

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02881

研究課題名(和文) NGS解析による膵癌微小環境とゲノム不均一性の解明とその治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of genomic heterogeneity in pancreatic cancer microenvironment via NGS analysis for therapeutic development

研究代表者

進藤 幸治 (SHINDO, Koji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00788432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵癌発生から転移形成までの段階的進展に伴って重積する遺伝子変異を膵癌自然発生マウス及び次世代シーケンサーを用いて解析した。肝転移を形成した個体では、膵原発にみられた遺伝子変異が発癌初期の段階で末梢血中にもCTCとして検出され、週齢が進むにつれmutationが蓄積すること、を明らかにした。さらにヒト膵癌組織から樹立した膵癌オルガノイドDNAに対してTargeted DNA sequencingを行い、マウスモデルで抽出したmutationと比較しヒトにおいて転移・浸潤能の獲得に関わるmutationの抽出を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前癌病変から癌化、転移や播種に至る各段階における遺伝子変異蓄積を詳細に検討し、さらにヒト検体に対してvalidationを行うことによって膵癌悪性度の大きな要因の一つである転移・浸潤に関わる遺伝子変異を絞り込むことができた。これら候補遺伝子変異による癌細胞の性質変化を捉えることは、膵癌進展の各段階における標的治療の開発につながると考えられる。また、この結果から末梢血中癌細胞からの遺伝子変異抽出によってゲノムレベルでの膵癌進展段階評価が可能となり、さらには各段階に適した標的治療法を選択するといった膵癌における個別化治療を強く推しすすめる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：We analyzed gene mutations that overlap during the stepwise progression from pancreatic cancer development to metastasis formation using genetically engineered mouse model and next-generation sequencers. In cases with liver metastases, genetic mutations found in primary pancreatic cancer were also detected in CTCs of peripheral blood in the early stage of pancreatic cancer, and mutations accumulated as the cancer progressed. Next, we performed targeted DNA sequencing on pancreatic cancer organoids established from human pancreatic cancer tissues to extract mutations related to the acquisition of metastability and invasiveness in human through the comparison with mutations extracted from mouse models.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 次世代シーケンサー NGS解析 KPCマウス CTC オルガノイド heterogeneity

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は症状が出にくいいため早期診断が困難で、予後は非常に悪い。そのため、膵癌予後改善のためには、発生から浸潤転移に至るまでのそれぞれの段階における分子細胞学的変化に基づいた診断・治療法を開発することが急務である。膵癌は、PanIN (Pancreatic intraepithelial neoplasia) と呼ばれる前癌病変が知られており、KRAS をはじめとする遺伝子変異から CDKN2A, TP53, SMAD4 など種々の遺伝子変異やコピー数異常が蓄積し癌化するといった多段階的プロGRESSIONモデルが広く認知されているが、現状では膵癌早期発見手法の確立はなされていない。それは、癌組織内の遺伝子変異が均一ではなく、同一細胞内に多数の変異が起きている遺伝子をコストや精度の観点からに不十分であることが一因であったと考えられるが、近年実用化が進んでいる次世代シーケンサー (NGS; Next Generation Sequencing) と膵癌自然発生遺伝子改変マウスやオルガノイドといった膵癌プラットフォームを併用すれば、微小環境中の発癌から転移や播種に至るまで各段階での研究介入が可能となると考えられた。そこで抽出された遺伝子変異の中から各段階における key となる遺伝子変異を見つけ、膵液、十二指腸液、血液からリキッドバイオプシーで検出できる手法を確立できれば、膵癌の早期発見から治療成績改善に寄与することができると考えられ、本構想に至った。

2. 研究の目的

前癌病変 PanIN の段階的進展に伴って重積する遺伝子変異、および癌化から転移や播種に至る各段階での課程を、KPC マウス (KRAS, TP53 遺伝子変異の膵癌自然発生マウス) から取得した DNA および次世代シーケンサーを用いて詳細に解析し、各段階における key mediator 変異を発見し、制御する方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

膵癌自然発生マウスを用いた膵癌段階的進展の確認

膵癌自然発生マウスである、LSL-KrasG12D/+;LSL-Trp53R172H/+;Pdx-1-Cre (KPC) マウスを用いて、膵癌原発巣発生から血中循環がん細胞 (CTC: Circulating Tumor Cell) の出現、肝転移および癌性腹水の出現を経時的に観察し、それら検体の病理学的評価を行った。

膵癌進展における各段階サンプルからの DNA 抽出および NGS 解析

1. で採取した膵癌原発巣、転移巣、CTC (血中 CD45 陰性細胞)、癌性腹水それぞれのサンプルから DNA を抽出し、Whole exome sequencing によってゲノム解析を行った。

マウスモデルにおける膵癌進展に際して出現する遺伝子変異の検出

解析に用いる癌遺伝子および癌抑制遺伝子を選択し、custom gene panel を作成した。原発巣・CTC・肝転移・癌性腹水の各サンプルで有意な mutation を抽出した。経時的に採取した CTC サンプルのゲノムデータから原発巣と同じ変異を有する CTC の末梢血に出現する時期を検討した。肝転移や癌性腹水サンプルにおいて有意に認める遺伝子変異を抽出し、転移形成に関連する遺伝子変異候補を選定した。

ヒト膵癌オルガノイドを用いたヒトの膵癌進展に関わる遺伝子変異における検証

ヒト膵癌オルガノイドを用いて Target sequencing を行い、膵癌進展過程において蓄積する遺伝子変異を抽出した。さらにマウスモデルで抽出した膵癌進展に伴って蓄積する遺伝子変異データとの validation を行い、ヒト膵癌進展に関わる key mediator 変異を選出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Feng Haimin, Moriyama Taiki, Ohuchida Kenoki, Sheng Nan, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Shirahane Kengo, Ikenaga Naoki, Nagai Shuntaro, Nakata Kohei, Mizumoto Kazuhiro, Nakamura Masafumi	4. 巻 40
2. 論文標題 N-acetyl cysteine induces quiescent-like pancreatic stellate cells from an active state and attenuates cancer-stroma interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-021-01939-1	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 Iwamoto Chika, Ohuchida Kenoki, Shinkawa Tomohiko, Okuda Sho, Otsubo Yoshiki, Okumura Takashi, Sagara Akiko, Koikawa Kazuhiro, Ando Yohei, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Moriyama Taiki, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Eto Masatoshi, Akashi Koichi, Nakamura Masafumi	4. 巻 512
2. 論文標題 Bone marrow-derived macrophages converted into cancer-associated fibroblast-like cells promote pancreatic cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 15～27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.04.013	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 Kimura R, Ohtsuka T, Kubo M, Kajihara A, Fujii A, Watanabe Y, Mori Y, Ikenaga N, Nakata K, Shindo K, Ohuchida K, Nakamura M	4. 巻 51
2. 論文標題 FoundationOne CDx gene profiling in Japanese pancreatic ductal adenocarcinoma patients: a single-institution experience	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 619～626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-020-02123-2	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 Nakayama H, Ohuchida K, Yonenaga A, Sagara A, Ando Y, Kibe S, Takesue S, Abe T, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Shido K, Miyoshi K, Nakata K, Moriyama T, Miyasaka Y, Inoue S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M	4. 巻 55
2. 論文標題 S100P regulates the collective invasion of pancreatic cancer cells into the lymphatic endothelial monolayer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 211～222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4812.	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 Ando Yohei, Ohuchida Kenoki, Otsubo Yoshiki, Kibe Shin, Takesue Shin, Abe Toshiya, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis in pancreatic cancer promotes cancer cell migration and invasion by release of CXCL5	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0228015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0228015	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 Yan Zilong, Ohuchida Kenoki, Fei Shuang, Zheng Biao, Guan Weiyu, Feng Haimin, Kibe Shin, Ando Yohei, Koikawa Kazuhiro, Abe Toshiya, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Mizumoto Kazuhiro, Hashizume Makoto, Nakamura Masafumi	4. 巻 38
2. 論文標題 Inhibition of ERK1/2 in cancer-associated pancreatic stellate cells suppresses cancer?stromal interaction and metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-019-1226-8	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 Gotoh Y, Ohtsuka T, Nakamura S, Shindo K, Ohuchida K, Miyasaka Y, Mori Y, Mochidome N, Oda Y, Nakamura M	4. 巻 165
2. 論文標題 Genetic assessment of recurrent pancreatic high-risk lesions in the remnant pancreas: Metachronous multifocal lesion or local recurrence?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 767-774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2018.10.025	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 Ohtsuka Takao, Tomosugi Takahiro, Kimura Ryuichiro, Nakamura So, Miyasaka Yoshihiro, Nakata Kohei, Mori Yasuhisa, Morita Makiko, Torata Nobuhiro, Shindo Koji, Ohuchida Kenoki, Nakamura Masafumi	4. 巻 49
2. 論文標題 Clinical assessment of the GNAS mutation status in patients with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 887 ~ 893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-019-01797-7	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13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、中村祥一、久野恭子、奥田翔、大坪慶志輝、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、永井俊太郎、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞が膵癌分化度に与える影響についての検討
3. 学会等名 第57回九州外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、仲田興平、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 微小環境因子依存性に基ついた膵癌subtype分類および薬物治療抵抗性についての検討
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本千佳、大内田研宙、新川智彦、大坪慶志輝、奥田翔、進藤幸治、赤司浩一、大塚隆生、江藤正俊、中村雅史
2. 発表標題 膵癌微小環境下で骨髓造血幹細胞はCAF様の形態・機能を獲得し、膵癌の局所浸潤を誘導する
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Iwamoto C, Ohuchida K, Shinkawa T, Otsubo Y, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Ohtsuka T, Nakamura M
2. 発表標題 Human macrophages-derived CAF-like cells lead the invasion of pancreatic cancer
3. 学会等名 14th World Congress of International Hepeto-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Shinkawa T, Ohuchida K, Iwamoto C, Shindo K, Nakata K, Ohtsuka T, Nakamura M
2 . 発表標題 Subtype classification of pancreatic ductal adenocarcinoma based on microenvironmental niche factors dependency and chemotherapy resistance
3 . 学会等名 14th World Congress of International Hepeto-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Iwamoto C, Ohuchida K, Ando Y, Shinkawa T, Ohtsubo Y, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyawaki K, Ohtsuka T, Akashi K, Eto M, Nakamura M
2 . 発表標題 BM-Derived Cells Destruct Basement Membrane and Induce Local Invasion of Pancreatic Cancer
3 . 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ando Y, Ohuchida K, Otsubo Y, Sagara A, Kibe S, Takesue S, Nakayama M, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2 . 発表標題 Necroptosis in Pancreatic Cancer Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Release of CXCL5
3 . 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sagara A, Nakata K, Yamashita T, Guan W, Matsumoto S, Date S, Ohtsubo Y, Shinkawa T, Kimura R, Fujii A, Ando Y, Iwamoto C, Watanabe Y, Shindo K, Ikenaga N, Moriyama T, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M
2 . 発表標題 Repositioning of Duloxetine as a New Drug for Targeting Pancreatic Cancer Microenvironment
3 . 学会等名 The 50th Annual Meeting of the American Pancreatic Association(APA) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本千佳、大内田研宙、安藤陽平、新川智彦、大坪慶志輝、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、宮脇恒太、赤司浩一、江藤正俊、中村雅史
2. 発表標題 膵癌微小環境を構築する骨髄由来細胞が膵癌浸潤を先導する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤陽平、大内田研宙、岐部晋、武居晋、中山宏道、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 膵癌細胞への異なった細胞死誘導による遊走・浸潤能への影響の比較
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本千佳、大内田研宙、武居晋、進藤幸治、宮脇恒太、赤司浩一、橋爪誠、江藤正俊、中村雅史
2. 発表標題 膵臓に誘導され膵癌微小環境を構成する骨髄由来細胞が膵癌浸潤を制御する
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山宏道、大内田研宙、相良亜希子、米永晃子、安藤陽平、岐部晋、武居晋、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、宮坂義浩、藤田逸人、永井俊太郎、岡部安博、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 S100Pが癌細胞塊のリンパ管内皮層へのクリアランスに関与しリンパ節転移に関わる
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新川智彦、巖子龍、大内田研宙、大坪慶志輝、松本奏吉、米永晃子、相良亜希子、関維雨、馮海旻、安藤陽平、岐部晋、武居晋、中山宏道、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、永井俊太郎、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 肺癌におけるERK1/2阻害剤による癌間質相互作用の抑制効果の検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
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	井上 重隆 (INOUE Shigetaka) (00529802)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	江上 拓哉 (EGAMI Takuya) (40507787)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	宮坂 義浩 (MIYASAKA Yoshihiro) (40507795)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	前山 良 (MAEYAMA Ryo) (10611668)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	仲田 興平 (NAKATA Kohei) (30419569)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	鬼丸 学 (ONIMARU Manabu) (80529876)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	池永 直樹 (IKENAGA Naoki) (90759755)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	中村 雅史 (NAKAMURA Masafumi) (30372741)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関