

令和 2 年 4 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10695

研究課題名(和文) TFF1の膵癌抑制効果の検証と膵癌治療に対する有用性の検討

研究課題名(英文) The role of TFF1 to inhibit the development of pancreatic cancer

研究代表者

山口 淳平 (Yamaguchi, Junpei)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00566987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Trefoil Factor Family 1(TFF1)は粘液関連分泌型タンパクであり、胃癌抑制因子として作用するという報告がある。本研究ではヒト膵癌切除標本、培養膵癌細胞株および遺伝子改変マウスモデルを用いることで膵癌の発癌機構とTFF1との関連を検討した。結果、TFF1は上皮間質転換(EMT: Epithelial-mesenchymal transition)を制御する事により膵前癌病変からの悪性腫瘍発生を抑制していることが明らかとなった。今後はTFF1を用いた膵癌治療戦略の構築と高リスク患者の膵癌発生予防法を開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は難治性の悪性疾患であり、患者全体の5年生存率は約5%と推定されている。膵癌患者の予後が不良な原因は、多くの患者が切除不能な状態で発見されることに加え、たとえ治療切除が施行されたとしても術後の再発が多い事による。膵癌の予後を改善するためには再発進行膵癌に対する新たな治療戦略の開発が必須であるだけでなく、高リスク患者における膵癌発生を予防する事が重要である。本研究でTFF1は膵癌の浸潤および転移を抑制する作用があることが判明した。TFF1を用いた新規治療方法の開発は、進行再発膵癌に対する治療戦略になるのみならず膵癌発生予防にも有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Trefoil Factor Family 1 is the secreted protein and supposed to be the tumor suppressor in gastric carcinogenesis. We analyzed surgically-resected pancreatic specimen, pancreatic cancer cell line and genetically-engineered mouse model to investigate the association of TFF1 and pancreatic carcinogenesis. This study revealed that TFF1 inhibits malignant transformation of pancreatic premalignant lesions by controlling epithelial-mesenchymal transition (EMT). TFF1 has the potential to be the novel therapeutic strategy for pancreatic cancer.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 TFF1 前癌病変

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌は難治性の悪性疾患であり、患者全体の5年生存率は約5%と推定されている。膵癌患者の予後が不良な原因は、多くの患者が切除不能な状態で発見されることに加え、たとえ治療切除が施行されたとしても術後の再発が多い事による。膵癌の予後を改善するためには再発進行膵癌に対する新たな治療戦略の開発が必須であるだけでなく、高リスク患者における膵癌発生を予防する事が重要である。

(2) Trefoil Factor Family 1 (TFF1) は主に胃粘膜上皮で産生される粘液関連分泌型タンパクであり、胃潰瘍などで障害を受けた粘膜上皮の再生に寄与するとされてきた。一方近年では TFF1 が胃癌抑制因子として作用するという報告があり注目されている。注目すべきは、正常組織における TFF1 の主な産生部位は胃粘膜である一方、障害を受けた膵管上皮細胞や前癌病変 (PanIN および IPMN) においても TFF1 が産生されていることである。これらの研究結果は、膵発癌と TFF1 の強い関係性を示唆している。

2. 研究の目的

これまで TFF1 の癌抑制因子としての作用は胃や腸といった消化管でしか検討されてこなかった。これは TFF1 の発現が主に消化管に認められることが理由である。一方正常膵組織にはほとんど TFF1 が発現していないため、膵における TFF1 の役割はこれまで注目されてこなかった。本研究の目的はヒト膵癌切除標本、培養膵癌細胞株および遺伝子改変マウスモデルを用いることで膵癌の発癌機構を解明することであり、また TFF1 を用いた新たな膵癌治療戦略の開発や、TFF1 による膵癌発生予防 (chemoprevention) の可能性を探ることである。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵切除標本を用いた研究: 当院で手術を施行した膵癌 (14 例)、IPMN (13 例) のパラフィン包埋標本を用いて、正常膵、膵前癌病変、膵癌における TFF1 および関連分子の発現を免疫染色法により検討した。

(2) 膵癌培養細胞株を用いた研究: ヒト膵癌細胞である panc1, PK9, PK45h, PK59, KLM1, MiaPaca2, KP4, PK8 を用いて膵癌細胞と TFF1 発現の関係を検討した。またこれらの細胞に3種類の独立した siRNA を導入し、TFF1 抑制による変化を細胞形態、浸潤遊走能、分子生物学的な変化について検討した。

