

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790961
 研究課題名（和文） 膵癌における neuropilin-1 の役割とそのシグナル伝達経路に関する研究
 研究課題名（英文） The biological role and signaling pathway of neuropilin-1 in human pancreatic cancer
 研究代表者
 松下 晃 (MATSUSHITA AKIRA)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号：70449263

研究成果の概要：

Neuropilin-1 プラスミドを用いて neuropilin-1 低発現の膵癌細胞 COLO357 に neuropilin-1 を導入したところ、Np-1 高発現株では抗癌剤投与による survival が増加し、apoptosis が減少した。Neuropilin-1 の抗 apoptosis 効果には caspase-3 の関与が考えられた。膵癌細胞株、ヒト膵癌組織を用いた検討では、膵癌において STAT5A、5B mRNA、蛋白の発現が確認されさらに STAT5B の活性化が認められたが、PANC-1 を用いた STAT-5 siRNA による実験では STAT5 と survival, apoptosis の関連は認められなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	500,000	0	500,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	270,000	1,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵癌, neuropilin-1, STAT5

1. 研究開始当初の背景

膵癌では多くの増殖因子レセプターやそのリガンドの発現が認められ、その悪性度との関連が報告されている。

Neuropilin-1 (以下 Np-1) は増殖因子 VEGF-A と神経軸索伸長阻害因子 semaphorin3A の co-receptor として働く膜蛋白である。膵癌においては Np-1 の発現が認められているがその生物学的役割は明らかではなく、そのシグナル伝達経路も判明していなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は平成 16 年 7 月より平成 18 年 9 月まで米国 Dartmouth Medical School に留学し膵癌における Np-1 の役割とそのシグナル伝達経路についての研究を行った。Np-1 anti-sense を用いた実験により膵癌において Np-1 は proliferation, survival, adhesion と invasion に関与することを見出した。さらに Np-1 が integrin b1 を介して adhesion に関与し、signal transducer and activator of transcription 5 (stat5) が

Np-1による抗apoptosis効果に関わっている可能性が示した。

今回我々は膵癌におけるNp-1のapoptosisへの関与,さらにSTAT5 pathwayとapoptosisとの関連,膵癌におけるstat5発現および活性化を検討するための実験を計画した。

3. 研究の方法

(1) Np-1 低発現のヒト膵癌細胞 COL0357 に Np-1cDNA を stable transfection してクローンを作成し, sham 及び Np-1 高発現クローン (Np-1 sense) にシスプラチン (CDDP) を投与して 24 時間培養して, MTT assay にて survival を検討した. さらに Western blot にて apoptosis 関連蛋白の関与について検討した.

(2) 膵癌細胞株 PANC-1 に STAT5 siRNA を transient transfection したのち ActD を投与して apoptosis を誘導し MTT assay にて control 群との survival の比較を行った。

(3) ヒト膵癌細胞株 AsPC-1, Capan-1, MIA PaCa-2, PANC-1 の total RNA を抽出し, SYBR Green I を用いた RT-PCR 法にて STAT5A, 5B mRNA 発現を検討した. 標準遺伝子は GAPDH を用いた. 使用したプライマーは下記の如くである.

STAT5A:

5' -CAATGAGCTTGTGTTCCAGGTGA-3'

5' -AGCAAAGGCATTGTCCCACAG-3'

STAT5B:

5' -TGAACAGAGTTGGTCCGAGAA-3'

5' -AACGTCTGGTTGATCTGGAGGTG-3'

GAPDH:

5' -GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'

5' -TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

また Western blot 法にて STAT5A, STAT5B 蛋白発現を検討し,さらに活性化の指標であるチロシンリン酸化について免疫沈降法, Western blot 法にて検討した. さらにヒト膵癌組織標本よりパラフィン切片を作成し,免疫組織染色により STAT5A, STAT5B 蛋白の膵癌での発現を検討した. 膵癌細胞の核内における 30%以上の発現と陽性とした。

4. 研究成果

(1) CDDP100uM で 24 時間培養した後, MTT assay により生存率の検討を行ったところ, sham では生存率が 26.4%であったのに対して Np-1 sense clone1 では 59.1%, clone2 では 64.6%と sham に比し Np-1 sense clone で生存率が有意に増加した (*, p=0.02, **, p=0.001) .

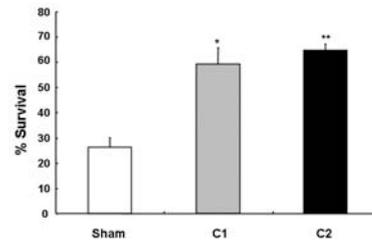


図1 MTT assay

さらに Western blot 法による apoptosis 関連蛋白の検討では sham に比し Np-1 sense

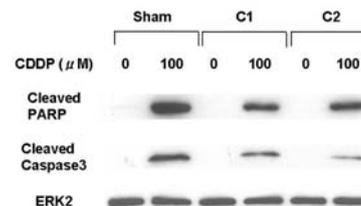


図2

(2) PANC-1 に STAT5 siRNA の投与により STAT5 蛋白の発現は低下したが, ActD を投与した survival の検討では control 群に比し STAT5 siRNA 投与群で survival の変化は認められなかった。

(3) RT-PCR 法にてヒト膵癌細胞株 AsPC-1, Capan-1, MIA PaCa-2, PANC-1 の STAT5A, 5B の mRNA 発現を検討したところ全ての細胞株に STAT5A, 5B mRNA 発現が認められた。

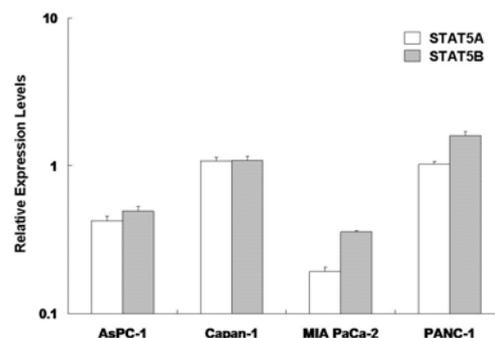


図3

Western Blot 法による検討では全ての細胞株で STAT5A、5B 蛋白の発現が認められた。

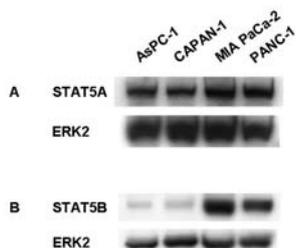


図 4

さらに蛋白の活性化について抗チロシンリン酸化抗体を用いた免疫沈降法、Western Blot 法により検討したところ全細胞株にて STAT5B 蛋白の活性化が認められた。



図 5

ヒト膵癌組織 20 例のパラフィン切片を用いた免疫組織学的検討では STAT 蛋白の活性化を示す膵癌細胞の核内での発現は STAT5A では 10% (2/20) であったのに対して STAT5B では 70% (15/20) であった。

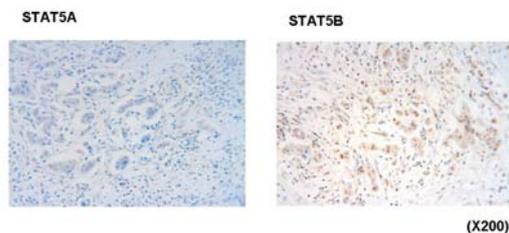


図 6

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 2 件)

① Fukasawa M, Matsushita A, Korc M. Neuropilin-1 interacts with integrin beta1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. *Cancer Biology & Therapy* 6(8), 1173-80, 2007, 査読あり.

② Matsushita A, Götze T, Korc M. Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1. *Cancer Research* 67(21), 10309-10316, 2007, 査読あり.

③ Aimoto T, Uchida E, Matsushita A, Tabata Y, Takano T, Miyamoto M, Tajiri T. Controlled release of basic fibroblast growth factor promotes healing of the pancreaticojejunal anastomosis: a novel approach toward zero pancreatic fistula. *Surgery* 142, 734-40, 2007, 査読あり.

