

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592019

研究課題名(和文) 臨床応用を目的とした膵癌における Lipocalin-2 の分子生物学的役割の検討

研究課題名(英文) Biological role of Lipocalin-2 in pancreatic cancer angiogenesis

研究代表者

竹山 廣光 (Takeyama, Hiromitsu)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00216946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：膵癌では Moniaux N et al. が免疫染色により、早期膵癌で Lcn2 発現が増強され、進行膵癌では発現が減弱すること(early biomarker)を報告している。今回のわれわれの報告は、Lcn2 の発現が減弱する進行癌では、血管新生が亢進することを示唆するものである。Lcn2 は膵癌の early biomarker だけでなく、新たな膵癌血管新生抑制因子としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Besides the previous report that Lipocalin-2 (Lcn2) expression occurs in the early stage of pancreatic cancer (PaCa) development, our results revealed that the overexpression of Lcn2 blocks invasion and angiogenesis of PaCa. So Lcn2 may be not only an early biomarker in PaCa but also a novel suppressor of PaCa angiogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・膵臓外科学

キーワード：膵癌 Lipocalin-2 血管新生 浸潤

1. 研究開始当初の背景

Lipocalin-2(Lcn2)は炎症によって主に上皮細胞から分泌される 25-kDa の acute phase protein であるが、近年、乳癌、大腸癌、肺癌、卵巣癌などの悪性腫瘍での分泌促進が報告されている。しかしながら臓器によってその性質の報告は様々で、乳癌では Lcn2 の発現は悪性度に相関していると報告される一方、卵巣癌では癌の進行に抑制的に働くことが報告されており、Lcn2 は臓器特異的に作用することが推測される。膵癌では Moniaux N et al. が免疫染色により、早期膵癌で Lcn2 発現が増強され、進行膵癌では発現が減弱すること(early biomarker)を報告しているが、Lcn2 の分子生物学的役割は未だ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

近年 Lipocalin-2(Lcn2)と癌との関連は散見するが、膵癌では早期で強発現する early biomarker としての報告を認めるのみで、その分子生物学的役割は解明されていない。我々は癌の進行に伴って Lcn2 の発現が現弱することにより、Lcn2 の抗腫瘍効果を考え、Lcn2 の血管新生抑制機序を解明し、膵癌治療への応用を検討する。

3. 研究の方法

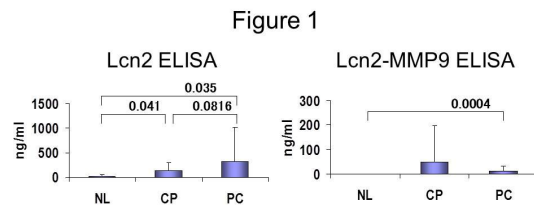
(1)臨床検体を用いた Lipocalin-2(Lcn2)発現の検討 手術症例の臨床検体を用いて Lcn2 の免疫染色を行う。内視鏡的に採取した膵液中の Lcn2 と MMP-9/Lcn2 complex の濃度を ELISA で測定する。

(2)Lcn2 の分子生物学的役割の検討 (*in vitro*):Lcn2 の導入によって生じる細胞特徴の変化の特徴を、増殖実験 (WST-1 assay)、浸潤実験、および血管新生実験で評価検討する。

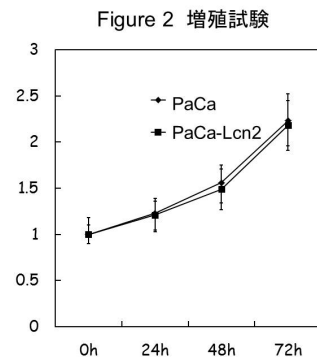
(3)Lcn2 による血管新生因子の変化の検討: 既存の血管新生因子(VEGF)の Lcn2 による変化を ELISA で検討する。

