

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15591

研究課題名(和文)線虫を用いた次世代膵癌診断法の有効性についての検討

研究課題名(英文)A non-invasive tool for detecting pancreatic tumor-bearing murine odor by *C. elegans*

研究代表者

川本 弘一 (KAWAMOTO, Koichi)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：30432470

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):膵癌の予後は極めて不良であり、新規診断・治療法の開発が急務となっている。本研究では野生型線虫の嗅覚を応用したN-NOSE法を用いることで癌の匂いを科学的に検討し線虫が膵腫瘍発生を組織学的に確認された膵腫瘍自然発生モデルマウスの尿に対してもヒト同様の誘引行動を呈することを示した。線虫の行動をげっ歯類で再現できたことの重要性は、これまではヒトの臨床検体を用いていたため、サンプルの多様性も影響し、原因物質の同定までは至らなかった可能性も示唆されるが、このマウスモデルを利用することで、走行性を惹起する物質の同定が可能となることが期待され、N-NOSE法が膵癌の早期診断の一助になる可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文):Diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with dismal prognosis despite current best therapies, including surgery, chemoradiation, and immunotherapy. Previous studies reported that wild-type *C. Elegans* displayed attractive chemotaxis towards human urine from cancer patients but avoided control urine from healthy volunteers. In this study, our research group demonstrated that *C. Elegans* induces chemotactic properties to the urine from pancreatic tumor-bearing mice. Furthermore, urine from c-Met knockout has minimal effect to these chemotactic properties. These results suggest that urine from tumor-bearing mice could provide a new strategy to detect and study disease-associated scents in the future.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 早期診断 綿虫 嗅覚レセプター スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、消化器癌の中でも最も予後不良な疾患である。胃癌や大腸癌の5年生存率が70%を超えている中で、膵癌の5年生存率は10%前後に留まることから明らかである。他癌と比較して年次的な予後改善効果が限定的であるため、今世紀になっても、克服されていない難治性の疾患の代表である。無症状であることが多いため、初診時には多くが進行癌で発見されることが予後不良の要因の一つとされている。しかしながら、病期0の段階で発見された場合は、5年生存率は80%まで改善していることから分かる通り、膵癌の早期発見の重要性は強調してもし過ぎることはない。また早期診断を可能とするマーカーが発見されたとしても、高額であれば本邦の喫緊の課題である医療費の抑制につながらないため、可能な範囲で安価なマーカーが要求されることも論を待たない。

本計画では、挑戦的萌芽研究として、「匂い」を科学する斬新な技術により早期膵癌を簡便に診断する方法を開発研究する。匂いの技術は、寄生虫の一種である線虫(*Caenorhabditis elegans*)の嗅覚を応用した方法を用いる。本方法の先鞭的な基礎研究は、発生生物学的な線虫の嗅覚臓器研究としてRas-MAPK経路の関与が既に明らかとなっている。本研究では大阪大学消化器外科が中心となって収集している膵癌症例の体液(唾液、尿、血清)を線虫の匂いのシステムに乗せてその有効性を科学的に検討することが目的である。これまでの国内外での研究によって、麻薬犬の嗅覚を応用することで、様々な種類の癌を探知可能であることが報告されている(Gut 2011)。確かに、イヌの嗅覚はヒトの100万~1億倍と言われており、実際、訓練により麻薬犬は「癌」の微妙な臭いを感じとるようである。しかし、麻薬犬の訓練には多大な手間とコストが掛かるために、現時点では広く日常診療の中では応用されていないのが実情である(特に多数の検体をスクリーニング可能か否かについては明らかにされていない)。一方、協働して研究している広津らの報告によると、線虫も近年の探索的研究により癌を診断可能(N-NOSE法)であることが示されている(PlosOne 2015)。N-NOSE法は開発当初からヒトの尿検体を用いてアッセイされたため、マウスモデルにおいても同様の走行性を示すか否かについてはこれまで検索した限りにおいて報告されていない。本研究では、この新規診断方法がマウスモデルにおいて再現可能か検討する。この際、発癌物質の投与による化学発癌モデルにおいては、比較的長期間の投与期間を必要とすること、化学物質による発癌モデルなので、実際のヒトの膵癌とは異なる点等の問題点が挙げられるので膵腫瘍自然発生モデルマウスの体液を用いて、線虫がヒトの検体同様の誘引行動を示すか解析する。

