

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07153

研究課題名(和文)膵臓がん転移予防薬の標的因子の同定と漢方薬の効果

研究課題名(英文) Identification of target factors for pancreatic cancer metastasis preventive drugs and the evaluation of Kampo medicine

研究代表者

高橋 哲史 (Takahashi, Tetsufumi)

横浜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40449004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がん細胞の3D培養系による遺伝子解析により、膵臓がんの転移に関するPSCAと同様な分子発現パターンを示す因子としてMUC1が同定された。このMUC1はPSCAにより発現制御されることも示され、PSCA同様、膵臓がん患者の予後不良予測因子であることも明らかとなった。さらに、膵臓がん細胞を用いたエクソソームの表面マーカーを指標とした量的評価系、並びにエクソソーム含有EPS8を指標にしたエクソソームの質的評価系の構築に必要なベクターセットの構築を行なった。実際にCD63末端に発光タンパク質を導入した細胞株の樹立を行い、本細胞株によりエクソソーム生成を定量的に評価できることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんは未だ予後不良のがんであり、その治療も限られている。新たな治療法の開発が必要であり、その標的因子の探索は重要な研究テーマである。本研究では、近年、臨床を比較的反映していると評価されている3D培養を用いて、新たな視点から膵臓がんの転移・悪性化制御因子の同定を行なった。また、膵臓がん転移に重要なエクソソームについて、質的・量的な活性評価を3D培養細胞で行うことが可能な技術開発を行なった。また、活性評価系に適した漢方薬のライブラリー作製も行なった。本成果により、新たな観点に基づいた漢方薬による膵臓がん治療の可能性について、評価可能となったものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genetic analysis using a 3D culture system of pancreatic cancer cells identified MUC1 as a factor that exhibits a similar molecular expression pattern to PSCA, which is involved in pancreatic cancer metastasis. The expression of MUC1 was also shown to be regulated by PSCA, and it was also found to be a poor prognostic factor for pancreatic cancer patients, just like PSCA. Furthermore, we constructed a vector set necessary for the construction of an exosomal quantitative evaluation system targeting for surface markers, and an exosomal qualitative evaluation system targeting for exosome-containing EPS8 in pancreatic cancer cells. We established a luminescence gene knock-in cells to the end of CD63 coding sequences in pancreatic cancer cells, which is able to evaluate the production of exosome quantitatively.

研究分野：病態生理学

キーワード：膵臓がん エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは予後が非常に悪く、転移・悪性化機構を解明し、これらを防ぐ薬物療法の確立が必要である。申請者はこれまで膵臓がん細胞を用いた 3D 培養系の構築を行い、本培養系で膵臓がんの転移・悪性化との関与が示唆されている前立腺幹細胞抗原(Prostate Stem Cell Antigen: PSCA)の発現亢進が認められている。

膵臓がんの悪性化に関与する分子機構の 1 つとして、膵臓がん自身の癌幹細胞化が挙げられ、この癌幹細胞化に関わる遺伝子について、新規膵臓癌治療薬の標的となり得る可能性が考えられる。一方、近年、がん細胞が分泌するエクソソームが、がんの転移に重要な役割を果たすことが明らかとなりつつあった。落谷らによる報告により、EPS8 や GPRC5C が膵臓がん患者の血清由来のエクソソームにおいて有意に高発現していることが明らかとなっていた。しかしながら、これら因子の膵臓がん細胞での発現制御機構、これら因子を含むエクソソームの及ぼす影響の詳細は明らかとなっていなかった。

膵臓がんは多様性を示すことが知られており、それぞれの細胞での遺伝子発現を比較し、個々の細胞ごとの遺伝子発現調節機構および転移・悪性化機能を理解することが重要であると考えられる。近年、臨床を比較的反映していると有用性が高まっている 3D 培養であるが、一方で一過性に遺伝子導入を行なった細胞を 3D 培養するのは困難である。そのため、3D 培養細胞で各種遺伝子機能を解析するには、染色体 DNA への遺伝子ノックインもしくは遺伝子欠損誘導を行い、安定発現細胞株を構築した後に、3D 培養を行なって各種解析を行う必要がある。膵臓がん細胞は多種存在するが、一般的な遺伝子導入試薬での導入効率が極めて低い細胞が多く、効率の良い遺伝子ノックイン法の構築が必要である。近年、ゲノム編集を利用した遺伝子ノックイン法として PITCH 法が報告され、その有用性が示唆されていた。

