



Title	Aberrant Expression of Neuropilin-1 and -2 in Human Pancreatic Cancer Cells
Author(s)	深日, 希美
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47493
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	深 日 希 美
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 7 5 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 12 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Aberrant Expression of Neuropilin-1 and -2 in Human Pancreatic Cancer Cells (膵癌におけるニューロピリン 1、2 の発現異常)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠 山 正 彌 (副査) 教 授 金 田 安 史 教 授 米 田 悦 啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

ニューロピリン 1、2 (Np-1,2) は、クラス 3 分泌型セマフォリンの受容体であるが、血管内皮細胞増殖因子 VEGF の共受容体でもあることから、膵癌におけるニューロピリンの果たす役割を調べる目的で研究を行った。

[方法ならびに成績]

膵癌セルラインの ASPC-1、Capan-1、PANC-1 は the American Type Culture Collection より購入した。正常ヒト膵臓組織は organ donor program を通じて、また膵癌組織は術後摘出した組織を -80°C に急速冷凍したものをを用いた。凍結膵癌組織を $5\mu\text{m}$ に薄切してスライドガラス上に載せ、70%、95%、100%エタノールで固定、キシレンで脱水処理して風乾させた後、Arcturus 社の PixCell I LCM (Mountain View, CA) を用いて、膵癌組織から形態学的に区別される膵癌細胞、結合組織細胞、炎症細胞の各々についてレーザーキャプチャー法 (LCM 法) を用いて特異的に採取した。続いてそれぞれの細胞群から total RNA を抽出し、CytoFluor Fluorescence probe reader (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) を用いた超高感度 RiboGreen assay 法により RNA 量を定量した。RT 反応後得られた cDNA を ABI Prism 7700 Sequence Detection System を用いて定量 PCR 法により mRNA 発現レベルの解析を行った。Endogenous control として cyclophilin、ヒト転写因子 IID/TATA binding factor の利用を試みたが検出レベル以下であり、また β アクチン、GAPDH は正常細胞と比較して癌細胞において発現上昇がみられたことから、LCM 由来の細胞群においては、それぞれ RNA 量を 1 ng/ml として cDNA を調整して定量 PCR に供して発現解析を行った。

[総 括]

膵癌セルラインおよび膵癌患者組織から LCM 法を用いて特異的に採取した膵癌細胞において、Np-1,2 mRNA の発現レベルが高く、VEGFR-1,2 の発現は低いものの VEGFR-3 の発現レベルは比較的高かった。また Np-1、Np-2 が糖化していることも明らかになった。Np-2 mRNA の発現レベルの低かった PANC-1 においては、Np-2 タンパクの発現レベルも低かったが、全ての膵癌セルラインにおいて定量 PCR の結果と一致して、Np-1 タンパクが高発現していた。また免疫染色法により Np-1、Np-2 は癌細胞に隣接した腺房細胞においても高発現していることがわかった。

これらの結果から Np-1、Np-2 が膵癌において微小血管の発現等、重要な役割を果たしていると考えられた。

また膵癌細胞において VEGF-A が高発現していることから、VEGF-A が低酸素状態における FGF-2、TGF- β 等の成長因子による発現誘導や免疫反応抑制に関与している可能性も示唆された。さらに Np-1、Np-2 および VEGF-A が高発現していることを考え合わせると、異常な autocrine/paracrine ループを引き起こすことによって *in vivo* で直接癌細胞の発育を促進している可能性も考えられた。

VEGF-D、VEGF-B の膵癌細胞における発現レベルが正常細胞と比較して 10 倍、4 倍である一方、VEGF-C mRNA の発現レベルは 24 倍と有意に高かった。VEGF-C、VEGF-D は両者とも VEGFR-2 を活性化し、また VEGFR-3 の唯一のリガンドとして知られている。また VEGF-C は Np-2 と結合し、リンパ管形成に重要な役割を果たしていることが知られている。免疫染色法により膵癌組織中の癌細胞、リンパ細胞において VEGF-C、VEGFR-3 の発現がみられ、VEGF-C の発現はリンパ球浸潤およびリンパ節転移に相関があり、また VEGFR-3 が癌細胞の成育および chemoresistance を強化することから、これらを考え合わせると膵癌において VEGF-C、VEGFR-3、Np-2 がリンパ管浸潤、癌細胞発育増強に関与していると考えられた。

膵癌組織の炎症細胞において Np-1 mRNA が約 11 倍、炎症細胞では Np-2 の発現はみられなかったが、結合組織においては、Np-1、Np-2 とも約 8 倍発現しており、このような Np-1、Np-2 の各々の細胞群における発現レベルの報告は初めてである。さらに炎症細胞および結合組織においても VEGF-A、VEGF-C の mRNA の発現レベルの上昇がみられたことから、これらの細胞が血管新生を促進し細胞の癌化に寄与している可能性が考えられた。

膵癌においては、組織塊中に、癌細胞、腺房細胞、腺管細胞、内分泌細胞、上皮細胞、神経細胞、炎症細胞、線維芽細胞、異型細胞が混在しており、遺伝子発現を調べることは非常に困難であったが、LCM 法と定量 PCR 法を組み合わせることにより、細胞特異的に多種類の mRNA について発現解析を行うことが可能となった。その結果、膵癌細胞において Np-1、Np-2、VEGFR-3 そして VEGF-A、VEGF-C の mRNA が高発現していることが明らかになり、*in vivo* にて VEGF による膵癌細胞への直接作用を強化して血管新生を促進していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

ニューロピリンは神経ガイダンス因子として同定された分子であるが、血管内皮細胞においても発現がみられ、VEGFR-2 などの共受容体として作用して血管新生を促進すると考えられており、前立腺癌、乳癌、メラノーマ、胃癌、大腸癌など多くの癌で発現亢進が報告されている。

膵癌は最も悪性度の高い癌の一つで、早期診断が難しく化学療法や放射線治療に抵抗性を示す。また膵癌は組織中に多種類の細胞が混在しているため、遺伝子発現解析を行うことが難しく、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法と定量 PCR 法を組み合わせることにより、細胞特異的に mRNA の発現解析を行うことが可能となった。

そして本研究の成果により、膵癌細胞においてニューロピリン-1、-2 の発現レベルが上昇し、これらが直接 VEGF への作用を強化し血管新生を促進していることが明らかとなった。また正常細胞ではニューロピリン-1 の発現が見られなかったことから、膵癌における早期診断ターゲットとして、また癌免疫や血管新生を抑える治療ターゲットとなることが示唆される。

よって本研究成果は基礎研究から臨床応用へとつながる新たな一步を踏み出したといえ、博士学位の授与に値するものと認める。