4. 研究成果

(1) 臨床検体を用いた免疫組織学的は検討を行った。Lcn2 は正常膵では 26%が陽性、膵癌では 45.2%が陽性で、これは統計学的に有意差を認めた。正常膵 21 症例、慢性膵炎 23 症例、膵癌 52 症例の合計 96 症例の膵液中の Lcn2 と MMP-9/Lcn2 complex の濃度を測定した。Lcn2 のレベルは、慢性膵炎群と正常群 (p values=0.0041)、膵癌群と正常膵群 (p values=0.0035) で有意な差を認めた。慢性膵炎群と膵癌群については、膵癌群で Lcn2 が高い傾向があった (p values=0.0816)。MMP-9/Lcn2 Complex のレベルは、膵癌群と正常膵群で有意な差を認めたが (p values=0.0004)、慢性膵群と膵癌群の間には、有意差は得られなかった。Lcn2 のレベルは、慢性膵炎および膵癌の存在を検出するのに役立つ可能性が示唆された(Figure 1)。

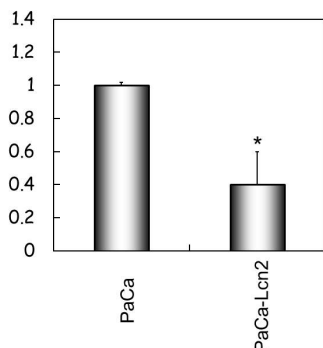


(2)膵癌細胞(PaCa)に Lcn2 を強発現した PaCa-Lcn2 を作成した。つぎに Lcn2 の導入によって生じる細胞特徴の変化の特徴を、増殖実験 (WST-1 assay)、浸潤実験、で評価検討した。PaCa-Lcn2 と PaCa は増殖能に変化を認めなかった(Figure 2)。



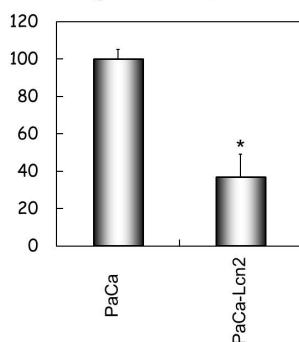
PaCa-Lcn2 の浸潤能は PaCa に比較して有意に低下した(Figure 3)。

Figure 3 浸潤実験



PaCa-Lcn2はPaCaに比較して有意に血管内皮細胞の管腔形成能を低下させた(Figure 4)。

Figure 4 血管新生実験



(3)Lcn2による血管新生因子(VEGF)発現の変化を検討した。PaCaおよびPaCa-Lcn2の細胞培養上澄中のVEGF濃度はそれぞれ、 800 ± 26 pg/mlおよび 470 ± 30 pg/mlであり、Lcn2の発現によりVEGF発現は有意に低下した。

膵癌ではMoniaux Net al.が免疫染色により、早期膵癌でLcn2発現が増強され、進行膵癌では発現が減弱すること(early biomarker)を報告している。今回のわれわれの報告は、Lcn2の発現が減弱する進行癌では、血管新生が亢進することを示唆するものである。Lcn2は膵癌のearly biomarkerだけでなく、新たな膵癌血管新生抑制因子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 10 件)

Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi

H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. Br J Cancer, peer reviewed, 110, 2014, 469-478

DOI: 10.1038/bjc.2013.748

Tsuboi K, Matsuo Y, Shamoto T, Shibata T, Koide S, Morimoto M, Guha S, Sung B, Aggarwal BB, Takahashi H, Takeyama H. Zerumbone inhibits tumor angiogenesis via NF- κ B in gastric cancer. Oncol Rep, peer reviewed, 31, 2014, 51-64

DOI: 10.3892/or.2013.2842

竹山廣光, 社本智也, 脂質メディエーター, 静脈経腸栄養, 査読有, 29, 2014, 5-10

Shibata T, Matsuo Y, Shamoto T, Hirokawa T, Tsuboi K, Takahashi H, Ishiguro H, Kimura M, Takeyama H, Inagaki H. Girdin, a regulator of cell motility, is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep, peer reviewed, 29, 2013, 2127-2132

