

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462075

研究課題名(和文) 膵癌におけるStat5の生物学的役割とそのシグナル伝達経路について

研究課題名(英文) The biological role and signal pathway of Stat5 in pancreatic cancer

研究代表者

松下 晃 (Matsushita, Akira)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70449263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：今回、我々はヒト膵癌細胞株を用いてSTAT5a/5bの発現を確認した。次に、膵癌細胞株にSTAT5aおよびSTAT5bのshRNAを用いて蛋白発現抑制実験をおこなった。STAT5bの蛋白発現抑制により膵癌細胞ではゲムシタピン投与により生存細胞が有意に減少し、アポトーシス誘導されることが示唆された。またSTAT5a/5bの蛋白発現抑制により、細胞浸潤能と細胞外基質に対する細胞接着能が抑制された。STAT5aは膵癌における浸潤、接着に、またSTAT5bにおいては浸潤、接着に加え抗癌剤に対する感受性、アポトーシスにも関与している可能性が示唆され、新たな膵癌治療の標的になり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In our study, expressions of signal transducers and activators of transcription 5a/5b (STAT5a/5b) mRNA and protein were detected in eight kinds of pancreatic cancer cells. STAT5a/5b in pancreatic cancer cells is constitutively activated. STAT5b shRNA clones in PANC-1 cells exhibited reduced chemoresistance against gemcitabine compared to sham. STAT5b shRNA clones in PANC-1 cells were more sensitive to the proapoptotic actions of gemcitabine, as evidenced by PARP and cleaved caspase 3 activation. Gemcitabine also significantly reduced Bcl-xL levels in the STAT5b shRNA-expressing cells. STAT5a/5b shRNA clones in PANC-1 exhibited reduced adhesion, and invasion. These findings suggest that STAT5b confers gemcitabine chemoresistance and STAT5a/5b promotes cell adherence and invasiveness in pancreatic cancer cells. Targeting STAT5a/5b may lead to novel therapeutic strategies for pancreatic ductal adenocarcinoma.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 STAT5 接着 浸潤 ゲムシタピン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

Signal transducer and activator of transcription (STAT)はSTAT1-4、STAT5a、5b、STAT6の7種類のファミリーが存在する細胞内蛋白で、細胞内伝達を担うばかりでなく nuclear transcription factor として様々な遺伝子の発現を誘導する。STAT5は他の多くの癌腫で恒常的に活性化しており癌細胞の増殖、アポトーシス、浸潤への関与も示唆されているが、膵癌においてSTAT5に関しては発現およびその生物学的役割は明らかではなかった。

2. 研究の目的

STAT5の膵癌の悪性度の関連、その生物学的役割およびシグナル伝達経路を明らかにすることにより、分子治療標的としての可能性を探り、難治性疾患の膵癌に対する新たな治療法の開発が研究の目標であった。

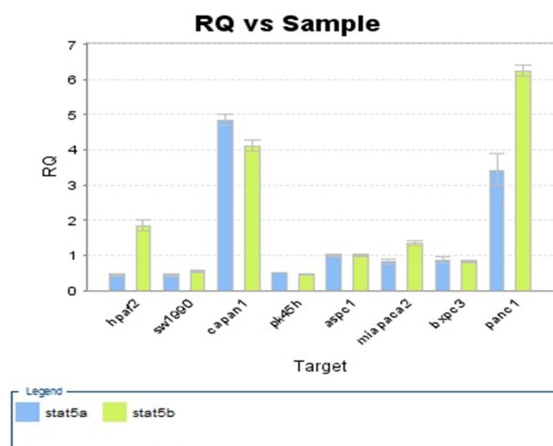
3. 研究の方法

8種のヒト膵癌細胞株を用い RT-PCR 法、Western Blot 法 (WB 法) にて STAT5a/5b の mRNA、蛋白発現を検討し、confocal analysis cell fraction を用いた W.B 法により STAT5a/5b の核および細胞質内での発現を検討し、免疫沈降法、W.B 法により STAT5a/5b のチロシンリン酸化を調べた。次に STAT5a/5b に対する shRNA plasmid および cDNA plasmid を用い、ヒト膵癌細胞に対して STAT5a/5b 蛋白発現抑制、強制発現を行って clone を作成した。上記 clone を用いて、細胞の増殖、Gemcitabine に対する感受性、接着、浸潤に関して MTT assay、gemcitabine 共培養試験、adhesion assay、invasion assay を行った。

4. 研究成果

ヒト膵癌細胞株において STAT5a/5b mRNA、蛋白の発現が認められ、さらにその活性化を示す STAT5a/5b の核内での発現とチロシンリン酸化を確認した (図 1、2、3)。

図 1 膵癌細胞における STAT5a/5b mRNA 発現



増殖能の検討では、control と比較して STAT5a/5b shRNA クローンとも有意差は認められなかったが、STAT5b shRNA クローンにおいては Gemcitabine 投与により生存細胞

