

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390261
 研究課題名（和文） 臨床応用を目的とした膵癌血管新生に対するケモカインの分子生物学的役割の検討
 研究課題名（英文） Biological role of chemokines in pancreatic cancer angiogenesis
 研究代表者
 松尾 洋一（ MATSUO YOICHI ）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：40381800

研究成果の概要（和文）：

膵癌は悪性度の極めて高い癌であり、より効果の高い新しい治療法の開発が急務である。膵癌の増殖、進行には血管新生が必要であり、抗血管新生療法は膵癌治療の一役を担う可能性があると考えられる。膵癌由来の CXC-chemokine は paracrine に血管内皮細胞に作用し、血管新生の各ステップ(血管内細胞の増殖、遊走、管腔形成)を亢進し、腫瘍血管新生を形成することを確認した。CXCR2 Ab を用いた抗体療法はこれらを抑制し、膵癌における抗血管新生療法としての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The prognosis of pancreatic cancer (PaCa) is extremely poor, so new and more effective therapies are clearly needed. The growth of PaCa is dependent on the development of new blood vessels that provide oxygen and nutrients to the tumor cells. We investigated paracrine effects of CXC-chemokines on vascular endothelial cells. CXC-chemokines significantly enhanced proliferation, invasion, and tube formation of vascular endothelial cells. Our results show that CXC-chemokines promote PaCa tumor-associated angiogenesis through CXCR2, suggesting that CXCR2 is an anti-angiogenic target in PaCa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	4,700,000	1,410,000	6,110,000

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

キーワード：膵臓外科学, 膵癌, 血管新生, CXC-Chemokine

1. 研究開始当初の背景

膵癌は悪性度の極めて高い癌であり、診断時にはすでに進行しており、局所浸潤、遠隔転移をきたしていることが多い。既存の化学療法および放射線療法の効果は十分とはい

えず、より効果の高い新しい治療法の開発が急務である。他の固形腫瘍と同様に膵癌の増殖、進行には血管新生が必要であり、よって抗血管新生療法は膵癌治療の一役を担う可能性があると考えられる。主要な膵癌血管新

生因子の一つとして ELR⁺ (Glu-Leu-Arg⁺) CXC-chemokines グループの CXCL8/IL-8 が報告され、我々も CXCL8 の分子生物学的役割について検討、報告を行ってきた。CXCL8 は主に受容体 CXCR2 を介してその血管新生促進作用を生じる。一方、CXCR2 の agonist には、同じ ELR⁺-CXC-chemokine の CXCL1/ GRO- α 、および CXCL5/ENA-78 が知られている。膵癌においては両サイトカインの発現は Wente MN, *et al* が免疫染色にて報告しているのみであり、実際の生体内での発現量や分子生物学的役割に関しては十分に解明されていない。さらに我々は近年、膵癌血管新生に対する ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis の分子生物学的役割について以下のような興味深い結果を報告した。それは (1) 膵癌における ELR⁺-CXC-chemokines 発現は癌-間質相互作用によって制御されている、(2) 膵癌においては ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis は膵癌に autocrine には作用せず、paracrine によってのみ作用して血管新生を亢進させるということである。これらは、膵癌細胞、繊維芽細胞、および血管内皮細胞を 2 週間共培養した後、血管内皮細胞の管腔形成能を定量的に測定することにより確認した(この assay 系は当教室で確立したものである)。レセプターの抑制方法の一つとして抗 CXCR2 抗体を用いる予定である。今回の科研費申請の範囲では、抗 CXCR2 抗体療法の効果を *in vitro* および *in vivo* で検討することを目標としている。有効性が確認された後は、臨床治験へ向けて研究を進める予定である。この抗 CXCR2 抗体療法は米国テキサス州立大学 MD Anderson Cancer Center (MDACC) ではすでに頭頸部腫瘍を中心に臨床治験が始められようとしており、膵癌への応用も現実性が高いと考えられる。膵癌での臨床治験に関しては、MDACC の消化器内科(Sushovan Guha, M. D., Ph. D; 研究協力者)との共同研究で行う予定である。