2. 研究の目的

漢方薬による膵臓がんの転移・悪性化を制御する新たな治療法を探索するために、新規標的因子の探索を試みた。本申請では、PSCA 高発現誘導 3D 培養系を活かし、膵臓がん原発細胞内シグナルと原発細胞から分泌されるエクソソームの 2 つの視点から膵臓がんの転移抑制薬の標的因子の探索を行った。これらは、膵臓がん患者の予後向上につながる新規治療法の標的因子となり得るものと考えられるため、漢方薬によるこれら標的因子の制御活性を評価可能なアッセイ系の構築を試みた。また、エクソソームの分泌制御に非特異的な影響を与えない漢方薬のライブラリーの構築も試みた。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞

ヒト膵臓がん細胞 KMP2、PANC-1、および Capan-1 を用いた。

(2) 遺伝子発現解析

膵臓がん細胞を通常のプラスチックシャーレを用いた 2D 培養、もしくは細胞低吸着プレートを用いた 3D 培養を 7 日間行った後、RNA を抽出した。得られた RNA を使用し、外部機関による Novaseq を用いた RNAseq 解析を行なった。得られた塩基配列情報を、解析ツールである RaNA-seq のパイプラインに基づいてトリミングとクオリティコントロールを実施し、発現変動候補遺伝子をピックアップした。さらに、これら遺伝子の発現を、定量的 RT-PCR による解析を行なった。

(3) エクソソーム中のタンパク質発現解析

3D 培養した KMP2 細胞の培養上清からエクソソーム様画分を精製し、ウエスタンブロッティングによるタンパク質発現解析を行なった。

(4) ゲノム編集を用いた膵臓がん細胞への遺伝子ノックイン

PITCH 法で用いるドナーベクターに搭載するノックイン遺伝子の相同領域長について、PITCH 法本来の 15bp 程度のものから 800bp 程度まで増加させたものを作製した。また、sgRNA のステムループに特異配列を導入し、これら特異配列を認識するタンパク質 (MS2) とノックイン効率向上をもたらす CtIP を融合した発現ベクターを sgRNA 発現ベクターと同時に用いる LoAD システムベクターを作製した。

(5) 簡易除タンニン済み漢方薬ライブラリーの作製

水溶解和漢薬について、Sephadex LH-20 (GE ヘルスケア・ジャパン社) カラムクロマトグラフィーに供し、水溶出画分を回収し、得られた画分の凍結乾燥を行なった。

4. 研究成果

(1) 膵臓がんの悪性化制御因子の探索

KMP2、PANC-1、および Capan-1 細胞を 2D および 3D 培養して、両培養間での遺伝子発現を比較した結果、KMP2 細胞では 2D 培養時に比べ、3D 培養時において PSCA の有意な発現増加が認められた。一方で、PANC-1、Capan-1 では、この 3D 培養時での PSCA 発現増加は認められなかった。KMP2 細胞では、3D 培養時に CD24 や ALDH1A3 といった癌幹細胞マーカー遺伝子の発現増加も同時に認められた。そこで、3D 培養時で PSCA の発現が誘導される KMP2 と誘導されない PANC-1、Capan-1 で、RNAseq 解析により 2D 培養時より 3D 培養時に遺伝子発現が 2 倍以上発現誘導される遺伝子の比較を行った。その結果、KMP2 の 3D 培養時で 2 倍以上発現上昇が確認され、かつ Capan-1 および PANC-1 の RNAseq 解析で 3D 培養時では発現誘導されなかった遺伝子 312 個を同定した。TCGA (The Cancer Genome Atlas) データベースでこれら遺伝子について、膵臓がんの生存率、予後予測におよぼす影響を解析した結果、同定遺伝子の MUC1 の高発現は、膵臓がんの予後不良予測因子として有意であることが明らかとなった (図 1)。さらに KMP2 細胞で PSCA をノックアウトした結果、MUC1 の遺伝子発現の低下が認められた。PSCA も TCGA データベース解析により膵臓がんの予後不良予測因子として有意であったことから、PSCA、MUC1 が新たな膵臓がんの転移・悪性化治療の標的となり得ることが示唆された。

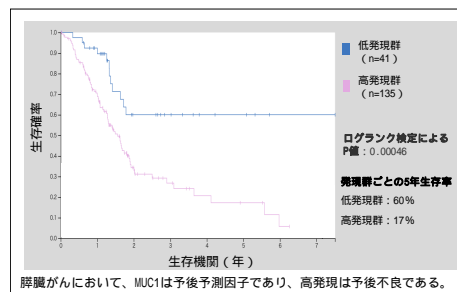


図1 膵臓がん患者におけるMUC1発現と生存期間の関係

(2) 膵臓がん細胞におけるエクソソーム関連因子の発現解析

EPS8 (Epidermal Growth Factor Pathway Substrate 8) および GPRC5C (G protein-coupled receptor class C group 5 member C) について、PSCA および MUC1 の遺伝子発現上昇が認められた KMP2 細胞の 3D 培養時での mRNA 発現を 2D 培養と比較した結果、それぞれ 6.4 ± 1.4 倍および 27.0 ± 2.1 倍有意な発現増加が認められた。さらに、3D 培養した KMP2 細胞の培養上清より Total Exosome Isolation 試薬 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて濃縮したエクソソーム様画分中の蛋白質発現をウェスタンブロッティングにより解析した結果、これら画分において、エクソソームマーカー CD9 に加え、EPS8 や GPRC5C が検出された。EPS8 や GPRC5C は膵臓がん患者由来のエクソソーム中に多く含まれており、特に EPS8 に関しては、膵臓がんの転移・悪性化に重要であると報告されている。TCGA データベースでの解析の結果、EPS8 は膵臓がんの予後不良予測因子として有意であった。そのため、EPS8 を含む KMP2 細胞が分泌するエクソソームを制御する薬物は、膵臓がんの転移・悪性化を抑制する新規治療薬となり得る可能性が考えられる。そのため、膵臓がん細胞由来のエクソソームの表面マーカーとして考えられている CD63 や CD9 を指標とした KMP2 細胞におけるエクソソームの定量評価系は、上述の薬物探索に有用であると考えられた。また、エクソソーム中の EPS8 の定量評価系も、膵臓がん転移・悪性化に関わるエクソソームの質的評価系として有用であると考えられた。

(3) 膵臓がん細胞への遺伝子ノックイン法の確立

従来のゲノム編集を利用したノックイン法である PITCh 法と、本法に改良を加えた改編 PITCh 法とで膵臓がん細胞へのノックイン効率を比較した。改編 PITCh 法は、ドナーベクター中の相同領域を 800bp 程度まで増加することによりマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) だけでなく相同組換え (HR) の DNA 二本鎖切断修復経路も利用することが出来る HMEJ による修復を利用できる。さらに、これらに CtIP LoADING 法を組み合わせることにより、遺伝子ノックイン効率の向上が期待された (図 2)。実際に、トランスフェクションが困難な KMP2 細胞ゲノム中の安全領域である AAVS1 領域に、従来の PITCh 法および改編 PITCh 法により、CMV プロモーター制御下に 2A 配列をリンカーとして EGFP 遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子の両配列の挿入を試みた。必要なベクターセットをトランスフェクション試薬により KMP2 細胞に一過性導入し、一定日後にピューロマイシン含有培地を用いた選択培養を行った結果、改編 PITCh 法を処理した細胞群のみからピューロマイシン耐性株が得られ、これら細胞では EGFP による蛍光が観察された。また、樹立されたピューロマイシン耐性株の AAVS1 領域を DNA シーケンス解析した結果、sgRNA により切断されるノックイン予定領域への正確な遺伝子ノックインが確認された。また、これら細胞では、オフターゲットへの変異誘導は認められず、改編 PITCh 法はトランスフェクション効率が低く、遺伝子ノックインの

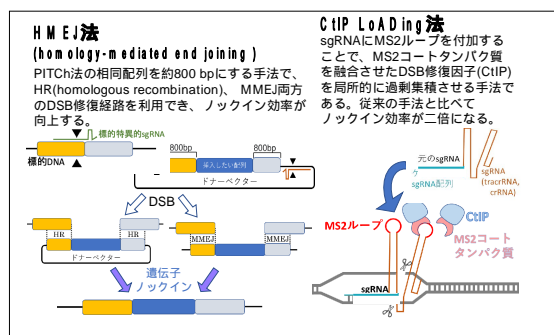


図2 改編PITCh法

困難な多くの膵臓がん細胞株にとって、有用な方法であることが明らかとなった。

(4) 表面マーカーおよび内容タンパク質を指標としたエクソソームの量的・質的評価法の構築
エクソソームの定量が可能となる細胞株の作製を行うため、エクソソームの表面マーカー遺伝子 CD63 および CD9、さらには悪性化制御遺伝子 EPS8 それぞれの遺伝子のコード配列 3' 末端に発光タンパク質の部分配列である HiBiT をノックインする改編 PITCH 法用のベクターセットをそれぞれ作製した。ノックイン配列の HiBiT 下流には 2A 配列をリンカーとしてピューロマイシン耐性遺伝子を同時に搭載した。実際に KMP2 細胞の CD63 遺伝子のコード配列 3' 末端に HiBiT のノックインを試みた結果、ピューロマイシン耐性細胞が樹立出来、樹立細胞の染色体 DNA シーケンス解析の結果から、正確な位置への HiBiT 配列のノックインが確認された。この KMP2 細胞を 3D 培養し、その培養上清に HiBiT に結合する NanoLuc (Promega 社) レシフェラーゼ断片 (LgBiT) と基質を添加し発光値を測定した結果、CD63 プロモーターにより転写された CD63 末端の HiBiT に由来すると考えられる発光が観察された。さらに、この発光値は、エクソソームの生成阻害剤である GW4869 処置により有意に低下し(図3) 本発光値測定によりエクソソーム表面の CD63 を定量的に測定出来るものと考えられた。構築した細胞は CD63 を指標としたエクソソームの生成阻害活性物質の探索に有用であると考えられる。今後、CD9 について同様な細胞株を樹立することにより、複数の表面マーカーについて薬剤の活性の評価が可能となる。また、EPS8 について同様な細胞株を樹立することにより、エクソソームの膵臓がん悪性化に関するエクソソームの質的評価系に用いることが期待される。

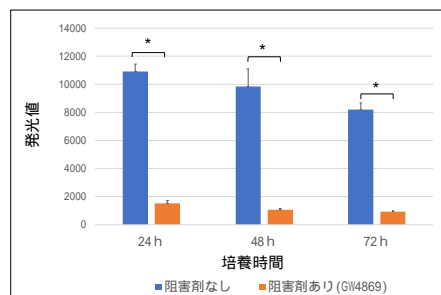


図3 エクソソーム生成阻害剤下でのCD63-HiBiTノックイン KMP2細胞の培養上清における発光値の測定

(5) 簡易除タンニン済み和漢薬ライブラリーの作製

和漢薬についてエクソソームの質的・量的調節活性を検討するにあたり、漢方薬に多く含まれるタンニンの持つ非特異的なタンパク質への結合という性質が悪影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、簡易除タンニン済み和漢薬ライブラリーの作製を行なった。得られたライブラリーは、今後の和漢薬による特異的なエクソソーム調節活性の評価アッセイ系に用いることが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本海人, 高橋哲史, 河本愛華, 伊藤亜希, 五十鈴川和人, 金成俊
2. 発表標題 膵臓がん細胞由来エクソソームにおけるCD9の発現解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大神航輝, 高橋哲史, 河本愛華, 伊藤亜希, 五十鈴川和人, 金成俊
2. 発表標題 膵臓がん細胞におけるEPS8の発現変化の解析および定量化法の構築
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡辺聖崇, 高橋哲史, 伊藤亜希, 五十鈴川和人, 金成俊
2. 発表標題 CD63を指標とした膵臓がん細胞由来エクソソームの定量評価系の構築
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋哲史, 伊藤亜希, 五十鈴川和人, 金成俊
2. 発表標題 3D培養膵臓癌細胞におけるPSCAおよび関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋哲史
2. 発表標題 がん幹細胞の分子制御機構の解析から考える新たながん治療の可能性
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋哲史、堀家慎一、目黒牧子、五十鈴川和人、金成俊、鈴木秀和
2. 発表標題 膵臓がんの再発予防を目的としたイリノテカンの活性増強物質の探索
3. 学会等名 第28回日本がん予防学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 哲史、鈴木 秀和、五十鈴川 和人、金 成俊
2. 発表標題 3D培養ヒト膵臓がん細胞を用いた膵臓がんの転移・悪性化因子の探索研究
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------