

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008 ～ 2009
課題番号：20790974
研究課題名 (和文) ルミカンによるケラチノサイト増殖因子シグナル伝達経路の制御機構の開発と治療応用
研究課題名 (英文) Application for pancreatic cancer therapy to develop control method of keratinocyte growth factor signaling pathway by regulation of lumican expression.
研究代表者 山本 哲志 (YAMAMOTO TETSUSHI) 日本医科大学・医学部・助教 研究者番号：20453920

## 研究成果の概要 (和文)：

ケラチノサイト増殖因子 (KGF) とその受容体 (KGFR) は膵臓癌の増殖・浸潤に重要な役割を果たしている。培養膵臓癌細胞にリコンビナント KGF を投与すると、濃度依存的に膵臓癌細胞の増殖が進行し、それに関連して ERK や p38 といった MAPK が活性化された。一方、プロテオグリカンの一つであるルミカンの膵臓癌における発現量を調節したところ、ルミカンの発現量と細胞増殖及び ERK の活性化に正の相関関係が認められた。KGF と KGFR の結合の安定化にはプロテオグリカンが必要なことから、ルミカンは KGF/KGFR 系の活性化を制御することで膵臓癌の増殖を制御している可能性が考えられた。

## 研究成果の概要 (英文)：

Keratinocyte growth factor (KGF) and its receptor, KGFR play important roles in cell growth and invasion in pancreatic cancer. Administration of recombinant KGF to pancreatic cancer cell lines induced cell growth by dose-dependent manner, and it also activated ERK and p38, a member of MAPK. Lumican belongs to the proteoglycan family. When we regulated lumican expression levels in pancreatic cancer cell line, we found that there is a positive correlation between lumican expression levels and cell growth, ERK activation. Proteoglycan plays an important role in stabilizing the binding of KGF and KGFR. Therefore, lumican may regulate pancreatic cancer cell growth to regulate KGF/KGFR signaling pathway.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

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・膵臓外科学

キーワード：ケラチノサイト増殖因子、ルミカン、膵臓癌、ヒト胎児腎細胞、細胞増殖

## 1. 研究開始当初の背景

ケラチノサイト増殖因子 (KGF) は、線維芽細胞などの間質細胞で産生され、KGFレセプター (KGFR) を介して上皮細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

近年、白血病患者の化学療法により発症する重篤な口内炎や口内潰瘍などの副作用に対して口腔粘膜再生・保護のための治療薬として、リコンビナントヒトKGF (palifermin) がFDAの認可を得て米国での使用が開始された。また、paliferminが転移性大腸癌患者の化学療法によって発症した口内炎の頻度を減少させたとの試験報告もある (J Clin Oncol 24:5194-5200, 2006)。このため、他の固形腫瘍患者においてもpaliferminの投与によって化学療法時の口内潰瘍や、消化管上皮細胞傷害などの副作用を軽減できることが期待されている。しかし、膵臓癌を含む多くの癌細胞ではKGFRを発現しているため、paliferminの投与により治療後に残存する癌細胞の増殖、浸潤、転移を誘導するのではないかと危惧もある。このため、KGFがKGFRを発現する固形腫瘍の増殖・浸潤に対する作用を明らかにすることが急務となっている。

膵臓癌培養細胞の一部では、リコンビナント KGF の投与によって癌細胞の増殖やVEGF の産生が亢進することが明らかにされている。しかしながら、そのシグナル伝達経路については未だ十分に解明されていない。さらに、正常膵管細胞はKGFの産生を示さないが、膵臓癌培養細胞の多くはKGFを産生しており、KGFRを介したオートクライン機序の形成が考えられている (Am J Pathol 153:213-222, 1998)。

一方、近年細胞外に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンによりKGFとKGFRの結合が安定化され、細胞内シグナル伝達系が活性化されることも明らかにされている。プロテオグリカンのうち小型ロイシリッチプロテオグリカン (SLRP) の一つであるlumicanは、膵臓癌や乳癌において細胞外基質で過剰に発現しており、その発現が癌の進行度に関係することが明らかにされている。我々は、膵臓癌培養細胞の一部においてKGFとlumicanの発現に相互関係があることを見出し、これらが共通の転写因子 (NKx2-5) により転写されるとの報告もあることから、両者の相互作用が膵臓癌細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしている可能性があると考えている。また、LumicanとKGFの相互作用によるKGF/KGFR系を介したVEGFの産生誘導やアポトーシスの制御機構は癌細胞の増殖に重要な影響を及ぼし、癌患者の予後の増悪につながる可能性もある。しかし、KGFに