2. 研究の目的

今まで我々は、IL-8/CXCL8-CXCR2 axis が膵癌血管新生に与える分子生物学的役割を報告してきた。しかしながら IL-8/CXCL8 の制御による抗腫瘍効果は臨床応用までにはいたっていない。近年、CXCR2 のリガンドには CXCL8 に加えて CXCL1 および CXCL5 が存在することが報告された。そこで ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis による膵癌血管新生には、CXCL8 に加えて CXCL1 および CXCL5 が関与していると考え、*in vitro* および *in vivo* におけるこれら ELR⁺-CXC-chemokines の発現量を測定し、recombinant および腫瘍由来 ELR⁺-CXC-chemokines が血管新生の各過程(血管内皮細胞増殖、遊走、管腔形成)に与える

影響を検討、レセプターの抑制により膵癌血管新生能が減少されるかどうかを *in vitro* および *in vivo* で検討する。

3. 研究の方法

(1)膵癌および正常膵における ELR⁺-CXC-chemokines 発現の比較

①膵液検体の収集. Noh KW *et al* の手技にしたがって内視鏡的に膵液 (SSEPS) を prospective に回収する。症例は CT, MRI, ERCP, および病理検査等により総合的に正常膵と膵癌を鑑別診断する。②細胞培養上澄の回収. 膵癌細胞株 (BxPC-3, AsPC-1, Capan-2, SW 1990, Panc-1, Panc-28, Colo 357, および MIA PaCa-2) と正常膵管上皮細胞株 (HPDE) を 24, 48, および 72 時間培養しその上澄を回収する。③膵液および細胞培養上澄中の CXCL1, CXCL5, および CXCL8 濃度を ELISA で測定する。また各 ELR⁺-CXC-chemokines の総計 Σ ELR⁺-CXC-chemokines を測定し、膵癌由来および正常膵由来の膵液中の ELR⁺-CXC-chemokines 濃度を比較検討する。同様に膵癌細胞株および HPDE の培養上澄中の ELR⁺-CXC-chemokines 濃度を比較検討する。

(2)膵癌細胞および血管内皮細胞における functional ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis の確認. 膵癌細胞・血管内皮細胞 (VEC) の CXCR2 発現有無を RT-PCR・Western Blot にて確認する。

(3) ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis による VEC の増殖能の変化の検討 VEC の増殖能の変化は Celltiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS-assay) を用いて測定する。Recombinant CXCL1, CXCL5, および CXCL8 で処理を行い VEC の増殖へ与える影響を検討する。

(4) ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis による VEC の浸潤能の変化の検討. recombinant および膵癌由来 ELR⁺-CXC-chemokines による VEC の浸潤能の変化を Matrigel invasion assay (BD Bioscience 社)にて評価する。double chamber 法で lower chamber に膵癌細胞, upper chamber には VEC を培養し、抗 CXCR2 siRNA により膵癌由来 ELR⁺-CXC-chemokines が VEC の浸潤能に及ぼす影響を検討する。

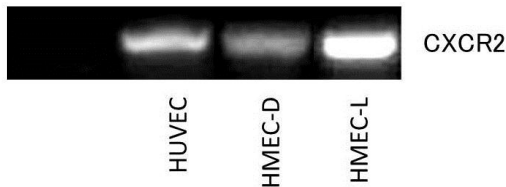
(5) ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis による VEC の管腔形成能の変化の検討. On Matrigel 法で *in vitro* angiogenesis assay を行う。recombinant ELR⁺-CXC-chemokines で tube formation が亢進することを確認した後、VEC および膵癌細胞を double chamber 法にて共培養し、VEC の tube formation の変化を検討する。さらに抗 CXCR2 抗体処理を行い、ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis が VEC の管腔形成能に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 膵癌および正常膵における ELR⁺-CXC-chemokines 発現の比較.

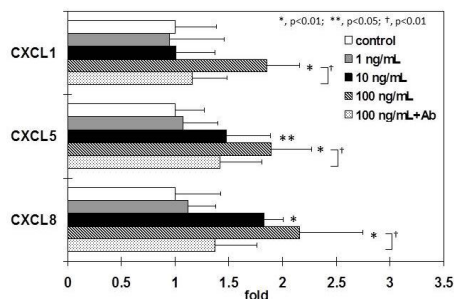
膵液検体を ELISA で検索したところ, 正常膵に対して, 膵癌患者の膵液は有意に ELR⁺-CXC-chemokine が高値であった (p<0.002). 膵癌細胞株 8 種類 (BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2, Panc-1, SW 1990, Capan-2, Colo357, Panc-28) のうち Panc-1 を除く 7 種類が, 正常膵管上皮細胞 (HPDE) より CXC-chemokine の分泌量が有意に多かった. (2) 膵癌細胞および血管内皮細胞における functional ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis の確認. 上記膵癌細胞株 8 種類を用いて RT-PCR および Western blot にて CXCR2 発現を確認したが, いずれも発現を認めなかった. 血管内皮細胞 (HUVEC, HMEC-D, HMEC-L) は CXCR2 発現を認めた.

