

機関番号：34519
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591640
 研究課題名（和文） ヒト膵臓癌におけるシーエックスシーケモカインの検討
 （予後・背景因子・分化度）
 研究課題名（英文） Comparative study of CXCL-Chemokines in human pancreatic cancer
 and the patients' background
 研究代表者
 佐竹 真 （MAKOTO SATAKE）
 兵庫医科大学・医学部・助教
 研究者番号：70399153

研究成果の概要（和文）：

ヒト膵臓癌細胞と組織では血管新生に促進的に働く ELR+CXCL とその受容体である CXCR2 の高発現が認められ、これらは細胞の分化度と相関していた。

研究成果の概要（英文）：

In human pancreatic cancer cell lines and tissue from patients with pancreatic cancer. Angiogenetic ELR+CXCL and its receptor CXCR2 were elevated. This over expression was correlated with the calcification of pancreatic cancer

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、外科学一般

キーワード：膵臓癌，ケモカイン，血管新生，レプターシグナル，増殖転移

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵臓癌は早期発見が困難であり、手術適応症例においても、術後再発や転移が高頻度に認められる。このため膵臓癌における、手術後の再発、転移を抑制・予防するためには新たな補助療法や早期発見の手段の開発のみならず、治療前の予後予測、病態把握が重要と考えられ、膵臓癌においても CXCL chemokine、特に N 末端に ELR-motif を有する ELR-positive CXCL chemokine ligand (ELR+CXCL) が重要な働きをすると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 我々は、ヒト膵臓癌症例においても、CXCR-2 を介した ELR+CXCL の再生刺激が他の固形癌と同様に膵臓癌症例においても血管新生、腫瘍の増殖に重要な働きを示す可能性を考え、UCLA 外科学教室との提携研究において人膵臓癌症例における ELR+CXCL の血清中、切除組織中での発現を比較検討し、更に喫煙、飲酒などを基盤とした患者の risk factor や生活背景、Stage 別、切除例と切除不能例での比較検討を行う。また当教室の嶋田らが確立した、ヒト膵臓癌分離培養細胞株である

KMP-3、KMP-4、KMP-5、KMP-6 の4種のヒト膵癌分離培養細胞株を使用し(Shimada H et. al. Int. J Cancer 94(2001). 1 370-376.)、ELR+CXCL による刺激がヒト膵癌細胞の増殖、血管新生と浸潤に関与するか検討する。

3. 研究の方法

(1) 当科の膵癌患者から血清を採取し Enzyme-linked Immunosorbent assay(以下 ELISA)により ELR+CXCL である I1-8/CXCL8、ENA-78/CXCL5、GRO-alpha/CXCL1 を測定、正常者検体と比較する。また膵癌組織における I1-8/CXCL8、ENA-78/CXCL5 の発現を real time-PCR 法と免疫組織化学染色を行い、同一標本中の正常膵組織領域と比較する。これらの結果を担癌患者の喫煙や飲酒等の risk factor を含めた背景、Staging でも比較。RT-PCR では UCLA で使用したハウスキーピング遺伝子として cyclophilin B を使用する。更にこれらの比較検討を、共同研究として当教室のみならず UCLA の患者群でも行い当教室の Data と統合し共同解析を行う。また術後の prospective study を行い転移群と非転移群、生存率、生存期間も検討し予後への関与を比較検討する。

(2) 当教室所有のヒト膵癌分離培養細胞 KMP-3、-4、-5、-6 の4種を使用し培養上澄液を採取、ELR+CXCL である I1-8/CXCL8、ENA-78/CXCL5、GRO-alpha/CXCL 1 の発現を RT-PCR と ELISA assay により測定、また4種類のヒト膵癌細胞での CXCR-2 の発現を免疫組織化学染色、Western blot analysis で解析し、無刺激状態での ELR+CXCL の発現を検討する。

(3) CXCR-2 Antagonist である CXCR-2 antibody 投与により KMP-3、KMP-4、KMP-5、KMP-6 の4種の細胞の増殖が抑制されるかを比較検討し、血管新生を治療の標的とした血管新生抑制療法が、膵臓癌の再発、転移及び増殖を抑制出来るかにつき検討する。

4. 研究成果

(1) ① 膵癌患者の血清中の ELR+CXCL (I1-8/CXCL8、ENA-78/CXCL5、GRO-alpha/CXCL1)濃度は、正常血清検体より明らかな上昇が認められた。また RT-PCR や免疫組織化学染色でも膵癌組織中の ELR+CXCL (I1-8/CXCL8、ENA-78/CXCL5)の発現は、正常組織中より明らかに上昇していた。特に ENA-78/CXCL5 著明な高発現を認めた。

②患者背景に基づく検討では喫煙患者、飲酒歴のある患者と非喫煙、飲酒歴のない患者との比較においては、喫煙歴と飲酒歴のある患

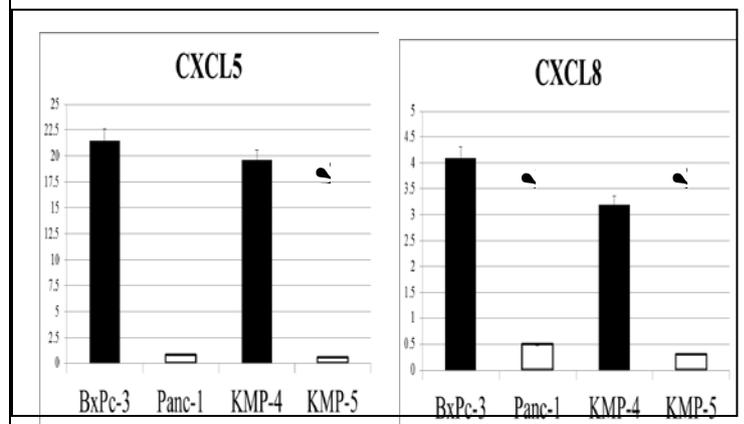
者での ELR+CXCL が血中で上昇していた。

Stage 別の比較では、進行型膵癌での血清中、組織中の ELR+CXCL の上昇していた。

また切除不能例では切除可能例と比較し血清中、組織中 ELR+CXCL が有意に上昇していた。術後の Prospective study では術前血清中の ELR+CXCL 濃度が高いもので転移の発生率は高くなることも予想された。しかしながら術後の経過観察が可能であった患者数は少なく、有意差をもつての証明は不可能であった。長期生存例では早期再発例と比較し血清中の ELR+CXCL 濃度、切除標本中の ELR+CXCL の発現が低値を示していた、しかし3年以上の無再発例は2例であり、統計学的に有意差を示すことは不可能であった。

③免疫組織化学染色では CXCL の発現の上昇を認めたのみならず、その受容体である CXCR2 の発現過剰を認めたが、細胞増殖抑制作用をもつ CXCR3 の発現は低かった。

(2) ① KMP-3、-4、-5、-6 においても MIA PaCa-2、BxPC-3、HPAF-II と同様に下図の如く ELISA にて ELR+CXCL の上昇が観察され、免疫組織化学染色、Western blot analysis では CXCR-2 の発現が観察された。



②濃度別刺激実験では 1 μ M、10 μ M の ELR+CXCL 添加後 12 時間、24 時間で4種細胞数の増加、血管新生を伴う著名な浸潤が認められ、24 時間後の方が 12 時間後より細胞数の増加、血管新生や浸潤程度が著名であり、これらの結果は高分化型よりも低分化型にて有意であった。

(3) 濃度別に 1 μ M、10 μ M の I1-8/CXCL8、ENA-78/CXCL5 を CXCR-2 antibody と同時に添加した場合、ELR+CXCL 単独投与群と比較する

と細胞の増加、血管新生や細胞浸潤は著名に抑制された。

さらに今回の実験系では、COX2 発現と ELR+CXCL の発現に相関がみとめられ、n-6PUFA の刺激により COX2 依存性の PGE2 の上昇が、ELR+CXCL の発現増加に繋がった。

結語：今回の実験では、膵臓癌細胞と同様に、膵臓癌患者においても ELR+CXCL の上昇が認められ、なかでも IL-8/CXCL8 と ENA-78/CXCL5 の著明な上昇が認められた。

今後さらに症例数の蓄積や、慢性炎症性疾患との関連につき検討が必要であるが、これらの結果から Stage、Risk Factor、切除可能・不可能、転移例・非転移例に相関しており、ELR+CXCL は膵臓癌の発育、進展に血管新生を介し重要な働きをしていることが示唆される。また将来的に CXCR-2 antibody を使用した ELR+CXCL の阻害は膵臓癌患者の血管新生の抑制と転移抑制、また再発予防に繋がるということが示唆された。

さらに研究過程でえられた知見は、膵癌における COX 依存性の PGE2 産生能が、ELR+CXCL の産生と相関している可能性も今後の研究課題となり得、COX 阻害薬などが間接的に ELR+CXCL 産生能を抑制し、膵癌の発育進展を予防する可能性があることも今後の研究課題となりえると考えた。

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)

[学会発表] (計 9 件)

- 1) Satake M. Kuroda N. Eibl G. Hirano T. Okada T. Hines O. J. Reber H. A. Go V. L. Uyama N. Suzumura K. and Fujimoto J. The role of CXCLs and receptors CXCR2 and CXCR3 on human PaCa growth. American pancreatic association meeting. Nov. 1-4 (2010). Chicago, IL. U.S
- 2) 佐竹真、黒田暢一、平野公通、岡田敏弘、Eibl G、Reber H.A. Go V.L、宇山直樹、鈴村和夫、Hines O. J. 藤元 治朗. ヒト膵臓癌発育における COX-2、PGE2 の役割。日本膵臓病学会総会 + IAP joint meeting. 7月2日～4日 (2010). Fukuoka, Japan

- 3) Satake M. Kuroda N. Eibl G. Hirano T. Okada T. Reber H. A. Go V. L. Uyama N. Suzumura K. Hines O. J. and Fujimoto J. COX-2 dependent expression of a angiogenic CXC chemokines ligand in human pancreatic cancer cell line. 2010 AGA Meeting, April 30~ May 3, (2010) New Orleans. US
- 4) Satake M. Kuroda N. Eibl G. Hirano T. Okada T. Reber H. A. Go V. L. Uyama N. Suzumura K. and Fujimoto J. The role of CXCLs and receptors CXCR2 and CXCR3 on human PaCa growth. 40th. Joint Meeting of American pancreatic association and Japan Pancreas Society. Nov. 1-4 (2009). Hawaii. U.S
- 5) 佐竹真、黒田暢一、平野公通、岡田敏弘、Eibl G、Reber H.A. Go V.L、宇山直樹、鈴村和夫、Hines O. J. 藤元 治朗. ヒト膵臓癌発育における COX-2、PGE2 の役割。日本膵臓病学会総会。7月2日～4日 (2009)。東京、日本
- 6) Satake M. Kuroda N. Eibl G. Hirano T. Okada T. Reber H. A. Go V. L. Uyama N. Suzumura K. and Fujimoto J. Characterization of Pancreatic cancer cell by COX-2 dependent growth. AGA Meeting, May 30~ June 3, (2009). Chicago, IL. U.S.
- 7) Satake M. Kuroda N. Eibl G. Hirano T. Okada T. Reber H. A. Go V. L. Uyama N. Suzumura K. Fujimoto J. and Tsujimura T. The role of SCF/KIT system in pancreatic transdifferentiation. American pancreatic association meeting. Nov. 1-4 (2008). Chicago, IL. U.S
- 8) 佐竹真、黒田暢一、平野公通、岡田敏弘、Eibl G、Reber H.A. Go V.L、宇山直樹、鈴村和夫、藤元 治朗 辻村亨. 膵幹細胞からの膵細胞再生についての検討、Tyrosine kinase receptor の役割。日本消化器外科学会。7月2日～4日 (2008)、札幌 日本。
- 9) Satake M. Kuroda N. Eibl G. Hirano T. Okada T. Reber H. A. Go V. L. Uyama N.

Suzumura K. Fujimoto J. and Tsujimura T. Pancreatic transdifferentiation induced from stem cell. AGA Meeting, May 30~ June 3, (2008). San Diego. CA. US

[図書] (計2件)

- 1) 佐竹真、黒田暢一、藤元治朗：膵癌におけるプロスタグランディン. 胆と膵, 医学図書出版vol. 31. No6 膵基礎研究の新しい潮流. 2010. 605-609.
- 2) 佐竹克介, 佐竹真, 藤元治朗 Span-1, 腫瘍マーカーハンドブック、医薬ジャーナル、石井勝編集. 2009. 295-298.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐竹 真 (MAKOTO SATAKE)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：70399153

(2) 研究分担者

藤元 治朗 (JIRO FUJIMOTO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：90100373

黒田 暢一 (NOBUKAZU KURODA)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：20301658

平野 公通 (TADAMICHI HIRANO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：90340968

宇山 直樹 (NAOKI UYAMA)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：70402873

鈴木 和大 (KAZUHIRO SUZUMURA)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：50434949

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

海外共同研究者

- 1) Howard A Reber. Professor of General Surgery. David Geffen school of Medicine at UCLA. Laboratory Director of Ronald S. Hirshberg Translation Pancreatic Cancer Research Laboratory.
- 2) Go Vliang. Chair, Scientific Advisory Board. David Geffen school of Medicine at UCLA. Laboratory Director of Ronald S. Hirshberg Translation Pancreatic Cancer Research Laboratory. Chief editor of journal Pancreas.