2. 研究の目的

線虫も他の生物と同様、自己生存のために食餌の匂いへの誘引行動や侵害刺激からの忌避行動等、様々な外部刺激に対する応答を示すことが分子レベルで報告されている。本研究においては、まず、膵腫瘍自然発症モデルマウスにおいてもヒト同様の走行性を示すか否かについて解析することを目的としている。次に同様の走行性を示した場合は、国内外の報告で膵癌幹細胞マーカーとして知られている細胞表面抗原であるc-Metノックアウトマウスから採取した体液で、同様の走行性解析を行う。次に、モデルマウスの尿を用いて原因物質の同定をはかる。必要であれば唾液や血液の利用も検討する。同時に他の既知のタンパク質マーカー(CEA, CA19-9等)、マイクロRNAマーカー、代謝マーカー等と組み合わせることで膵癌の早期診断を可能とする組み合わせを解明する。

3. 研究の方法

本研究では、モデル生物として麻薬犬の訓練等を含むコストと比較して廉価である線虫を用いることを特徴としている。まず、遺伝子改変していない野生型の線虫を10センチメートル培地シャーレの中で飼育する。次に、体液由来の検体を設置することにより、20分以内に走行が見られるか否かを目途として移動距離をもとに判定する。体液は希釈系列(10倍・100倍・1000倍希釈等)でレンジを設定し、各検体において適宜最適化する。また、検討する検体としては、野生型マウスと膵特異的に変異型K-ras蛋白を胎生期より発現する遺伝子改変マウスと機能喪失型変異p53の発現を追加したKPCマウスの尿、c-Metノックアウトマウスの尿を用いる。尿で予想される結果が得られない場合は血液ないしは唾液等の体液を用いて解析する方針とした。

4. 研究成果

まず、本研究では、マウスモデルでの再現性を確認した。野生型マウス、遺伝子改変マウスの尿を回収後、一定期間経過観察後、犠牲死させ、組織学的に検討した。膵腫瘍自然発生モデルマウスとして知られるKRASG12D変異マウスの実験群において、実際に腫瘍形成を認める事を肉眼的並びにヘマトキシリン-エオジン染色(HE染色)を用いて組織学的に確認した。一方、コントロールマウスでは腫瘍形成を一切認めなかった。このことより、自然発生モデルマウスで実際に腫瘍形成を認める事を確認した。また、このマウス尿を希釈し、N-NOSE法を用いたマウスモデルにおける再現性を解析した。その結果、マウス尿に対しても走行性を示す傾向が得られた(協働研究者広津らによる解析)。また、我々を含む先行研究により膵癌幹細胞マーカーとしてのc-Metをノックアウトしたマウスの尿においても同様の解析を

施行したが、線虫に対する走行性に有意差を認めなかった。このことより、現時点では「匂い」と癌幹細胞に直接の関連が示唆される結果は得られなかった。これは、癌遺伝子に変異がある場合に線虫がこの遺伝子変異を感じ可能であることを示唆する。マウスモデルにおいての有効性を再現可能であることを示した。

本方法では、大きな意義を有するスクリーニングを簡便かつ廉価に実施することが可能となることを見込まれる。現在の腫瘍マーカー（CEA/CA19-9/DUPAN2 等）での陽性率とともに、私達が内外の研究で既に先駆けて明らかにしてきたマイクロ RNA による癌のバイオマーカーとしての検出力と、N-NOSE 法による検出力を、比較検討することで、既存のどのマーカーとの組み合わせによる相乗効果も期待される。すなわち、すでに報告した消化器癌のバイオマーカーとしての miR-21 (*J Hepatol* 2012)との比較、膵癌における

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) Koseki, J., Konno, M., Asai, A., Colvin, S. H., Kawamoto, K., Nishida, N., Sakai, D., Kudo, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Enzymes of the one-carbon folate metabolism as anticancer targets predicted by survival rate analysis. *Sci. Rep.*, 8(1):303, 2018.
DOI: 10.1038/s41598-017-18456-x
- 2) Konno, M., Matsui, H., Koseki, J., Asai, A., Kano, Y., Kawamoto, K., Nishida, N., Sakai, D., Kudo, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Computational trans-omics approach characterised methylomic and transcriptomic involvements and identified novel therapeutic targets for chemoresistance in gastrointestinal cancer stem cells. *Sci. Rep.*, 8(1):899, 2018.
DOI: 10.1038/s41598-018-19284-3
- 3) Ohashi, T., Eguchi, H., Kawamoto, K., Konno, M., Asai, A., Colvin, H., Ueda, Y., Takaoka, H., Iwagami, Y., Yamada, D., Asaoka, T., Noda, T., Wada, H., Gotoh, K., Kobayashi, S., Koseki, J., Satoh, T., Ogawa, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mitochondrial pyruvate carrier modulates the epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma. *Oncol. Rep.*, 39(3):1276-1282, 2018.
DOI: 10.3892/or.2017.6172
- 4) Nishizawa, Y., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kawamoto, K., Miyoshi, N., Takahashi, H., Nishida, N., Haraguchi, N., Sakai, D., Kudo, T., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Hypoxia stimulates the cytoplasmic localization of oncogenic long noncoding RNA LINC00152 in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 52(2):453-460, 2018.
DOI: 10.3892/ijco.2017.4218
- 5) Nishizawa, Y., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kawamoto, K., Miyoshi, N., Takahashi, H., Nishida, N., Haraguchi, N., Sakai, D., Kudo, T., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncogene c-Myc promotes epitranscriptome m⁶A reader YTHDF1 expression in colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(7):7476-7486, 2017.
DOI: 10.18632/oncotarget.23554
- 6) Asukai, K., Kawamoto, K., Eguchi, H., Konno, M., Asai, A., Iwagami, Y., Yamada, D., Asaoka, T., Noda, T., Wada, H., Gotoh, K., Nishida, N., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Micro-RNA-130a-3p regulates gemcitabine resistance via PPARG in cholangiocarcinoma. 24(8):2344-2352, *Ann. Surg. Oncol.*, 2017.
DOI: 10.1245/s10434-017-5871-x
- 7) Konno, M., Asai, A., Kawamoto, K., Nishida, N., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. The one-carbon metabolism pathway highlights therapeutic targets for gastrointestinal cancer. *Int. J. Oncol.*, 50(4):1057-1063, 2017.
DOI: 10.3892/ijco.2017.3885
- 8) Miyo, M., Konno, M., Nishida, N., Sueda, T., Noguchi, K., Matsui, H., Colvin, H., Kawamoto, K., Koseki, J., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Gotoh, N., Mastuda, F., Satoh, T., Mizushima, T., Shimizu, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Metabolic adaptation to nutritional stress in human colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:38415, 2016.
DOI: 10.1038/srep3841
- 9) Colvin, S. H., Nishida, N., Konno, M., Haraguchi, N., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Kawamoto, K., Asai, A., Tsunekuni, K., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncometabolite D-2-hydroxyglurate directly induces epithelial-mesenchymal transition and is associated with distant metastasis in colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:36289, 2016.
DOI: 10.1038/srep36289

[学会発表](計1件)

- 1) 川本弘一、他：胆管癌微少環境下における炎症性サイトカイン発現の臨床的意

義に関する検討、第 26 回日本癌転移学
会学術集会・総会、2017 年 7 月 28 日、
大阪国際会議場（大阪）

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本 弘一 (KAWAMOTO Koichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
(常勤)
研究者番号：30432470

(2) 研究分担者

江口 英利 (EGUCHI Hidetoshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90542118

西田 尚弘 (NISHIDA Naohiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50588118

今野 雅允 (KONNO Masamitsu)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
講師
研究者番号：80618207

小関 準 (KOSEKI Jyun)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
(常勤)
研究者番号：20616669

石井 秀始 (ISHII Hideshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任教
授(常勤)
研究者番号：10280736

(3) 連携研究者

森 正樹 (MORI Masaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190999

広津 崇亮 (HIROTSU Takaaki)
九州大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：70404035

杉本 昌弘 (SUGIMOTO Masahiro)
慶応義塾大学・政策メディア研究科・特
任准教授
研究者番号：30458963