RT-PCR



(3) 膵癌細胞株 (BxPC-3 および MIA PaCa-2) を CXC-chemokine の CXCL1, CXCL5, および CXCL8 で刺激をして増殖能の変化を検討したが, CXC-chemokine は膵癌細胞株の増殖能に影響を与えなかった. 血管内皮細胞 (HUVEC) の増殖能は CXCL1 および CXCL5 の刺激で増殖能の亢進傾向を認めたが, 有意差はなかった. CXCL8 は HUVEC の増殖能を有意に亢進した. CXC-chemokine を多く分泌する BxPC-3 の調整培地を用いて, HUVEC の増殖能の変化を検討したところ, HUVEC の増殖能は有意に増加した. またそれは CXCR2 の中和抗体 (CXCR2 Ab) で有意に抑制された.

(4) ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis による血管内皮細胞の浸潤能の変化の検討. CXCL1, CXCL5, および CXCL8 刺激により, 血管内皮細胞 (HUVEC) の浸潤能は有意に亢進した. またこれは, CXCR2 Ab (中和抗体) により有意に抑制された.

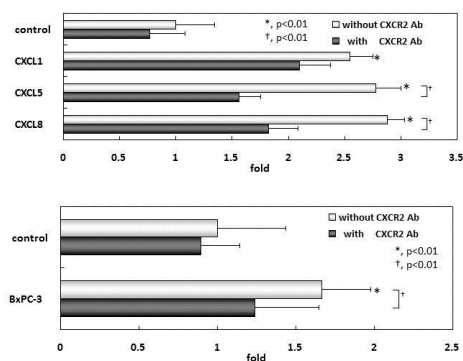


同様に, double chamber を用いた, 膵癌細胞と血管内皮細胞 (HUVEC) との共培養による, HUVEC の浸潤能の変化を検討した. CXC-chemokine の分泌能の高い BxPC-3 や SW 1990 との共培養で HUVEC の浸潤能は有意に亢進をして, これは CXCR2 Ab (中和抗体) により有意に抑制された.

(5) ELR⁺-CXC-chemokines/CXCR2 axis による VEC の管腔形成能の変化の検討.

HUVEC を用いた on matrigel angiogenesis assay を施行した. CXC-chemokine は有意に HUVEC の血管新生能を亢進した. また, BxPC-3 の調整培地を用いて行った同様の血管新生実験で, HUVEC は血管新生能を亢進し, それは CXCR2 Ab で抑制された.

On Matrigel Angiogenesis Assay



以上より, 膵癌由来の CXC-chemokine は paracrine に血管内皮細胞に作用し, 血管新生の各ステップ (血管内皮細胞の増殖, 遊走, 管腔形成) を亢進し, 腫瘍血管新生を形成すると考えられた. CXCR2 Ab を用いた抗体療法はこれらを抑制し, 膵癌における抗血管新生療法としての可能性が示唆された.

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 9 件)

- ① Miyai H, Hara M, Hayakawa T, Takeyama H. Establishment of a simple predictive scoring system for pancreatic fistula after laparoscopy-assisted gastrectomy. Dig Endosc, 55, 2013, in press, DOI: 10.1111/den.120424
- ② Koide S, Matsuo Y, Ochi N, Takahashi H, Funahashi H, Sato M, Okada Y, Takeyama H. HGF derived from stromal cells enhances angiogenesis in human colon cancer cell lines. Nagoya Med J, peer reviewed, 52, 2012, 217-232
- ③ 社本智也, 松尾洋一, 竹山廣光. EPA とレゾルビン. 臨床栄養トピックス, 査読無, 52, 2012, 494-498
- ④ Matsuo Y, Wakasugi T, Funahashi H, Ochi