(3) 遺伝子改変マウスモデルを用いた研究: 膵前癌病変自然発生マウスモデルとして、KC マウス (Pdx1-Cre/LSL-KRAS^{G12D}) を導入した。またこのマウスに TFF1KO マウスを交配することで KC/TFF1KO マウスを作成し、それぞれのマウス膵臓を摘出して観察検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト膵切除標本における TFF1 発現を検討したところ、TFF1 は正常膵組織にはほとんど発現していない一方で、前癌病変である PanIN および IPMN には強い TFF1 発現が確認された (図 1A)。また膵癌においては非浸潤膵管内病変では TFF1 の発現が認められたが、浸潤部位ではこれが失われる傾向があることが明らかとなった (図 1B)。この結果から、TFF1 が膵前癌病変の悪性化を抑制していること、および膵癌の浸潤能を抑制していることが示唆された。

(2) 培養膵癌細胞 (panc1, PK9) に対して siRNA による TFF1 発現抑制を導入したところ、膵癌細胞の浸潤能および遊走能の低下が認められ、ヒト膵切除標本における示唆を裏付ける結果となった (図 2)。次にこれらの細胞において、癌細胞の浸潤能を制御するとされる EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) 関連分子の変化を RT-PCR および western blotting により検討した。すると、TFF1 抑制群では細胞形態が紡錘状に変化し、EMT 促進分子である SNAI1 (Snail), SNAI2 (slug), TWIST1 (Twist) の発現が亢進し、さらには上皮細胞マーカーである CDH1 (E-cadherin), OCLN (Occludin), TJP1 (Zo-1) の発現が低下していることが確認された (図 3)。これらの結果により、TFF1 は膵癌細胞の EMT を抑制して癌浸潤能を低下させる作用があることが明らかとなった。