DOI: 3892/or.2013.2406

Takahashi H, Chen MC, Pham H, Matsuo Y, Ishiguro H, Reber HA, Takeyama H, Hines OJ, Eibl G. Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis through Bax activation in pancreatic cancer cells. Biochim Biophys Acta, peer reviewed, 1833, 2013, 2980-2987

DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.08.006

Miyai H, Hara M, Hayakawa T, Takeyama H. Establishment of a simple predictive scoring system for pancreatic fistula after laparoscopy-assisted gastrectomy. Dig Endosc, peer reviewed, 25, 2013, 585-592

DOI: 10.1111/den.12042

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

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, 121, 2012, 494-498

Ochi N, Tanasanvimon S, Matsuo Y, Tong Z, Sung B, Aggarwal BB, Sinnott-Smith J, Rozengurt E, Guha S. Protein kinase D1 promotes anchorage-independent growth, invasion, and angiogenesis by human pancreatic cancer cells. J Cell Physiol, peer reviewed, 226, 2011, 1074-1081

DOI: 10.1002/jcp.22421

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

[学会発表](計 38 件)

柴田孝弥、松尾洋一、小川 了、高橋広城、石黒秀行、岡田祐二、木村昌弘、竹山廣光、芝本雄太、食道扁平上皮癌の放射線耐性と血管新生の関連についての基礎的研究、第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013 年 10 月 24-26 日、国立京都国際会館(京都府)

松尾洋一、越智靖夫、安田 顕、沢井博純、柴田孝弥、坪井 謙、社本智也、森本 守、高橋広城、石黒秀行、舟橋 整、佐藤幹則、木村昌弘、岡田祐二、竹山廣光、胃癌血管新生に関わる癌間質相互作用の役割と IL-1 α と HGF の関与、第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013 年 10 月 24-26 日、国立京都国際会館(京都府)

舟橋 整、松尾洋一、石黒秀行、岡田祐二、木村昌弘、竹山廣光、NF- κ B を介したグリア細胞由来神経栄養因子の膵癌細胞の転移・浸潤機構、第 54 回日本消化器病学会大会、2013 年 10 月 9-12 日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都)

舟橋 整、小川 了、原 賢康、高橋広城、松尾洋一、石黒秀行、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、膵癌細胞に対するグリア細胞由来神経栄養因子の役割、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

松尾洋一、柴田孝弥、坪井 謙、社本智也、長崎高也、森本 守、高橋広城、越智靖夫、石黒秀行、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、膵癌血管新生における PTEN の役割/Role of PTEN in pancreatic cancer angiogenesis、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

社本智也、松尾洋一、社本智也、柴田孝弥、坪井 謙、高橋広城、舟橋 整、岡田祐二、竹山廣光、キサントフォームは NF- κ B 活性を抑え、膵癌血管新生を抑制する、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

坪井 謙、松尾洋一、社本智也、柴田孝弥、森本 守、若杉健弘、舟橋 整、木村昌弘、竹山廣光、PKD は胃癌の血管新生を制御する、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

Shamoto T, Matsuo Y, Shibata T, Tsuboi K, Takahashi H, Funahashi H, Okada Y, Takeyama H. Xanthohumol inhibits angiogenesis through VEGF and IL-8 in pancreatic cancer. IAP&KPBA 2013, Sep 4-7, 2013, Sheraton Grande Walkerhill Hotel(Seoul, Korea)

Funahashi H, Takahashi H, Matsuo Y, Ishiguro H, Okada Y, Kimura M, Takeyama H. The role of glial cell line-derived

neurotrophic factor on invasive mechanism of pancreatic cancer cells. IAP&KPBA 2013, Sep 4-7, 2013, Sheraton Grande Walkerhill Hotel(Seoul, Korea)

Takahashi H, Matsuo Y, Takeyama H, Eibl G Simultaneous knock-down of Bcl-xl and Mcl-1 induced pancreatic cancer apoptosis in vitro and in vivo. IAP&KPBA 2013, Sep 4-7, 2013, Sheraton Grande Walkerhill Hotel(Seoul, Korea)