- N, Koide S, Tsuboi K, Takeyama H. Interleukin-1 α regulates VEGF production from gastric cancer cell lines and relation to angiogenesis. 9th International Gastric Cancer Congress, 査読無, 2011, 149-152
- ⑤ Matsuo Y, Sawai H, Ochi N, Yasuda A, Sakamoto M, Takahashi H, Funahashi H, Takeyama H, Guha S. Proteasome inhibitor MG132 inhibits angiogenesis in pancreatic cancer by blocking NF- κ B activity. Dig Dis Sci, peer reviewed, 55, 2010, 1167-1176
DOI:10.1007/s10620-009-0814-4
- ⑥ Ma J, Sawai H, Matsuo Y, Ochi N, Yasuda A, Takahashi H, Wakasugi T, Funahashi H, Sato M, Takeyama H. IGF-1 mediates PTEN suppression and enhances cell invasion and proliferation via activation of the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway in pancreatic cancer cells. J Surg Res, peer reviewed, 160, 2010, 90-101
DOI:10.1016/j.jss.2008.08.016
- ⑦ Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ochi N, Tong Z, Deorukhkar A, Sung B, Kelland L, Jamieson S, Sutherland R, Raynham T, Charles M, Bagherzadeh A, Foxton C, Boakes A, Farooq M, Maru D, Diagaradjane P, Matsuo Y, Sinnett-Smith J, Gelovani J, Krishnan S, Aggarwal BB, Rozengurt E, Ireson CR, Guha S. A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther, peer reviewed, 9, 2010, 1136-1146
DOI:10.1158/1535-7163
- ⑧ Takayama S, Takahashi H, Matsuo Y, Okada Y, Takeyama H. Effect of *helicobacter bilis* infection on human bile duct cancer cells. Dig Dis Sci, peer reviewed, 2010, 1905-1910
DOI:10.1007/s10620-009-0946-6
- ⑨ Xu D, Matsuo Y, Ma J, Koide S, Ochi N, Yasuda A, Funahashi H, Okada Y, Takeyama H. Cancer cell-derived IL-1 α promotes HGF secretion by stromal cells and enhances metastatic potential in pancreatic cancer cells. J Surg Oncol, peer reviewed, 102, 2010, 469-477
DOI: 10.1002/jso.21530
- [学会発表] (計 30 件)
- ① 松尾洋一、膵癌における PKD inhibitor (低分子化合物阻害剤) の効果の検討、第 50 回日本癌治療学会学術集会、2012 年 10 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 松尾洋一、分子標的治療を目的とした膵癌 Protein Kinase D (PKD) signal 機構の解明、第 54 回日本消化器病学会大会、2012 年 10 月 10 日、神戸国際会議場 (兵庫県)
- ③ 松尾洋一、膵癌における PKD の役割と分子標的治療の可能性、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌 (北海道)
- ④ 松尾洋一、大腸癌血管新生における癌-間質相互作用の役割と HGF の関与、第 67 回日本消化器外科学会総会、2012 年 7 月 20 日、富山国際会議場 (富山県)
- ⑤ 坪井 謙、亜熱帯性ハナシヨウガの成分、Zerumbone は胃癌細胞株 AGS の血管新生を抑制する、第 67 回日本消化器外科学会総会、2012 年 7 月 20 日、富山国際会議場 (富山県)
- ⑥ 松尾洋一、膵癌における Protein Kinase D (PKD) の分子生物学的役割の検討、第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会、2012 年 7 月 12 日、オリエンタルホテル広島 (広島県)
- ⑦ 松尾洋一、Natural product (Zerumbone) の抗癌作用に関する検討、日本外科代謝栄養学会第 49 回学術集会、2012 年 7 月 6 日、シェラトン・グランデ・トウキョウベイホテル (東京都)
- ⑧ 社本智也、膵癌細胞における zerumbone の VEGF・IL8 分泌抑制による血管新生抑制効果の検討、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 14 日、幕張メッセ (千葉県)
- ⑨ 松尾洋一、膵癌におけるサイトカインネットワークの解明と分子標的治療への応用、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 13 日、幕張メッセ (千葉県)
- ⑩ 高橋広城、Bcl xL と Mcl 1 は Gemcitabine 抵抗性膵癌における治療ターゲットとなりうる、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 13 日、幕張メッセ (千葉県)
- ⑪ 松尾洋一、炎症と消化器癌～NF- κ B を中心とした炎症性サイトカインネットワークと腫瘍血管新生、第 53 回日本消化器病学会大会、2011 年 10 月 21 日、福岡国際センター (福岡県)
- ⑫ Matsuo Y, Cytokine network in pancreatic cancer: IL-1 α from cancer cells and HGF from stromal cells oo-operatively enhance the pancreatic cancer angiogenesis. International Surgical Week 2011, 2011 年 8 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑬ 小出修司、Gemcitabine 耐性膵癌細胞株は CXCL-8 産生・分泌の亢進により血管新生を促進する、第 66 回日本消化器外科学会総会、2011 年 7 月 13 日、名古屋国際会議場 (愛知県)