④ Aimoto T, Uchida E, Kawahigashi Y, Nakamura Y, Matsushita A, Katsuno A, Chou K, Kawamoto M, Yamanaka Y, Tajiri T, Naito Z. Improvement of intraoperative frozen section diagnosis in patients with biliary strictures by Levovist injection into the bile duct on color doppler ultrasonography. *World J Surg* 32, 88-92, 2008, 査読あり.

⑤ 内田英二, 松下 晃, 柳 健, 廣井 信, 相本隆幸, 中村慶春, 福原宗久, 横山 正, 田尻 孝. ハムスター膵癌細胞を用いた膵癌の転移特性の解明および治療実験の意義. *膵臓*, 23, 60-65, 2008, 査読あり.

[学会発表] (計 9 件)

① 松下 晃, 深澤光晴, 内田英二, 田尻 孝, Korc M. Suppression of neuropilin-1 in PANC-1 human pancreatic cancer cells leads to attenuated growth, survival and invasion. 第 107 回日本外科学会総会 2007 年, 大阪

② Matsushita A, Götze T, Gunn J, Korc M. Neuropilin-1 associates with c-Met and modulates hepatocyte growth factor actions. Annual Meeting of the American Association of Cancer Research, 2007, LA, USA.

③ 松下 晃, 深澤光晴, 内田英二, 張 一光, 川本聖郎, 中村慶春, 相本隆幸, Korc M, 田尻 孝. 膵癌の新しい治療標的としての Neuropilin-1、その integrin beta1 との関連について. 第 38 回日本膵臓学会大会, 2007 年, 福岡.

④ 松下 晃, 内田英二, 張 一光, 川本聖郎, 中村慶春, 相本隆幸, Murray Korc, 田尻 孝. Neuropilin-1 associates with c-Met and modulates hepatocyte growth factor actions. 第 62 回日本消化器外科学会総会, 2007 年, 東京.

⑤ Matsushita A, Götze T, Nakamura Y, Aimoto T, Uchida E, Tajiri T, Korc M. Neuropilin-1 association with c-Met in

pancreatic cancer cells enhances hepatocyte growth factor-mediated cell invasion. 第 108 回日本外科学会総会, 2008 年, 長崎.

⑥松下 晃, 川本聖郎, 中村慶春, 相本隆幸, 横山 正, 石渡俊行, 内藤善哉, 内田英二, 笹島耕二, 田尻 孝. Neuropilin-1 の膵癌における生物学的意義、そのintegrin beta1 との関連について. 第 63 回日本消化器外科学会総会, 2008 年, 札幌.

⑦松下 晃, 内田英二, 相本隆幸, 中村慶春, 川本聖郎, 渡辺秀裕, 宮本昌之, 横山 正, 丸山 弘, 鈴木成治, 松谷 毅, 柳 健, 石渡俊行, 内藤善哉, 笹島耕二, 田尻 孝. ヒト膵癌におけるNeuropilin-1 とc-Met、HGF の関連について. 第 39 回日本膵臓学会大会, 2008 年, 横浜.

⑧Matsushita A, Uchida E, Nakamura Y, Aimoto T, Matsutani T, Suzuki S, Maruyama H, Yokoyama T, Miyamoto M, Watanabe H, Sasajima K, Tajiri T. Neuropilin-1 interacts with integrin beta1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年, 名古屋.

⑨松下 晃, 内田英二, 宮本昌之, 渡辺秀裕, 鈴木成治, 横山 正, 丸山 弘, 松谷 毅, 杉浦 篤, 柳 健, 松田明久, 西 佳史, 新井洋紀, 若林秀幸, 相本隆幸, 中村慶春, 川本聖郎, 石渡俊行, 内藤善哉, 笹島耕二, 田尻 孝. ヒト膵癌におけるSTAT5 の発現、活性化についての検討. 第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009 年 4 月, 福岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 晃 (MATSUSHITA AKIRA)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：70449263

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし