

令和 5 年 10 月 23 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07081

研究課題名（和文）メラノコルチン1型受容体機能低下の膵臓がんへの関与

研究課題名（英文）Involvement of melanocortin type 1 receptor dysfunction in pancreatic carcinogenesis

研究代表者

高橋 真美（Takahashi, Mami）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：90214973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：白人由来の膵がん細胞株におけるMC1Rの一塩基多型（SNP）を調べたところ、8株中5株（62.5%）が赤毛・色白タイプの顕性バリエントを有しており、欧州人に見られる割合（26%）と比較して高い頻度であった。一方、日本人患者由来の72症例の膵臓がん細胞株におけるMC1R SNPを解析したところ、日本人に多い潜性バリエントの1つが69%の細胞株で両アレルに認められ、一般の日本人（54%）より有意に高いことを見出した。MC1Rバリエントは膵臓がんの危険因子である可能性が考えられた。しかしながら、Mc1r変異を有するMc1r^{e/e}マウスでは、膵がんや腫瘍増殖に対する明らかな影響は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の膵がん患者では欧米人とは異なり、MC1Rの潜性バリエントを両アレルに有していることが多いことが示されたことから、その特徴に応じた日本人に適した治療法の開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We examined single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the MC1R gene in pancreatic cancer cell lines of Caucasian origin and found that 5 of 8 lines (62.5%) had dominant variants of the red hair and fair skin type, being highly frequent compared to the percentage observed in European people (26%). On the other hand, analysis of MC1R SNPs in 72 pancreatic cancer cell lines derived from Japanese patients revealed that one of the recessive variants, which is common in Japanese, was found in both alleles in 69% of the cell lines, significantly higher than that in the general Japanese population (54%). MC1R variant is a possible risk factor for pancreatic cancer. However, analysis using Mc1r^{e/e} mice with the Mc1r variant showed no apparent effect on carcinogenesis or tumor growth.

研究分野：腫瘍学

キーワード：膵臓がん メラノコルチン受容体 一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

疫学的研究により膵臓がんのリスク要因として、喫煙の他に、慢性膵炎、糖尿病、肥満、運動不足、加齢等が挙げられているが、その発がんの分子メカニズムは未だ良くわかっていない。エネルギー代謝にはメラノコルチン受容体 (MCR) 経路が重要な役割を果たしており、免疫・炎症の制御にも関わっていることが報告されている (Voisey J et al, 2002)。そこで、MCR 経路の異常が肥満・炎症関連発がんに関与しているのではないかと考え、膵臓がんにおける MCR の関与について研究を行ってきた。マウスモデルを用いたこれまでの研究において、メラノコルチン受容体の阻害作用を有する Agouti が膵臓がんを促進することを見出した。Agouti による発がん促進の機構として、摂食抑制やエネルギー代謝に関連する MC4R に対する阻害、及び、色素合成や免疫に関与する MC1R の阻害の両方が考えられた。Agouti の高発現がマウス膵臓がんを促進した研究のメカニズム解析を行うなかで、がん細胞における MC4R と MC1R の発現が協調的に変化することを見出した。がん細胞への Agouti の導入によって、Adipogenesis 関連因子 X の発現の上昇が見られたが、この上昇に MC1R が関与している可能性が示唆された。また、この遺伝子産物にはサイトカインの誘導活性が見られ、好中球やマクロファージの遊走・集積に寄与すると考えられたことから、炎症や免疫寛容などが腫瘍増殖促進に寄与すると想定された。さらに、欧米人由来の既存の膵臓がん細胞株の MCR 発現を調べるうちに、MC1R の発現に注目するようになり、膵臓がんにおいて、エネルギー代謝に関わる MC4R の発現が低下することにより、MC1R の発現が上昇する一方、Agouti によるインパースアゴニスト作用もしくは MC1R の機能に関わる変異により炎症や免疫寛容が惹起されて、発がんが促進されるのではないかと仮説に至った。

メラノーマに関する研究では、MC1R が発現し、且つ、ASIP (Agouti のヒトホモログ) によって正常な機能が阻害され、別経路が活性化されると、がん細胞の遊走活性や浸潤能が上昇することが報告されている (Le Pape E et al, 2009; Chung H et al, 2012)。ヒト膵臓がんにおけるメラノコルチン受容体の発現を調べたところ、MC4R の発現はほとんどなく、MC1R が発現していたが、その多くには色素合成活性が低いタイプの SNPs が見られた。また、膵臓の化学発がん感受性であるハムスターは MC1R 活性に重要な部位のアミノ酸に置換があり、毛色が黄色である。これらのことから、本研究では膵臓がんにおける MC1R 機能低下の影響をヒト膵臓細胞及びマウス膵臓発がんモデルにおいて検討するという着想に至った。