- ⑭高橋広城、膜結合ケモカイン(CX3CL1, CXCL16)の発現が膵癌に及ぼす影響、第20回日本がん転移学会学術集会・総会、2011年6月30日、アクトシティ浜松(静岡県)
- ⑮松尾洋一、膵癌におけるanti-CXCR2 Ab療法、第15回日本がん分子標的治療学会学術集会、2011年6月23日、ホテル日航東京(東京都)
- ⑯Matsuo Y, Interleukin-1 α regulates VEGF production from gastric cancer cell lines and is associated with both metastatic potential and angiogenesis. 9th International Gastric Cancer Congress, 2011年4月22日, COEX Convention Center (Seoul, Korea)
- ⑰松尾洋一、消化器癌血管新生における癌-間質相互作用の役割とサイトカインの関与、第21回日本消化器癌発生学会総会、2010年11月19日、軽井沢プリンスホテル(長野県)
- ⑱松尾洋一、ZerumboneはCXCR4発現を抑制し癌の浸潤能を低下する、第48回日本癌治療学会学術集会、2010年10月30日、国立京都国際会館(京都府)
- ⑲舟橋 整、膵癌細胞の活動性の変化に対するグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)を介したuPAとMMPの役割、第8回日本消化器外科学会大会、2010年10月16日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑳松尾洋一、CXC-Chemokine/CXCR2 axis～膵癌血管新生に対する新たな分子標的治療、第52回日本消化器病学会大会、2010年10月15日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ㉑松尾洋一、膵癌由来IL-1 α は間質由来のHGF分泌を促進し、転移能に関与する、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議場(大阪府)
- ㉒小出修司、膵癌細胞のゲムシタピン耐性獲得はIL-8産生の活性化により血管新生を促進する、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議場(大阪府)
- ㉓舟橋 整、n-6とn-3多価不飽和脂肪酸(PUFA)の膵癌細胞に対する効果、第65回日本消化器外科学会総会、2010年7月15日、下関市民会館(山口県)
- ㉔松尾洋一、膵癌におけるanti-CXCR2 Ab療法～膵癌血管新生に対する新たな分子標的薬剤の可能性、第65回日本消化器外科学会総会、2010年7月15日、下関市民会館(山口県)
- ㉕Funahashi H, Stimulating actions of N-6 polyunsaturated fatty acid on pancreatic cancer cell proliferation and invasion. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010, 2010年7

- 月12日、福岡国際会議場(福岡県)
- ㉖松尾洋一、膵癌血管新生における癌-間質相互作用の役割とサイトカインの関与、第19回日本がん転移学会学術集会・総会、2010年6月16日、金沢市文化ホール(石川県)
- ㉗松尾洋一、膵癌血管新生における腫瘍由来IL-1 α と間質由来HGFの役割、第22回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2010年5月27日、仙台国際センター(宮城県)
- ㉘Ochi N, Can lipocalin 2/NGAL in exocrine pancreatic secretions distinguish chronic pancreatitis from pancreatic cancer? Digestive Disease Week 2010, 2010年5月4日, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)
- ㉙舟橋 整、神経栄養因子による膵癌細胞の増殖能の変化に対するuPAとMMPの役割、第110回日本外科学会定期学術集会、2010年4月8日、名古屋国際会議場(愛知県)
- ㉚松尾洋一、膵癌浸潤・血管新生におけるCXCL12の役割とシグナルの解明、第110回日本外科学会定期学術集会、2010年4月8日、名古屋国際会議場(愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 洋一 (MATSUO YOICHI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：40381800

(2) 研究分担者

舟橋 整 (FUNAHASHI HITOSHI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：10347411

岡田 祐二 (OKADA YUJI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：10305550

竹山 廣光 (TAKEYAMA HIROMITSU)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：00216946

小出 修司 (KOIDE SYUJI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医
 研究者番号：90569261