

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 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591437

研究課題名（和文） PSTI の新規結合タンパク・レセプターの解析

研究課題名（英文） Analysis of the new joint protein receptor of PSTI

研究代表者

尾崎 宣之（OZAKI NOBUYUKI）

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：40551255

研究成果の概要（和文）：

本研究では膵分泌性トリプシンインヒビターに注目し、膵癌とPSTI との関係の解明、PSTI との新規レセプターの解明及びそれをターゲットとした治療戦略を目標とした。新規レセプターに関しては、EGFR 以外に有効な受容体を同定できなかった。PSTI 遺伝子発現を、遺伝子改変技術を用いて制御することで、2 種類の発症機序の異なる遺伝子改変慢性膵炎モデルマウスを樹立し、膵線維化に関わる膵星細胞の活性化、Kras 遺伝子、EGFR ファミリー遺伝子、INK4a 遺伝子の発現を調べた。膵管様構造を形成する腺房細胞では Ki67 陽性で、異常な増殖を示していた。拡張した膵管上皮の一部は過形成が見られ、PanIN と類似していた。異常な増殖を示す腺房細胞と共に、この過形成上皮細胞でも EGFR 陽性であり、すでに慢性膵炎の状態でも Kras 遺伝子、EGFR ファミリー遺伝子の発現上昇が見られ、前癌状態への移行期であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We aimed for the treatment strategy which assumed pancreatic cancer and elucidation of a new receptor with PST. About a new receptor, we were not able to identify an effective receptor except EGFR. So, we established chronic pancreatitis model mouse of two kinds of onset mechanism by controlling PSTI gene expression using gene change technology and examined activation of a pancreas stellate cell concerned with pancreatic fibrosis, Kras gene, EGFR family gene, expression of INK4a gene. We showed an abnormal increase with Ki67 positive acini cell which formed duct-like structure. Expression of a Kras gene, an EGFR family gene was already present in conditions of chronic pancreatitis, and it was suggested that it was a transition stage to precancerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：PSTI, SPINK1, TATI, 膵癌, 慢性膵炎, EGFR

1. 研究開始当初の背景

毎年日本で 22,000 人が死亡する膵臓癌は、癌死の中では肺、胃、大腸、肝臓に続いて第 5 位で、最近食事の欧風化に伴い増加傾向にある。難治癌である膵臓癌の治療成績は、いまだ満足するものでなく、根治的な治療は、外科的切除であるが、診断時された 7~8 割は既に切除手術の対象とならない進行癌であり、抗癌剤治療の対象となる。つまり、現段階においては、膵臓癌の早期発見方法の開発と、進行症例に対する有効な治療法の確立が急務である。しかしながら、現在進行膵癌に対する標準治療薬はゲムシタビン (Gemcitabine; 商品名ジェムザール) であるが、その奏効率は 10~20%程度で、しかも効果は症状の緩和と生存期間の延長であり、治療は望めない。そのためゲムシタビンを上回る効果を目指し、世界中で新しい化学療法の研究・開発が進められている。

ゲフィチニブは、上皮成長因子受容体 (EGFR 別名、HER-1 あるいは ErbB1) チロシンキナーゼ阻害薬 (Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitor; EGFR-TKI) であり、EGFR の ATP 結合部位に ATP と競合的に結合して自己リン酸化を阻害することによりシグナル伝達を遮断して、細胞の増殖や分化を抑制する薬として開発された。膵臓癌の前癌病期に起こる KRAS の活性化には epidermal growth factor (EGF)-family signaling が関わっていること (Nature Review Vancer 2002)、EGFR が過剰発現した膵癌患者では予後不良であること (Anticancer Res 1993) 等のデータから、膵癌におけるゲフィチニブの有用性が示されている。実験レベルでは、EGFR を発現するさまざまな膵臓癌細胞に有効であることが示された (Cancer Res 2006) が、臨床的には有効性が確立されていない (Oncology 2006)。膵臓にはユニークなトリプシン・インヒビターが存在している。膵分泌性トリプシン・インヒビター (pancreatic secretory trypsin inhibitor; PSTI、別名 serine protease inhibitor, Kazal type 1; SPINK1) と呼ばれるその蛋白は、当初、膵臓からトリプシン特異的なインヒビターとして同定されたが、膵臓以外にも消化管上皮や、男性生殖器にも発現している。また、Huhtala ML らが、婦人科癌患者の尿中に分泌される癌特異的のマーカとして同定した Tumor associated trypsin inhibitor; TATI (Int J Cancer 1983) は、その後の解析から PSTI と同一であることが確認された。PSTI は婦人科癌、特に卵巣癌や、膀胱癌、腎臓癌で発現している以外にも、大腸癌 (Br J Cancer 1990)、肝臓癌 (Int J Cancer 1993) および肺癌 (Tumour Biol 1992) でも

