

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591620

研究課題名(和文) 膵癌の新規腫瘍マーカーApoC-1蛋白の機能解析—分子標的療法開発へ向けて

研究課題名(英文) Functional analysis and clinical application for ApoC-1 in patients with pancreatic cancer

研究代表者

須田 浩介(SUDA KOSUKE)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50400908

研究成果の概要(和文)：

本研究は、新規膵癌マーカーの発見とその治療応用を目的とした。まず、SELDI-TOF MSとProteinChip systemを用い膵癌に対する血清中の特異的蛋白としてApoC-1の同定を行った。同定された蛋白の膵癌組織中での発現を確認、さらに膵癌患者ではApoC-1の血清値および組織発現の高値群の患者では低値群に比べ有意に予後不良であることが判明した。続いて、膵癌細胞株を用い、ApoC-1蛋白の発現を抑制すると、アポトーシスが起り細胞増殖能の低下が認められた。

研究成果の概要(英文)：

Pancreatic cancer still remains one of the most lethal diseases with increasing incidence. We recently identified Apolipoprotein C-1 (ApoC-1) as the serum biomarker for pancreatic cancer by serum protein profiling using surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS). The purpose of this study is to confirm whether serum ApoC-1 levels of patients with pancreatic cancer were a valuable marker using convenient ELISA method, and also whether ApoC-1 expression in resected pancreatic cancer tissue correlates with prognosis of patients after surgery.

We analyzed ApoC-1 serum level of 32 patients by two proteomic approaches. We also investigate whether ApoC-1 positive expression in resected tissues of patients with pancreatic cancer showed meaningful results in clinical outcome.

ApoC-1 serum levels were significantly decreased in compared preoperative and postoperative serum of patients both SELDI analysis and ELISA method. ApoC-1 levels of pancreatic cancer patients are significantly higher than that of patients with benign pancreatic disease by ELISA method. Furthermore, the immunohistochemical staining of ApoC-1 indicated that overexpression of ApoC-1 in resected pancreatic cancer tissues showed poor prognosis of patients (log rank-test; $P < 0.038$).

These results suggested that ApoC-1 positive expression was possible to predict poor prognosis of pancreatic cancer patients after surgery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

1. 研究開始当初の背景

近年各種消化器癌に対し、血清等を用いたプロテオーム解析が行われ、新しい血清マーカーの探索、蛋白機能解析、さらに治療応用が注目されている。

これまでに、我々は治療切除術を施行された膵臓癌患者（20例）の術前術後の血清を SELDI-TOF MS および ProteinChip System を用い同一個体内での血清蛋白発現量の相違を比較検討した。その結果、術前と比べ術後で有意に発現量の低下した特異的蛋白候補を4種類見出し、その内の1つの蛋白を精製、同定し、Apolipoprotein C-1(ApoC-1)蛋白であることを見出した。加えて、血清中 ApoC-1 発現量が膵臓癌患者の予後と有意に相関していることを見出した ($p=0.005$)。近年、apoC-1 遺伝子が膵臓において癌部に特異的に強発現していることが初めて報告され(Byungwoo et al. *Cancer Research* 2001;61:1833-)、また、同様のプロテオミクス解析により ApoC-1 をはじめとした Apolipoprotein が各種癌に関与していることが報告され注目されている。我々は免疫組織学的染色にて ApoC-1 蛋白が正常膵管にはほとんど発現せず、膵臓癌組織の癌細胞内に特異的に発現していることを確認した。さらに、Western blot にて4種類の膵臓癌細胞株および、その培養上清中に ApoC-1 蛋白の発現を認めた。これらの結果より膵臓癌細胞で過剰産生された ApoC-1 蛋白が血清中に逸脱することで血清値の上昇につながると考えられ、膵臓癌の早期診断・予後腫瘍マーカーとして非常に有効な蛋白であることを強く示唆する結果が得られた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、消化器癌、特に膵臓癌に対する血清プロテオーム解析で見出した新規腫瘍マーカーである ApoC-1 蛋白の膵臓癌増殖・進展における機能解析を行い、新しい分子標的療法開発へ応用することである。