よる細胞の増殖・分化におけるシグナル伝達経路等への作用については未だ不明な点も多いのが現状である。本研究は、膵臓癌細胞におけるKGFのシグナル伝達経路並びにその際のlumicanとの相互作用を詳細に検討し、膵臓癌の増殖・分化におけるKGFの作用について明らかにすることで、KGF/KGFR系の制御による膵臓癌治療の新たな臨床応用方法の開発が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

多くの膵臓癌培養細胞において、KGFやKGFRが発現していることが報告されている。これらの細胞の中でKGFRが発現しているがKGFを産生していない細胞にリコンビナントKGFを投与することで、KGF/KGFR系を介して活性化されるシグナル伝達経路の解明を行うことができる。これにより、未だ十分に明らかにされていないKGF/KGFR系による膵臓癌細胞の増殖やVEGF-A産生に関わるシグナル伝達経路を明らかにする。

また、KGFとプロテオグリカンとの相互作用について検討するために、間質での発現が癌の予後の増悪につながることを明らかにされているSLRPの一種であるlumicanとの相互作用に着目しているが、lumicanが膵臓癌の予後を増悪させる機能については十分には解明されていない。そこで、初めに膵臓癌細胞におけるlumicanの機能を解明することでKGFとの相互作用を検討するための一助とする。培養膵臓癌細胞におけるlumicanの発現を確認したうえで、これらの細胞にlumican cDNAを組み込んだ発現ベクターを導入することで安定過剰発現細胞を作成し、対照細胞と細胞増殖能等の細胞動態について比較検討することでlumicanの機能を明らかにする。また、膵臓癌細胞のlumicanの発現をsiRNAの導入により抑制した際の細胞動態を併せて解析することで、より詳細にlumicanの機能を解析する。そして、それらを制御しているシグナル伝達経路の解析も行う。これらの研究により、KGFやlumicanの制御による膵臓癌細胞の増殖・転移の抑制法の開発を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) リコンビナントKGF投与による膵臓癌細胞増殖能の検討

これまでの研究報告をもとに、KGFRが発現しているがKGFは産生していないMIA PaCa-2細胞にリコンビナントKGF (rKGF) を0、10、100ng/mL投与し24時間、48時間、72時間後の細胞増殖能をMTTアッセイで比較検討した。

### (2) リコンビナントKGF投与による膵臓癌細胞内シグナル伝達経路の検討

1と同様にMIA PaCa-2細胞にrKGFを投与した際のMAPK系の活性を比較検討した。

- (3) 膵臓癌細胞におけるlumicanの発現確認  
Real-time RT-PCR法とWestern blot法を用いて膵臓癌培養細胞であるPANC-1、MIA PaCa-2及びKLM-1細胞におけるlumicanのmRNAとタンパク質の発現を検討した。
- (4) Lumican 安定過剰発現細胞の作製  
pIRES2-EGFP vector (Takara 社) に lumican cDNA を組み込んだ lumican 発現ベクターを作成し、そのベクターを(3)の検討より lumican の発現量が中等度であった PANC-1 細胞に、FuGENE HD (Roche 社) を用い化学的に遺伝子導入した。対照細胞には lumican cDNA を組み込んでいない空ベクターを導入した (Mock) 細胞) を用いた。また、正常上皮細胞における lumican の機能を比較検討するため、HEK293 細胞にも上記方法で遺伝子導入した。Lumican の過剰発現は real-time PCR 法と Western blot 法を用いて検討した。
- (5) 膵臓癌細胞における lumican の発現抑制  
Lumican siRNA (Applied 社) を PANC-1 細胞に Trans IT-siQUEST (Mirous 社) を用い化学的に遺伝子導入した。対照細胞には他の遺伝子発現に影響を与えない negative control siRNA を導入した (NC 細胞)。発現抑制は real-time PCR 法と Western blot 法を用いて検討した。
- (6) Lumican の発現量調節による細胞増殖の検討  
過剰発現株、発現抑制細胞を 24 時間、48 時間、72 時間、96 時間に培養した時の細胞増殖能を MTT アッセイ及び細胞数計測法を用いてそれぞれの対照細胞と比較検討した。
- (7) Lumican の発現量調節による細胞増殖制御系への影響の検討  
過剰発現株、発現抑制細胞より抽出したタンパク質を用いて、細胞増殖を制御している主要なキナーゼとして知られている ERK と AKT のリン酸化について、それぞれの対照細胞と比較検討した。