発現が確認されており、トリプシン・インヒビター以外にも何らかの役割を担っている可能性が示唆される。PSTI は細胞増殖活性をもつことは知られていたが (JEM 1990)、構造的に EGF と類似しており、EGFR に EGF と同程度の親和性で結合することが知られていた (BBRC 1987)。我々はこの PSTI が EGFR のリガンドとなり、おもに MAPK カスケードを介して、細胞増殖活性を有することを証明した (Ozaki et. al. Mol Cancer Res 2009)。つまり膵臓、おもに外分泌を担う腺房細胞に多量に含まれ、膵液とともに分泌されている PSTI が、実は EGFR のリガンドであり、あとは炎症 (慢性膵炎) や癌によって EGFR が過剰に発現してくることで (通常 EGFR は発現していない)、初めて EGFR のリガンドとして機能する、という可能性を示した。ではなぜ、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬が膵臓癌に有効ではないのか? その可能性の一つとして考えられるのが、実は PSTI には EGFR 以外にもレセプターが存在しているためである。実際、大阪大学の Niinobu らは PSTI には固有のレセプターが存在し、そのサイズは約 140kDa (EGFR は約 170kDa) と指摘している (JEM, 1990)。この新規レセプターが、PSTI 固有のレセプターであり、MAPK カスケードを介して膵臓癌の増殖に関わっている可能性がある。

2. 研究の目的

難治癌である膵臓癌の治療成績は、いまだ満足するものではない。様々な癌の治療戦略が研究されているが、本研究では膵分泌性トリプシンインヒビターに注目し、膵癌と PSTI との関係の解明、PSTI との新規レセプターの解明及びそれをターゲットとした治療戦略を目標とする。

3. 研究の方法

確立された膵癌細胞株を用いて SPINK1 の発現、siRNA を用いた細胞増殖抑制等を検討する。抗 PSTI 抗体を使用し、PSTI と結合しているタンパクを液体クロマトグラフィーや質量分析計にて網羅的に解析し、PSTI と結合する新規タンパク・受容体を同定する。いずれの系においても、*in vitro* で得られたデータを基に *in vivo* での実験を計画し、最終的には臨床応用を目指す。

(1) siRNA を用いた SPINK1 Knockdown の実験

様々な膵癌細胞株に siRNA を用いて SPINK1 を Knockdown し、細胞増殖抑制の効果を再確認する。

(2) PSTI に特異的に結合するタンパクの同定

既にヒト PSTI に対する抗体を作製し、ウェスタンブロットリング、免疫染色、免疫沈降法で使用可能であることを確認した。今回は PSTI に結合する新規タンパクを検出することが目的であるため、Anti-PSTI 抗体で免疫沈降を行う。

A. 免疫沈降実験：

今回は免疫沈降に Anti-PSTI 抗体を用いる。Dynabeads Protein G は粒径 $2.8\mu\text{m}$ の均一なビーズ表面に Protein G を共有結合で固定化した磁性ビーズで、まずこのビーズに Anti-PSTI 抗体を結合させ、上記の PSTI を添加した細胞株のライセートと反応させる。Anti-PSTI 抗体-PSTI 蛋白-未知タンパク複合体を抽出する。なおこの Dynabeads という磁気ビーズを用いることで、background が非常に低くなるとされている。

B. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS)：

上記免疫沈降法にて抽出した PSTI と結合するタンパクを液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS) を用いて網羅的に解析する。Niinobu らの報告 (JEM vol1172, p1133, 1990) では、固有のレセプターのサイズは約 140kDa と指摘しているため、分子量等も考慮しつつ解析結果のタンパクを絞り込む。

C. ウェスタンブロットリング法：

上記の方法で得られた PSTI と結合する新規タンパクもしくはレセプターが既知のものであれば、その抗体を用いて、再度 PSTI を添加した細胞株のライセートを用いてウェスタンブロットリング法にてバンドの確認を行う。

(3) PSTI-R の解析

正常組織および固形癌における局在
PSTI は膵臓以外にも消化管や泌尿器系、生殖器系にも発現が見られることから、レセプターも広範に存在する可能性がある。RT-PCR 法、ノーザンブロットリング法、in situ hybridization 法で、レセプターおよび PSTI の局在を確認する。すでに既知のレセプターであった場合、抗体が既に市販されていれば、免疫染色法を行うが、抗体が市販されていなかったり、未知のレセプターであった場合、抗体の作製が必要である。さらにリン酸化抗体を用いて、細胞増殖活性が見られるのかどうか、もし細胞増殖活性があれば、その主要なカスケードは何か、等を検討する。

(4) シグナル伝達の解析

EGFR knockout 線維芽細胞を用いた解析
PSTI は EGFR にも結合して、活性化させるため、まず EGFR をノックアウトする (あるいは siRNA を用いたノックダウン) ことが必要

である。ノックアウトについてはすでにノックアウトマウスが報告されており (Science, Vol. 269, No. 5221, 1995、Nature, Vol. 376, No. 6538, 1995, p. p. 337-341. Science, Vol. 269, No. 5221, 1995, p. p. 234-238.) 入手が可能である。線維芽細胞を樹立し、SPINK3 存在、非存在下で Ras/Raf/MAPK

(Mitogen-Activated Protein Kinase、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ) 経路、PI3K (Phosphoinositide-3 Kinase、フォスフォイノシトール 3 キナーゼ) /Akt 経路、Jak/STAT 経路の EGFR のシグナル伝達経路として主要な経路をまず調べる。

(5) PSTI-R 過剰発現細胞を用いた解析

この新規レセプターの cDNA を用いて、過剰発現した細胞ラインの樹立を行う。PGK (phosphoglycerate kinase、ハウス・キーピング遺伝子) プロモーターの下流に cDNA を結合したコンストラクションを作製し、*in vitro* での解析にはリポフェクション法 (LIPOFECTAMINETM 2000 (LIFE TECH))、*in vivo* の解析にはトランスジェニックマウスの作製を行う。

(6) 抗体の作製、薬の開発

細胞内シグナル伝達系を制御することでがん細胞の増殖、浸潤、転移を阻害する分子標的治療法が開発が進められている。今回の新たな PSTI に対する新規レセプターも癌の発育に関与している可能性があるため、*in vitro*、*in vivo* で細胞の増殖、浸潤の抑制効果を示す抗体が不可欠である。ErbB ファミリーは細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞内領域を有しているため、この新規レセプターにも類似した構造を有すると推定できる。シグナル伝達を阻害するのに必要な領域を探索するための複数のペプチド抗体 (細胞外および細胞内領域) を作製し、PSTI-R 高発現癌腫における抗ヒト PSTI-R 抗体による抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

既にヒト PSTI に対する抗体を作製し、同抗体を使用し、Dynabeads Protein G ビーズに Anti-PSTI 抗体を結合させ、上記の PSTI を添加した細胞株のライセートと反応させる。Anti-PSTI 抗体-PSTI 蛋白-未知タンパク複合体を抽出する。上記工程で得られたタンパクを液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS) を用いて網羅的に解析した。この工程において background が解析の妨げとなり (Keratin 等) 上記 background を少しでも減少させるため、Anti-PSTI 抗体-PSTI 蛋白-未知タンパク複合体を ZOOM IEF Fractionator にて pH 別にフラクションし、得られたタンパクを銀染色でさらに