これまでに、我々はこの ApoC-1 蛋白が膵臓癌の増殖・進展にどのように携わっているかを解明するために ApoC-1 蛋白発現を認める膵臓癌細胞株を用い、その細胞株に siRNA を用い ApoC-1 mRNA を特異的に knock down することで、ApoC-1 が膵臓癌細胞株に及ぼす影響の検討を行ってきた。現在までに膵臓癌細胞株で ApoC-1 mRNA 発現を siRNA により抑制したところ有意に細胞増殖能の低下および細胞死の増加を認めるという結果を得ている。さらにどのようなメカニズムにより ApoC-1 がこれらの生物学的機能を発揮するかを詳細に検討する。これらの結果をふ

まえて、生体内での ApoC-1 の機能を抑制する方法を模索し、臨床応用可能な治療法の開発を目指す。その方法として近年の遺伝子導入技術を使い、より効果的な生体投与を可能とし癌組織内での ApoC-1 発現を抑制する方法を模索し、新しい遺伝子治療として臨床応用に活用する。以上のような研究を通して新しい膵臓癌の診断法および治療法を確立し、膵臓癌患者の予後改善へ寄与するよう目指す。

3. 研究の方法

膵臓癌患者術前術後の ProteinChip System 解析で得られた蛋白比較 (Serum protein profiling) により見出され、同定された膵臓癌特異的蛋白である ApoC-1 蛋白が膵臓癌の増殖・進展にどのように携わっているかを解明するために、ApoC-1 蛋白を発現する膵臓癌細胞株に対し siRNA を用いて ApoC-1 mRNA を特異的に knock down し、細胞増殖能、細胞浸潤能に及ぼす効果を検討する。更にその効果を発現するに至るメカニズムを受容体-細胞内シグナル伝達系を検討することにより分子レベルで解明する。in vitroでの結果をふまえて、ヌードマウスの皮下腫瘍移植モデルを用いて ApoC-1 mRNA の knock down による効果を in vivo で検討する。受容体、細胞内シグナル伝達系等の標的となりうる分子が in vitro で明らかになれば、これを標的とした腫瘍増殖抑制系を試みる。血清腫瘍マーカーとしての臨床応用を目指し、ELISA 等での血清 ApoC-1 蛋白の測定系の確立を行う。

4. 研究成果

根治手術 (R0) が施行された浸潤性膵管癌患者 20 例の術前術後血清を陽イオン chip である wcx2 chip と SELDI-TOF MS を用いて血清中の蛋白プロファイルの比較検討を行った。3000Da~20000 Da の分子量の範囲の中で 85 の peak が認められ、その中で術前と比較し術後有意に低下していた4種類の分子量が候補蛋白としてあげられた。

その4つの中の1つである、6630Da 蛋白の SELDI-TOF MS での代表的な peak を示す (図 1A)。6630 Da 蛋白は 20 例中 15 例 (75%) において術後血清中で有意に peak intensity が低下していた (図 1B)。

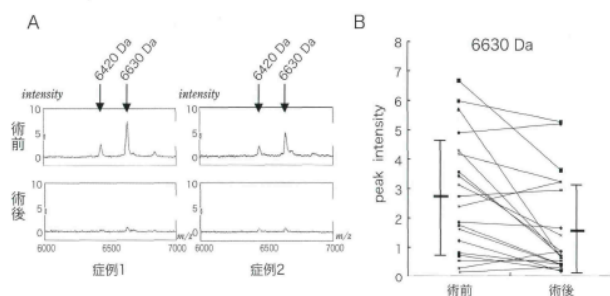


図1 SELDI-TOF MSとProteinChip® systemによる6630 Da蛋白の術前術後血清の比較

同定したところ、6630Da 蛋白が Apolipoprotein C-1 (ApoC-1) の mature type, 6420Da 蛋白がその N 末端側の 2 アミノ酸残基欠損した蛋白であることが判明した。さらにそのことを SELDI-TOF MS を用いた Immunodepletion assay および Western blot にて確認した。

次に、実際の膵癌組織での ApoC-1 の発現の有無を確認するために、膵癌の癌部・非癌部で ApoC-1 mRNA を RT-PCR および定量化 RT-PCR にて比較検討したところ、非癌部に比べ癌部で有意に発現が増強していた ($p < 0.0001$) (図 2A)。さらに、ApoC-1 は蛋白レベルにおいても癌部や膵癌細胞株で高発現していることが Western blot で確認された (図 2B)。

続いて ApoC-1 蛋白の膵癌組織における局在を免疫組織染色にて確認したところ、正常膵管にはほとんど発現を認めず、膵癌細胞の主に細胞質に局在していることが明らかとなった。80 例の浸潤性膵管癌のうち ApoC-1 蛋白陽性であった切除標本症例は 57 例 (71%) であった。

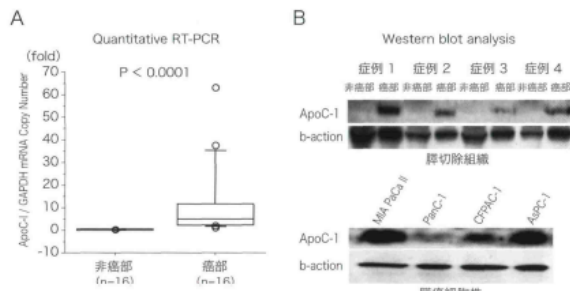


図2 切除癌組織と膵癌細胞株における ApoC-1 の遺伝子および蛋白発現

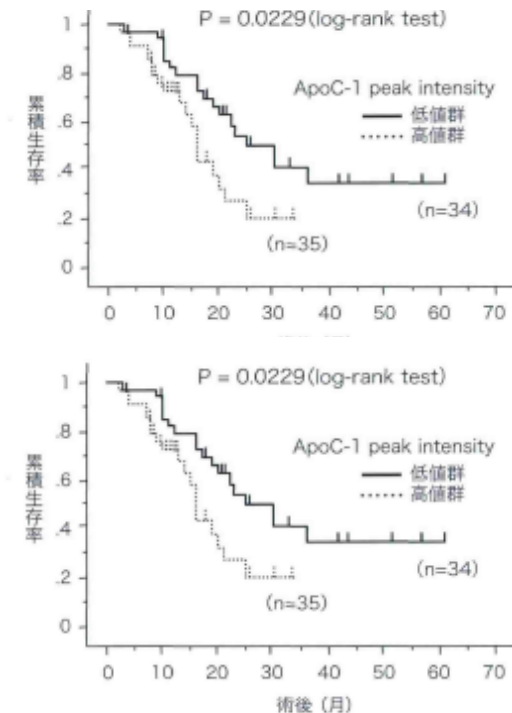


図3 術前血清 ApoC-1 値の 2 群間における全生存率曲線 (Kaplan-Meier 法)

続いて、ApoC-1 蛋白の膵臓癌における働きを調べるため、ApoC-1 特異的 siRNA を用いて膵癌細胞株における ApoC-1 蛋白発現を抑制し、主に増殖能に関する機能解析を行った。2 種類の膵癌細胞株の ApoC-1 蛋白発現を抑制すると siRNA transfection 後 3 日以降に有意な細胞増殖の低下が認められた (図 4)。

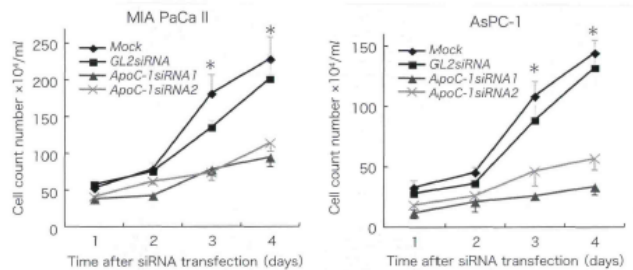


図4 膵癌細胞株での ApoC-1 蛋白抑制による細胞増殖能の低下

そこで、増殖能の低下の原因を調べるために、Apoptosis assay を行ったところ siRNA transfection 後 24 時間で apoptosis 早期の膜変化を反映する細胞質内への dye の取込みが行われた細胞数がコントロールと比較し有意に増加した。さらに、蛍光細胞免疫染色にて細胞の形態変化を調べると、ApoC-1 蛋白発現は細胞質に存在し、siRNA によって発現を抑制された膵癌細胞株の核内では DNA fragmentation や chromatin condensation が認められた。これらの結果より、膵癌細胞において ApoC-1 蛋白の発現を抑制するとアポトーシスが起り、細胞増殖能の低下につながる事が明らかとなった。

以上の結果から ApoC-1 の詳細な分子機構の解明を行うことによって、膵癌の新たな標的分子として、悪性度診断および個別化治療への臨床応用を目指し、さらにより有効な治療法へと発展させて行くことが重要であると思われた。

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 6 件)

- ① Takano S, Sogawa K, Yoshitomi H, Shida T, Mogushi K, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Ishihara T, Tanaka H, Yokosuka O, Nomura F, Miyazaki M. Increased circulating cell signalling phosphoproteins in sera are useful for the detection of pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 査読有、103(2), p223-231、2010
- ② Miyazaki M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A,

- Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Takano S. One hundred seven consecutive surgical resections for hilar cholangiocarcinoma of Bismuth types II, III, IV between 2001 and 2008. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 査読有、17(4)、p470-475、2010
- ③ Suda K, Ohtsuka M, Ambiru S, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Miyazaki M. Risk factors of liver dysfunction after extended hepatic resection in biliary tract malignancies. *The American Journal of Surgery*. 査読有、197(6)、p752-758、2009
- ④ 須田浩介、大塚将之、宮崎勝、胆道癌の検査・診断と治療の適応、消化器肝胆膵ケア、査読無、14(2)、p43-48、2009
- ⑤ Takano S, Yoshitomi H, Togawa A, Sogawa K, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Tomonaga T, Nomura F, Miyazaki M. Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 査読有、27(20)、p2810-2822、2008
- ⑥ Takano S, Togawa A, Yoshitomi H, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Tomonaga T, Nomura F, Miyazaki M. Annexin II overexpression predicts rapid recurrence after surgery in pancreatic cancer patients undergoing gemcitabine-adjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 査読有、15(11)、3157-3168、2008

[学会発表] (計2件)

- ① 須田浩介、高齢者に対する肝門部胆管癌の外科切除の意義とその成績、第109回日本外科学会定期学術集会、2009.4.4、福岡
- ② 須田浩介、エホバの証人の膵頭部癌に対する膵頭十二指腸切除術の2例、第20回日本肝胆膵外科学会学術集会、2008.5.29、山形

○取得状況 (計1件)

名称：膵癌用抗癌剤の耐性検査マーカー、膵癌用抗癌剤の補助治療薬

発明者：高野重紹、外川 明、野村文夫
宮崎 勝

権利者：国立大学法人 千葉大学

種類：特許

番号：第4621923号

取得年月日：平成22年11月12日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

須田 浩介 (SUDA KOSUKE)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50400908

(2)研究分担者

吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60375631
高野 重紹 (TAKANO SHIGETSUGU)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20436380
木村 文夫 (KIMURA FUMIO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：70334208
宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70166156
鈴木大亮 (SUZUKI DAISUKE)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：90422229