が有意に減少した (図 4)。同様に STAT5b shRNA クローンに対し Gemcitabine を投与した後の蛋白を用いた W.B 法では、control と比較してアポトーシス関連蛋白である cleaved Caspase 3、PARP の高発現を認め、さらに抗アポトーシス蛋白である Bcl-xL の低発現が認められ、Gemcitabine 投与による Bcl-xL を介したアポトーシスの誘導が示唆された (図 5、6)。また adhesion assay では細胞外基質に対する細胞接着能がそれぞれ有意に抑制され、invasion assay では STAT5a/5b shRNA クローンとも有意に細胞浸潤能が抑制された (図 8、9)。STAT5a/5b はヒト膵癌細胞においてその発現を認め、STAT5a は膵癌における浸潤、接着に、また STAT5b においては浸潤、接着に加え抗癌剤に対する感受性、アポトーシスにも関与している可能性が示唆され、新たな膵癌治療の標的になり得ると考えられた。

図 2 膵癌細胞における STAT5a/5b 蛋白発現

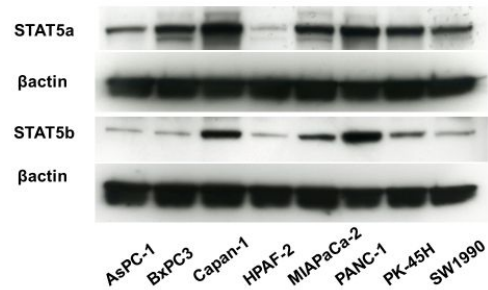


図 3 STAT5a/5b 細胞内局在

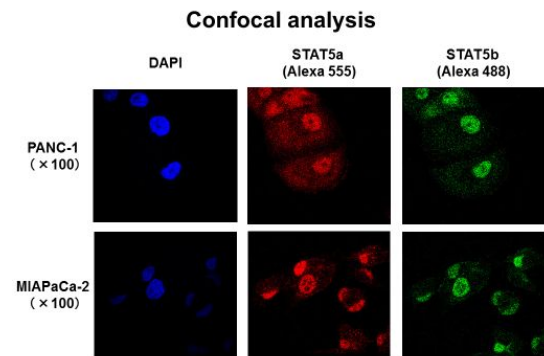


図 4 Gemcitabine 投与の細胞生存への効果 (STAT5b-shRNA、MTT assay)

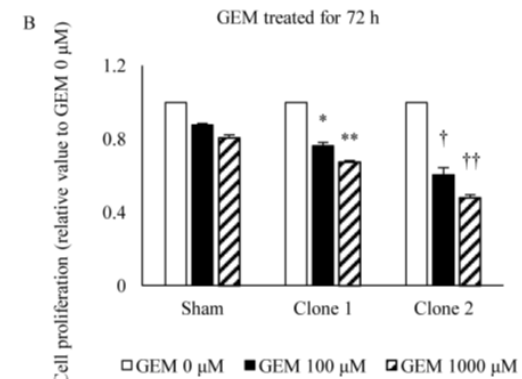


図 5 Gemcitabine 投与によるアポトーシス関連蛋白の誘導 (STAT5b-shRNA、WB 法)

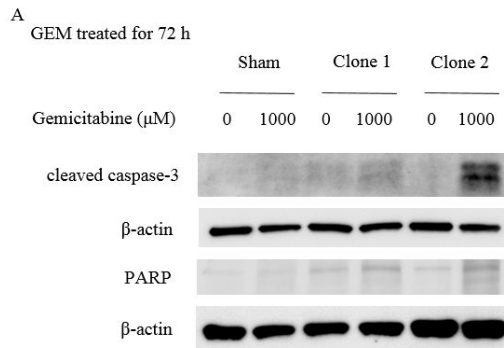


図 6 Gemcitabine 投与による抗アポトーシス蛋白 Bcl-xL の変化 (STAT5b-shRNA、WB 法)

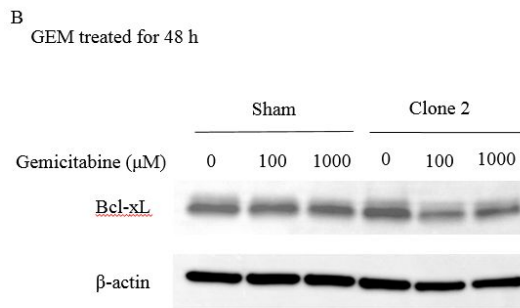


図 7 細胞接着能の評価 (STAT5b-shRNA、adhesion assay)

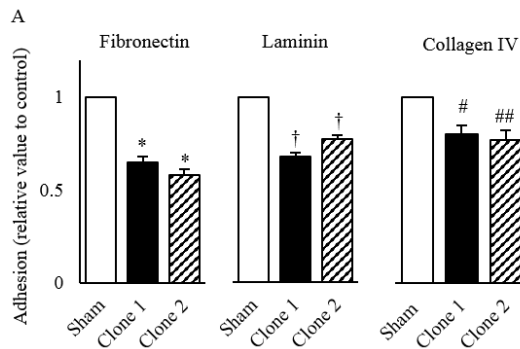
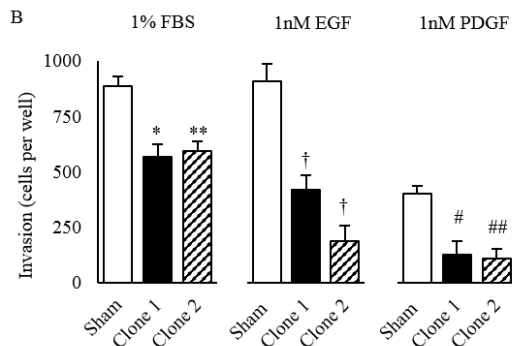


図 8 細胞浸潤能の評価 (STAT5b-shRNA、invasion assay)



## 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)

Hiroki Sumiyoshi, Akira Matsushita, Yoshiharu Nakamura, Yoko Matsuda, Toshiyuki Ishiwata, Zena Naito, Eiji Uchida, Suppression of STAT5b in pancreatic cancer cells leads to attenuated gemcitabine chemoresistance, adhesion and invasion, *Oncology Reports*, 査読有, 35, 2016, 3216-3226

DOI: 10.3892/or.2016.4727

〔学会発表〕(計 11 件)

住吉 宏樹, 松下 晃, 内田 英二, 膵癌における STAT5b の生物学的役割についての検討, 第 114 回外科学会定期学術集会, 査読有, 2014 年 4 月 3 日~4 月 5 日, 京都

住吉 宏樹, 松下 晃, 内田 英二, 膵癌における STAT5b の抗癌剤感受性、接着能、浸潤能への関与, 第 45 回日本膵臓学会大会, 査読有, 2014 年 7 月 11 日~7 月 12 日, 北九州

住吉 宏樹, 松下 晃, 内田 英二, 膵癌における STAT5b の抗癌剤感受性、接着能、浸潤能への関与, 第 73 回日本癌学会, 査読有, 2014 年 9 月 25 日~9 月 27 日, 横浜

住吉 宏樹, 松下 晃, 内田 英二, 膵癌における STAT5b の抗癌剤感受性、アポトーシス、接着能、浸潤能への関与, 第 22 回消化器関連学会週間, 査読有, 2014 年 10 月 23 日~10 月 26 日, 神戸

住吉 宏樹, 松下 晃, 内田 英二, 膵癌における STAT5a/5b の発現および生物学的役割, 第 32 回日本胆膵病態生研究会, 査読有, 東京

住吉 宏樹, 松下 晃, 内田 英二, 膵癌における STAT5a/5b の発現および増殖、抗癌剤感受性、細胞接着、浸潤への関与, 第 74 回日本癌学会, 査読有, 2015 年 10 月 8 日~10 月 10 日, 名古屋

住吉宏樹, 松下 晃, 内田 英二, 膵癌における STAT5 の発現および生物学的役割, JDDW2015, 査読有, 2015 年 10 月 8 日~10 月 11 日, 東京

住吉 宏樹, 松下 晃, 内田 英二, 膵癌における STAT5a/5b の発現および増殖、抗癌剤感受性、細胞接着、浸潤への関与, 第 116 回外科学会定期学術集会, 査読有, 2016 年 4 月 14 日~4 月 16 日, 大阪

松下 晃, 内田 英二, 膵癌における STAT5b のゲムシタピン抵抗性、浸潤能、接着能への関与, 第 27 回日本消化器癌発生学会, 査読有, 2016 年 9 月 15 日~9 月 16 日, 鹿児島

住吉 宏樹, 松下 晃, 松田 陽子, 石渡 俊行, 内田 英二, ヒト膵癌細胞における STAT5b のゲムシタピン抵抗性、接着能、浸潤能への関与, 第 75 回日本癌学会, 査読有,

2016年10月6日～10月8日、横浜  
住吉 宏樹、松下 晃、内田 英二、膀胱癌  
におけるSTAT5bの発現とゲムシタピン感受  
性、接着、浸潤能への関与、JDDW2016、査  
読有、2016年11月4日～11月5日、神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松下 晃 (MATSUSHITA, Akira)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70449263

### (2) 研究分担者

内田 英二 (UCHIDA, Eiji)  
日本医科大学・大学院医学研究科・大学院  
教授  
研究者番号：70176684

松田 陽子 (MATSUDA, Yoko)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ  
ンター(東京都健康長寿医療センター研究  
所)・東京都健康長寿医療センター研究  
所・研究員  
研究者番号：20363187

### 石渡 俊行 (ISHIWATA, Toshiyuki)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ  
ンター(東京都健康長寿医療センター研究  
所)・東京都健康長寿医療センター研究  
所・研究部長  
研究者番号：90203041

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

Murray Korc (Professor, Department of  
Medicine, Indiana University School of  
Medicine IU, USA)