フラクシヨネーションした。Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F precursor等の新規タンパクを抽出することができたが、当初の目的であった新規レセプターの同定には至らなかった。しかし、EGFRはこのフラクシヨンからは抽出され、EGFRのリガンドの一つに PSTI があることが再確認された。以前の報告での約 140kDa の PSTI との結合タンパクは EGFR の可能性が高いことを示唆させる所見であった。

新規レセプターの解析が EGFR 以外に抽出できないことより、EGFR の下流のカスケードの解析を進めていくこととした。PSTI が慢性炎症と癌化をつなぐ一因子である可能性にも注目している。PSTI 遺伝子発現を、遺伝子改変技術を用いて制御することで、2 種類の発症機序の異なる遺伝子改変慢性膵炎モデルマウスを樹立し、膵線維化に関わる膵星細胞の活性化、Kras 遺伝子、EGFR ファミリー遺伝子、INK4a 遺伝子の発現を調べた。膵管様構造を形成する腺房細胞では Ki67 陽性で、異常な増殖を示していた。拡張した膵管上皮の一部は過形成が見られ、PanIN と類似していた。異常な増殖を示す腺房細胞と共に、この過形成上皮細胞でも EGFR 陽性であり、すでに慢性膵炎の状態でも Kras 遺伝子、EGFR ファミリー遺伝子の発現上昇が見られ、前癌状態への移行期であることが示唆された。

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. Hashimoto D, Takamori H, Ozaki N, Tanaka H, Hirota M, Baba H
「Prediction of operative morbidity after pancreatic resection.」
Hepato-Gastroenterology(in press)
査読有 2013
2. Ozaki N, Ohmuraya M, Ida S, Hashimoto D, Ikuta Y, Chikamoto A, Hirota M, Baba H
「Serine protease inhibitor Kazal type 1 and epidermal growth factor receptor are expressed in pancreatic tubular adenocarcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm, and pancreatic intraepithelial neoplasia.」
J Gastroenterol (Published Online) 査読有 2013
DOI : 10.1007/s00534-012-0587-6

[学会発表] (計 83 件)

1. 尾崎宣之、近本 亮、生田義明、橋本大輔、渡邊雅之、別府 透、馬場秀夫

「膵発癌における Serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) と Epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現とその意義」

第 25 回日本消化器癌発生学会 2012 年 11 月 15 日 徳島県 ルネッサンスリゾートナルト

2. 大村谷昌樹、能登原憲司、荒木喜美、馬場秀夫、山村研一

「慢性膵炎モデルマウスでは癌関連遺伝子の異常が引き起こされる」

第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 20 日 北海道 札幌市教育文化会館

3. 井田 智、大村谷昌樹、岩槻政晃、長井洋平、岩上志朗、宮本裕士、林 尚子、渡邊雅之、馬場秀夫

「膵分泌性トリプシンインヒビター (PSTI) は炎症性腸疾患関連発癌・進展に寄与する」

第 74 回大腸癌研究会 2011 年 1 月 23 日 福岡県 アクロス福岡

4. 中原 修、高森啓史、堀野 敬、近本 亮、田中 洋、古橋 聡、阿部真也、別府 透、馬場秀夫

「膵内分泌腫瘍に対する超音波内視鏡下穿刺吸引生検 (EUS-FNA) の有用性」

第 6 回 NET Work Japan 2011 年 1 月 22 日 東京都 品川プリンスホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 宣之 (OZAKI NOBUYUKI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：40551255

(2) 研究分担者

馬場 秀夫 (BABA HIDEO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20240905

近本 亮 (CHIKAMOTO AKIRA)

熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10419640

石河 隆敏 (ISHIKO TAKATOSHI)

熊本大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：00343351

高森 啓史 (TAKAMORI HIROSHI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：90363514