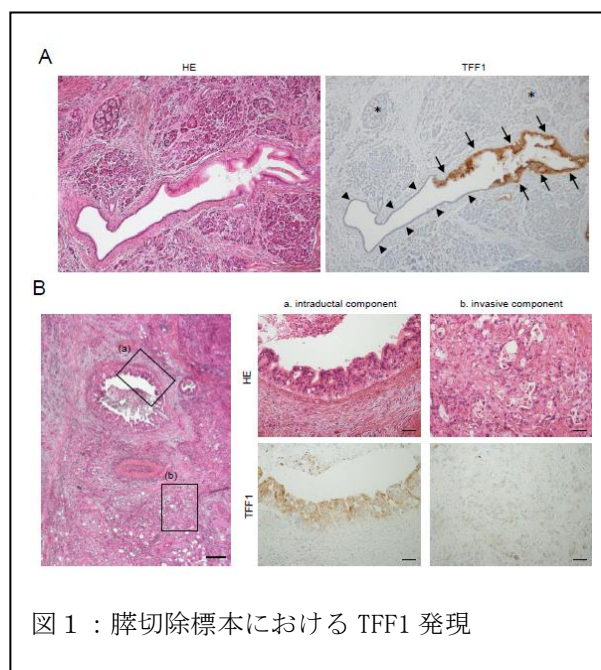


図 1 : 膵切除標本における TFF1 発現

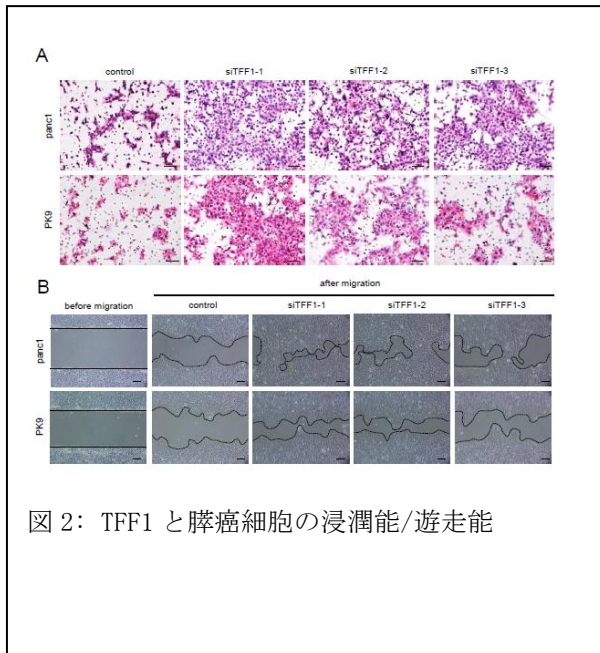


図 2: TFF1 と膵癌細胞の浸潤能/遊走能

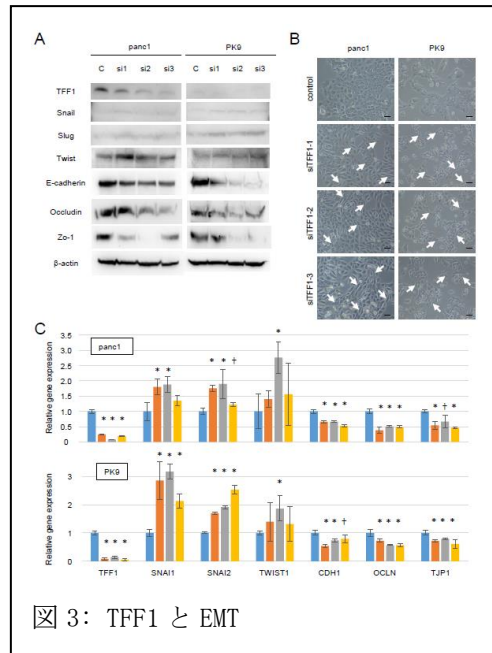


図 3: TFF1 と EMT

(3) 各種膵癌培養細胞および膵切除標本において、EMT と TFF1 の関連を検討した。結果、TFF1 陽性細胞は Snail 陰性であるのに対して TFF1 陰性細胞は Snail 陽性であることが確認された (図 4A)。また膵切除標本においても TFF1 と Snail の発現には負の相関があることが判明した (図 4B)。これらの結果により TFF1 と EMT の関連が裏付けられた。

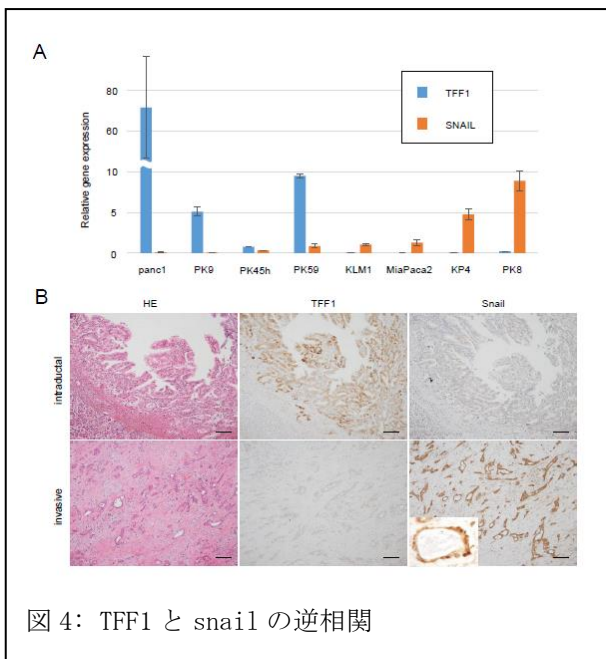


図 4: TFF1 と snail の逆相関

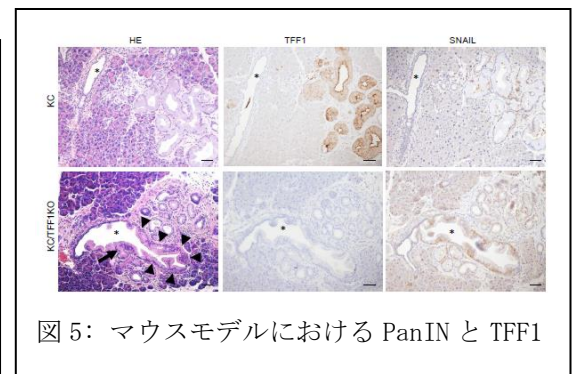


図 5: マウスモデルにおける PanIN と TFF1

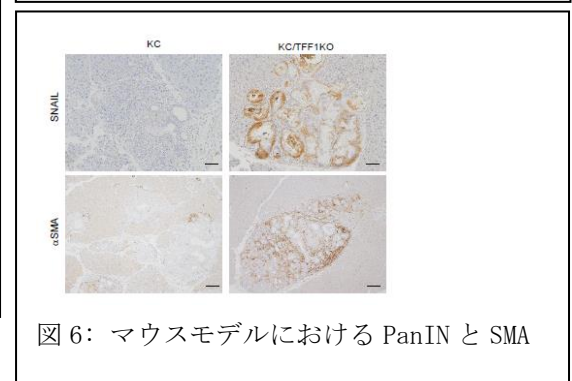


図 6: マウスモデルにおける PanIN と SMA

(4) マウスモデルにおいて膵前癌病変である PanIN の特徴を検討したところ、KCマウスの PanIN においては強い TFF1 発現が認められる一方、KC/TFF1KO ではこれが失われていることが確認された。また KC/TFF1KO では PanIN が膵管内に進展することで広範囲に広がっていることが判明した (図 5)。さらに、KC/TFF1KO に発生する PanIN では強い Snail 発現および alpha-SMA 発現が認められた (図 6)。これらの結果は TFF1 欠損が PanIN の EMT を惹起することを示唆している。

(5) マウスモデルにおいて膵悪性腫瘍の発生状況を検討した。結果、KC/TFF1KO ではより悪性度の高い PanIN が発生していることが明らかとなった (図 7)。また 6 カ月齢のマウス膵臓を検討したところ、KC では膵癌の発生は皆無であったのに対して KC/TFF1KO では膵癌および多発肝転移の発生が確認された (図 8)。さらに、KC/TFF1KO は優位に不良な生存曲線を示した。以上より、TFF1 は PanIN の悪性化を抑制していることがマウスモデルでも確認された。

(6) 以上の結果より、TFF1 は上皮間質転換を制御する事により膵前癌病変からの悪性腫瘍発生を抑制していることが明らかとなった。今後は TFF1 を用いた膵癌治療戦略の構築と高リスク患者の膵癌発生予防法を開発が期待される。

文献: Yamaguchi J et al. Trefoil factor 1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic intraepithelial neoplasm. J Clin Invest 2018, 3619-3629.

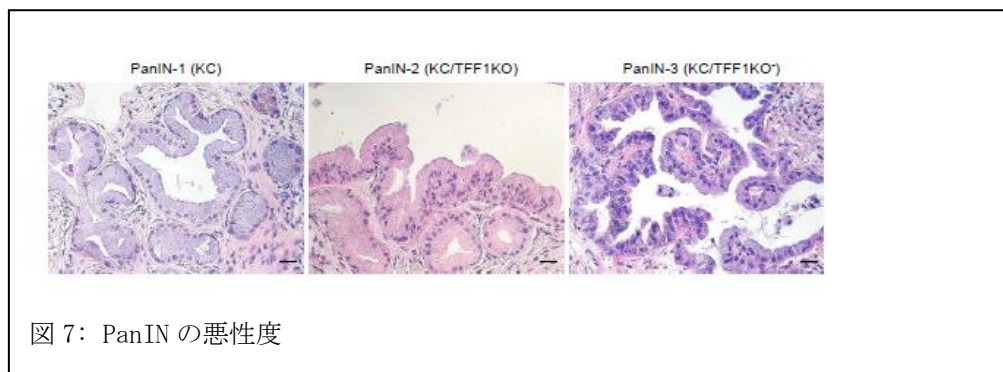


図 7: PanIN の悪性度

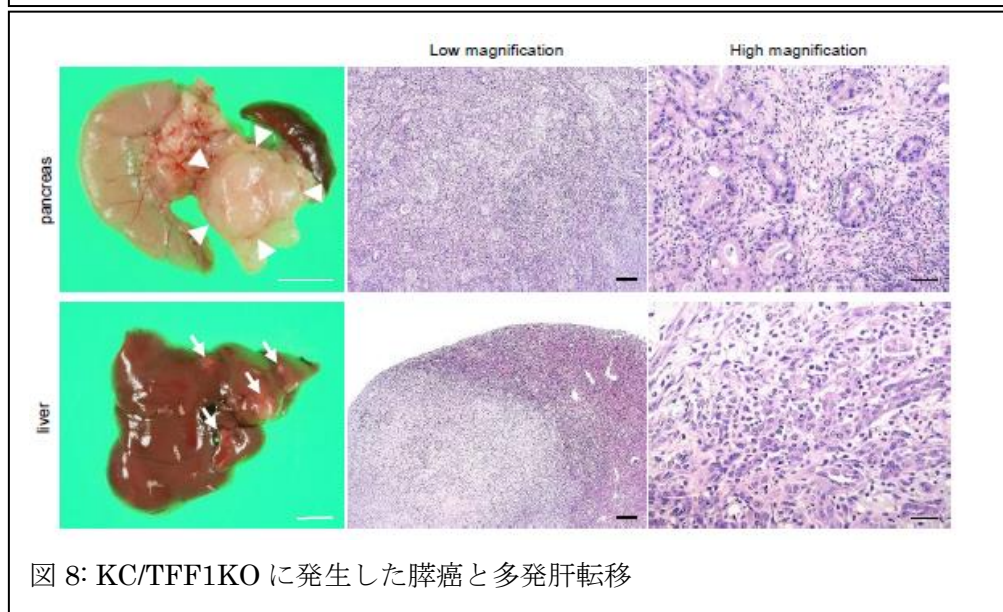


図 8: KC/TFF1KO に発生した膵癌と多発肝転移

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi J, Yokoyama Y, Kokuryo T, Ebata T, Enomoto A, Nagino M.	4. 巻 128(8)
2. 論文標題 Trefoil Factor 1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic intraepithelial neoplasm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 3619-3629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI97755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masaki Sunagawa, Junpei Yamaguchi, Toshio Kokuryo, Tomoki Ebata, Yukihiro Yokoyama, Gen Sugawara, Masato Nagino	4. 巻 17 (5)
2. 論文標題 Trefoil factor family 1 expression in the invasion front is a poor prognostic factor associated with lymph node metastasis in pancreatic cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 782-787
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pan.2017.07.188.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ochiai Y, Yamaguchi J, Kokuryo T, Yokoyama Y, Ebata T, Nagino M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Trefoil Factor Family 1 Inhibits the Development of Hepatocellular Carcinoma by Regulating Catenin Activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.31039.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Y, Yamaguchi J, Kokuryo T, Ebata T, Yokoyama Y, Nagino M.	4. 巻 506(1)
2. 論文標題 Loss of trefoil factor 1 inhibits biliary regeneration but accelerates the hepatic differentiation of progenitor cells in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 12-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.10.023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Junpei Yamaguchi, Yukihiro Yokoyama, Toshio Kokuryo and Masato Nagino
2. 発表標題 Trefoil Factor 1 inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) of pancreatic intraepithelial neoplasm.
3. 学会等名 AACR Pancreatic cancer: advances in science and clinical care (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junpei Yamaguchi, Masaki Sunagawa, Yukihiro yokoyama, Toshio Kokuryo, Tomoki Ebata, Masato Nagino
2. 発表標題 Preserved expression of TFF1 in invasive front is a poor prognostic factor in PDAC
3. 学会等名 Joint Congress of The 6th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association & The 29th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口淳平、江畑智希、横山幸浩、國料俊男、柳野正人
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを用いたTFF1欠損による膵浸潤癌発生に関する検討
3. 学会等名 第48回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 J. Yamaguchi, T. Kokuryo, Y. Yokoyama, T. Ebata, and M. Nagino
2. 発表標題 Trefoil Factor Family 1 (TFF1) Inhibits Epithelial-mesenchymal Transition and Enhances the Chemosensitivity of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC)
3. 学会等名 APA annual meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口淳平、江畑智希、横山幸浩、國料俊男、伊神剛、水野隆史、尾上俊介、渡辺伸元
2. 発表標題 TFF1による膵発癌抑制機構の検討
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口淳平、横山幸浩、江畑智希、國料俊男、柳野正人
2. 発表標題 IPMNの発生起源と発癌機序
3. 学会等名 日本膵臓学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柳野 正人 (Nagino Masato) (20237564)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	國料 俊男 (Kokuryo Toshio) (60378023)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	横山 幸浩 (Yokoyama Yukihiro) (80378091)	名古屋大学・医学系研究科・寄附講座教授 (13901)	