Matsuo Y, Shibata T, Tsuboi K, Shamoto T, Nagasaki T, Morimoto M, Ochi N, Takahashi H, Ishiguro H, Funahashi H, Sato M, Okada Y, Takeyama H. PTEN down-regulates the VEGF expression and angiogenesis in pancreatic cancer. IAP&KPBA 2013, Sep 4-7, 2013, Sheraton Grande Walkerhill Hotel(Seoul, Korea)

社本智也、松尾洋一、長崎高也、坪井 謙、柴田孝弥、高橋広城、舟橋 整、岡田祐二、竹山廣光、膵癌細胞におけるキサントフォームの血管新生制御効果の検討、第 44 回日本膵臓学会大会、2013 年 7 月 25-26 日、仙台国際センター(宮城県)

松尾洋一、柴田孝弥、坪井 謙、社本智也、長崎高也、高橋広城、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、膵癌血管新生における PTEN の役割、第 44 回日本膵臓学会大会、2013 年 7 月 25-26 日、仙台国際センター(宮城県)

松尾洋一、柴田孝弥、坪井 謙、社本智也、長崎高也、高橋広城、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、消化器癌血管新生における cytokine network の役割と HGF の関与、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月 17-19 日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県)

舟橋 整、宮井博隆、塩崎みどり、小川 了、高橋広城、石黒秀行、松尾洋一、岡田祐二、木村昌弘、竹山廣光、n-6 多価不飽和脂肪酸の膵癌細胞増殖能、血管新生能に対する影響、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月 17-19 日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県)

社本智也、松尾洋一、長崎高也、齋藤慎一郎、坪井 謙、柴田孝弥、高橋広城、舟橋 整、岡田祐二、竹山廣光、ゼルンボンは NF- κ B の活性と CXCR4 の発現を抑制し、膵癌細胞株の血管新生・浸潤を抑制する、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月 17-19 日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県)

柴田孝弥、松尾洋一、長崎高也、廣川高久、坪井 謙、小川 了、石黒秀行、木村昌弘、竹山廣光、芝本雄太、放射線耐性株を作製して検討した食道扁平上皮癌の放射線耐性能における血管新生の関与の研究、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月 17-19 日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県)

- 松尾洋一、柴田孝弥、坪井 謙、社本智也、長崎高也、高橋広城、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、膵癌血管新生シグナルにおける PTEN の役割、第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、2013 年 7 月 11-12 日、ホテルブエナビスタ松本(長野県)
- Matsuo Y, Wakasugi T, Ishiguro H, Funahashi H, Sato M, Okada Y, Kimura M, Takeyama H. HGF derived from stromal cells enhances angiogenesis in human gastric cancer cell lines. 10th IGCC 2013, Jun19-22, 2013, Centro Congressi Palaexpo Veronafiere(Verona, Italy)
- Tsuboi K, Matsuo Y, Shamoto T, Shibata T, Wakasugi T, Funahashi H, Kimura M, Takeyama H. PKD regulates VEGF secretion in gastric cancer. 10th IGCC 2013, Jun19-22, 2013, Centro Congressi Palaexpo Veronafiere(Verona, Italy)
- ②① 松尾洋一、越智靖夫、安田 顕、沢井博純、坪井 謙、社本智也、柴田孝弥、高橋広城、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、癌間質相互作用からみた消化器癌における Hepatocyte Growth Factor(HGF)の役割と腫瘍浸潤・血管新生への関与、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11-13 日、福岡国際会議場(福岡県)
- ②② 柴田孝弥、松尾洋一、齋藤慎一郎、佐川弘之、社本智也、長崎高也、廣川高久、塩崎みどり、小川 了、安藤拓也、高橋広城、若杉健弘、石黒秀行、舟橋 整、竹山廣光、坪井 謙、Akt の基質である Girdin は癌細胞の移動に関与しており、食道扁平上皮癌の予後因子である、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11-13 日、福岡国際会議場(福岡県)
- ②③ 舟橋 整、塩崎みどり、宮井博隆、小川了、原 賢康、高橋広城、坂本雅樹、安藤拓也、松尾洋一、石黒秀行、佐藤幹則、岡田祐二、木村昌弘、竹山廣光、膵癌細胞の転移・浸潤能に対するグリア細胞由来神経栄養因子の役割、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11-13 日、福岡国際会議場(福岡県)
- ②④ 高橋広城、坪井 謙、松尾洋一、岡田祐二、竹山廣光、Simultaneous knockdown of BclxL and Mcl1 induces pancreatic cancer apoptosis in vitro and in vivo、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11-13 日、福岡国際会議場(福岡県)
- ②⑤ 松尾洋一、越智靖夫、高橋広城、石黒秀行、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Guha S、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 25-27 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ②⑥ 松尾洋一、越智靖夫、安田 顕、高橋広城、若杉健弘、石黒秀行、高山 悟、舟橋整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Guha S、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 10-13 日、神戸国際会議場(兵庫県)
- ②⑦ 松尾洋一、越智靖夫、高橋広城、坪井 謙、柴田孝弥、社本智也、長崎高也、石黒秀行、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Guha S、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 19-21 日、ロイトン札幌(北海道)
- ②⑧ 松尾洋一、越智靖夫、高橋広城、石黒秀行、若杉健弘、舟橋 整、木村昌弘、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、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 18-20 日、富山国際会議場(富山県)
- ②⑨ 坪井 謙、松尾洋一、社本智也、柴田孝弥、小出修司、高橋広城、若杉健弘、舟橋整、木村昌弘、竹山廣光、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 18-20 日、富山国際会議場(富山県)
- ③⑩ 松尾洋一、越智靖夫、高橋広城、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Guha S、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 12-13 日、オリエンタルホテル広島(広島県)
- ③⑪ 松尾洋一、越智靖夫、坪井 謙、社本智也、柴田孝弥、長崎高也、高橋広城、石黒秀行、若杉健弘、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Sung B, Guha S、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 5-6 日、セラトン・グランデ・トーキョウベイ・ホテル(東京都)
- ③⑫ 社本智也、松尾洋一、長崎高也、柴田孝弥、小出修司、越智靖夫、高橋広城、舟橋整、岡田祐二、竹山廣光、膵癌細胞における zerumbone の VEGF・IL 8 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 12-14 日、幕張メッセ(千葉県)
- ③⑬ 松尾洋一、越智靖夫、小出修司、坪井 謙、社本智也、柴田孝弥、高橋広城、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Guha S、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 12-14 日、幕張メッセ(千葉県)
- ③⑭ 高橋広城、松尾洋一、舟橋 整、岡田祐二、竹山廣光、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 12-14 日、幕張メッセ(千葉県)

- ③⑤ Ochi N, Matsuo Y, Takahashi H, Funahashi H, Okada Y, Takeyama H, Guha S. The significance of NGAL in pancreatic juice to distinguish chronic pancreatitis from pancreatic cancer. IASGO 2011, Nov9-12, 2011, 京王プラザ (東京都)
- ③⑥ 松尾洋一、越智靖夫、小出修司、舟橋 整、岡田祐二、竹山廣光、炎症と消化器癌～NF-κB 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 20-23 日、福岡国際センター (福岡県)
- ③⑦ Matsuo Y, Ochi N, Koide S, Takeyama H, Okada Y. Cytokine network in pancreatic cancer: IL-1alpha from cancer cells and HGF from stromal cells cooperatively enhance the pancreatic cancer angiogenesis. ISW 2011, Aug28-1, 2011, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③⑧ 越智靖夫、松尾洋一、岡田祐二、高橋広城、竹山廣光、膵癌の鑑別における膵液中の Lipocalin 2/NGAL 測定の意義の検討、第 42 回日本膵臓学会大会、2011 年 7 月 29-30 日、ホテルニューキャッスル (青森県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

松尾 洋一 (MATSUO, Yoichi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40381800

高橋 広城 (TAKAHASHI, Hiroki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30381792

越智 靖夫 (Ochi, Nobuo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：80453067