Mc1r に変異を持つ Mc1r ^{e/e}マウスの皮膚では酸化的損傷が増加しており、BRAF 変異導入モデルにおいてメラノーマの発症が促進したことが報告されている (Mitra D et al, 2012)。ヒト発がんへの関与としては、UV 反応性に関わる MC1R の SNPs がメラノーマ (Matichard E et al, 2004) やその他の皮膚がん (Tagliabue E et al, 2015) のリスクに関与することが報告されているが、膵臓がんとの関連は不明であった。

2. 研究の目的

膵臓がんのリスクファクターである肥満/糖尿病には、高脂肪食や運動不足等の生活習慣・環境要因に加え、遺伝的な素因が深く関与しており、個人差もあるが、人種差も大きい。それらが膵臓がん感受性にもかかわっていると考えられる。MC1R の SNPs は、人種差に関わる髪や皮膚の色、紫外線反応性との関連が報告されている (Rana BK et al, 1999; Ding Q et al, 2014)。日本人は欧米人のような極度な肥満症は少ないにもかかわらず、インスリン抵抗性・糖尿病を起こ

(3) マウス膵臓発がんモデルにおける Mc1r 変異の影響の検討

膵臓発がんモデルマウス Ptf1a-Cre/LSL-Kras<G12D/+>と Mc1r に変異を持つ Mc1r<e/e>マウスを交配して 40 週齢まで飼育し、毛色の黄色い Ptf1a<cre/+>-Kras<G12D/+>-Mc1r<e/e>と黒色の Ptf1a<cre/+>-Kras<G12D/+>-Mc1r<e/+>における膵臓発がん率・個数や転移の有無を正常型 Mc1r のコントロールと比較し、MC1R 変異が Agouti と同様に膵臓発がんを促進するかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1)膵がん手術検体・日本人由来膵がん細胞株における解析

白人由来の膵がん細胞株では、8 株中 5 株 (62.5%) が赤毛・色白タイプの顕性バリエントを有しており、欧州人に見られる割合 (26%) と比較して高い頻度であった。72 症例の日本人膵がん患者由来の細胞株では、日本人に多い潜性バリエントの 1 つが 69% の細胞株で両方のアレルに認められ、一般の日本人 (54%) より有意に高いことを見出した。ヘテロ型がその分少なくなっており、ヘテロ型の約半数で、もう一つの SNPs のヘテロ型が検出された。膵がん患者では両アレルとも MC1R の SNPs を有する割合が高いと考えられた。なお、MC1R が両アレルとも野生型である膵がん細胞株は、欧米人由来膵がん細胞株 2 株と日本人由来膵がん細胞株 1 株で、そのいずれも MC4R の近傍 SNP が肥満型ホモタイプであったことから、膵がん患者では、MC1R と MC4R の少なくともどちらかは機能低下していることが示唆された。膵がん患者と比較するため、研究協力者より供与された日本人胃がん患者腹水由来細胞株約 50 株の DNA についても PCR 法により MC1R 遺伝子を増幅して、ダイレクトシーケンス解析により SNPs/点突然変異の有無を調べた。その結果、胃がんでは、日本人に多い 2 つのタイプの SNPs のうちの両方でホモ型が検出され、膵がんとはやや異なる部分が見られたが、一番多かったのは膵がんが多い SNP のホモタイプであった。

MC1R の潜性バリエントを両アレルに有する細胞株とそれ以外の細胞株との cDNA アレイ発現を比較解析した結果、adipogenesis 関連因子 X の発現には有意差が認められなかったが、前者では、好中球遊走因子 Y を含む複数のケモカインの発現が高いことが示唆された。手術検体由来の細胞株も含め、ケモカイン Y の発現レベルをリアルタイム RT-PCR により定量した結果、平均値で約 6 倍高く、群間でも統計的有意差が確認された。

細胞株への遺伝子導入による MC1R バリエントの機能解析については、野生型 MC1R 遺伝子を有する正常膵管由来のヒト不死化膵管細胞株への遺伝子導入を行ってみたが、遺伝子導入効率が悪く、再検討が必要である。

(2)マウス膵がん細胞株の同種移植モデルにおける Mc1r 変異の腫瘍増殖への影響の検討

マウス膵がん細胞株の皮下移植モデルでは、Agouti を高発現する肥満モデルの Ay マウスへの移植で増殖に差が見られた KMPC9 細胞を Mc1r<e/e>マウス、Mc1r<e/+>マウスとその野生型マウスに皮下移植を行なった結果、移植腫瘍の増殖に有意差は認められなかった。膵がん細胞を膵臓に移植する同所移植モデルにおいても、Mc1r<e/e>マウス、Mc1r<e/+>マウスとその野生型マウスで、腫瘍の増殖に対する宿主の Mc1r 変異の有無の明らかな影響は認められなかったが、膵臓への同所移植モデルでは胸水の貯留や肺への微小転移が野生型に比べ、Mc1r 変異マウスの雄で多い傾向が見られた。

(3) マウス膵臓発がんモデルにおける Mc1r 変異の影響の検討

マウス膵臓発がんモデルと MC1R 変異マウスを膵臓発がんモデルマウスと交配して、MC1R 変異が Agouti と同様に膵臓発がんを促進するかどうかを検討した結果、発がん頻度は、雄では Mc1r の野性型、ヘテロ変異型では差は見られず、ホモ変異ではやや低くなる傾向にあり、雌では Mc1r の野性型に比べ、ホモ変異型、ヘテロ変異型でやや発がん頻度が高まったが、いずれも有意差は認められなかった。ヘテロ変異型に比べ、ホモ変異型、野性型の出生率がメンデルの法則より低く、個体数を多数集めるのが困難であった。

Mc1r^{e/e}マウスは、肥満モデルの Ay マウスと同様に毛色は黄色を呈するが、肥満はせず、加齢による膵臓の脂肪浸潤も認められなかった。高脂肪食によって肥満させ、膵臓の脂肪浸潤が起きるかどうかも検討したが、野性型と同レベルであった。

Agouti による膵臓発がん促進は、雌で有意に見られており、Mc1r の機能低下も一部関わっている可能性はあるが、肥満を引き起こすことが知られている Mc4r の阻害の影響が大きいと考えられ、今後、Mc4r の阻害や、Mc4r と Mc1r の同時阻害の膵臓発がんへの影響を検討していきたいと考えている。Mc1r の変異は、腫瘍の増殖自体よりも、ケモカインなどの誘導により転移の促進等に寄与する可能性があると考えられた。また、ヒトにおいても MC1R のパリアントは、その SNPs の位置によって機能低下の程度や性質が異なることが示唆されており、日本人に多い潜性パリアントと同じアミノ酸の変異を導入したマウスを作製して解析することも有用だと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Mami, Hori Mika, Ishigamori Rikako, Mutoh Michihiro, Imai Toshio, Nakagama Hitoshi	4. 巻 109
2. 論文標題 Fatty pancreas: A possible risk factor for pancreatic cancer in animals and humans	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3013～3023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13766	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋真美、石ヶ守里加子、尾野雅哉、平岡伸介、今井俊夫。
2. 発表標題 膵がん患者由来ゼノグラフトモデルにおける高脂肪食による腫瘍の増殖促進及び関連遺伝子・タンパク質発現の変化に関する検討。
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋真美、石ヶ守里加子、千脇史子、平岡伸介、佐々木博己、今井俊夫
2. 発表標題 膵がん患者由来培養細胞株移植マウスモデルの構築と組織型に関する検討
3. 学会等名 患者由来がんモデル講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋真美、石ヶ守里加子、平岡伸介、今井俊夫
2. 発表標題 膵臓がんゼノグラフトの同所及び皮下移植モデルにおける組織形態及び間質割合の比較検討
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋真美、石ヶ守里加子、平岡伸介、今井俊夫
2. 発表標題 マウス膵がん同種移植モデル及び膵がん患者由来ゼノグラフトモデルにおける高脂肪食の腫瘍増殖への影響
3. 学会等名 第29回日本消化器癌発生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 真美、千脇 史子、小松 将之、松崎 圭祐、平岡 伸介、竹下 文隆、佐々木 博己、今井 俊夫
2. 発表標題 患者由来膵がん細胞株におけるメラノコレチン4型受容体遺伝子近傍SNPのLOH及びアレル特異的遺伝子発現に関する解析。
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋真美、石ヶ守里加子、千脇史子、佐々木博己、平岡伸介、今井俊夫
2. 発表標題 がん微小環境の研究と抗がん剤の薬効評価に有用なin vivo膵がんモデルの樹立。
3. 学会等名 第34回発癌病理研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋真美、今井俊夫。	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 V 11. 国立がん研究センター国立がん研究センター研究所F10Cでの上皮性腫瘍PDXモデルの樹立例。「患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド」編集/佐々木博己。	

〔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
研究協力者	佐々木 博己 (Sasaki Hiroki) (60235265)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員 (82606)	
研究協力者	平岡 伸介 (Hiraoka Nobuyoshi) (40276217)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長 (82606)	

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