#### 4. 研究成果

ケラチノサイト増殖因子(KGF)の膵臓癌における機能を検討するため、培養膵臓癌細胞の一つであるMIA PaCa-2細胞を用いて実験を行った。リコンビナントKGFを投与した所、濃度依存的に細胞増殖が誘導されることを明らかにした。次に、KGF/KGFR系により活性化される細胞内シグナル伝達経路を解析したところ、ERKとp38のリン

酸化がリコンビナントKGF投与により濃度依存的に亢進していることが明らかとなった。このことから、KGFはKGFRを介してこれらの経路を活性化することによって膵臓癌細胞の増殖や、以前に報告されているVEGF-Aの産生を誘導することが示唆された。

次に、膵臓癌におけるルミカンの役割を検討するため、培養膵臓癌細胞におけるlumicanの発現を検討したところ、今回使用した3種の培養膵臓癌細胞全てでlumicanのmRNAとタンパク質が発現していることが明らかとなった。また、western blotの結果より、今回使用した培養膵臓癌細胞は、分子量70kDaのタイプのlumicanのみを分泌しており、酵素消化を行った結果、N-結合型の糖鎖が付加されていることが明らかとなった。そこで、上記の実験よりlumicanの発現量が中等度であったPANC-1細胞を用いてlumicanの機能を詳細に検討した。PANC-1細胞にルミカンを遺伝子導入した安定過剰発現株を作成した所、分子量70kDaのlumicanを過剰に分泌しており、その結果lumican過剰発現細胞は細胞増殖能がin vitroとin vivo共に亢進していることが明らかになった。また、siRNAを用いてPANC-1細胞のlumicanの発現を抑制することで、細胞増殖が抑制されることも明らかにした。これらのことから、特異的な分泌型lumicanが過剰に発現することで、膵臓癌細胞の増殖が誘導されることが推測された。そこでこの分泌型lumicanにより制御される細胞増殖に関わるシグナル伝達経路を検討したところ、細胞増殖を制御しているERKのリン酸化がルミカンの発現と正の相関関係が認められたのに対し、同じく細胞増殖を制御しているAKTのリン酸化はルミカンの発現と負の相関関係を示すことが明らかとなった。一方、正常上皮細胞として用いたHEK293細胞にlumicanを遺伝子導入し、過剰発現株を作成したところ、分子量50kDaのlumicanを過剰に分泌していることが明らかとなった。その結果、細胞増殖能が低下し、AKT、ERK、mTORのリン酸化が抑制されていることも明らかになった。この正常細胞と癌細胞で見られたlumicanの機能の違いは、分泌しているlumicanの修飾の違いが重要な役割を果たしていることが示唆された。

プロテオグリカンはKGFのような線維芽細胞増殖因子と受容体の結合を安定化させることが報告されている。

今回、膵臓癌細胞におけるlumicanの過剰発現によりERKが活性化され細胞増殖が誘導されたことから、その機構としてKGFとKGFRとの結合を安定化させた可能性が考えられた。このことから、膵臓癌に特異的に分泌されるlumicanの発現抑制による増殖因子受容体の活性化抑制という新しい機構での膵臓癌治療薬開発の可能性が考えられた。

#### 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1件)

- ① Ishiwata T, Yamamoto T, Kawahara K, Kawamoto Y, Matsuda Y, Ishiwata S, Naito Z. Enhanced expression of lumican inhibited the attachment and growth of human embryonic kidney 293 cells. *Exp Mol Pathol.*, 査読あり, 88: 363-370, 2010

[学会発表] (計5件)

- ①山本哲志、小型ロイシンリッチプロテオグリカン lumican による膵臓癌の増殖・浸潤への影響、第 97 回日本病理学会総会、平成 20 年 5 月 15 日、金沢
- ②山本哲志、膵臓癌の後腹膜浸潤と予後への lumican の関与、第 67 回日本癌学会学術総会、平成 20 年 10 月 28 日、名古屋
- ③山本哲志、Lumican, a small leucine-rich proteoglycan family member has a potential to develop new medicine for the pancreatic cancer patients、米国消化器病週間 2009、平成 21 年 6 月 1 日、米国、シカゴ
- ④山本哲志、Enhanced expression of lumican correlated with pancreatic cancer cell growth、第 68 回日本癌学会総会、平成 21 年 10 月 2 日、横浜
- ⑤山本哲志、Signal transduction pathway analysis to induce cell growth and vascular endothelial growth factor-A release by keratinocyte growth factor in pancreatic cancer cells、第 40 回米国膵臓学会総会、平成 21 年 11 月 5 日、米国、ハワイ

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山本 哲志 (YAMAMOTO TETSUSHI)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20453920

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし