雄一, 阿部泰伸, 藤田浩司, 米田正
人, 飯田洋, 馬渡弘典, 遠藤宏樹, 秋山智
之, 米田恭子, 高橋宏和, 小林規俊, 桐越博
之, 稲森正彦, 窪田賢輔, 斉藤聡, 川口実,
中島淳

早期胃癌の内視鏡的治療 レーザー治療 (適
応と成績, 合併症)

消化器外科 31 巻 5 号 Page696-700

小林規俊, 藤田浩司, 藤沢聡郎, 高橋宏和,
米田正人, 阿部泰伸, 稲森正彦, 桐越博之,
窪田賢輔, 斉藤聡, 中島淳

切除不能膵癌に対する Gemcitabine 単独化学
療法の適切な治療効果判定法についての検
討

癌と化学療法 35 巻 1 号 Page65-70

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋宏和(TAKAHASHI HIROKAZU)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号: 70438159

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし