

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18080

研究課題名（和文）膵癌治療標的になり得るaxon guidance geneの機能解明への試み

研究課題名（英文）Candidate pancreatic cancer treatment targets among axon guidance genes and its mechanism

研究代表者

田中 伸孟（TANAKA, Nobutake）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：30791066

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：SLIT/ROBO pathwayに代表されるaxon guidance gene familyは、神経ネットワーク構築に關与する遺伝子群であり、種々の発癌過程に關与することが考えられている。

本研究で、ROBO4の発現は原発性膵癌細胞株において全般的に低く、ROBO4の更なるknock downは膵癌細胞の増殖能や浸潤能を悪化させることを確認した。また臨床検体におけるROBO4発現低下症例は有意に予後不良であることが分かった。またその下流メカニズムとして、MMP-9の活性化をきたす経路が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は難治癌であり、現状、癌進行を一時的にでも止めうる薬剤は限られている。新規薬剤開発のためには、膵癌特有の悪性化機序に則したスクリーニングが必要である。膵癌の高度神経浸潤症例は名古屋大学医学部附属病院・消化器外科のデータからも予後不良であることが分かっているが、ROBO4発現低下による神経ネットワーク構築破綻が膵癌の悪性度を高める結果となった今回の研究は、そのひとつの裏付けとなりうるものと考えられる。また、ROBO4がEMT関連遺伝子のひとつMMP-9の発現に逆相関することも興味深く、ROBO4を充足することで腫瘍進行を遅らせるという治療strategyを検討する余地があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Axon guidance, a process of neural network formation, is reported to correlate with pancreatic cancer development. Pancreatic cancer with perineural invasion has significantly poor survival outcomes in our institutional data. One of the axon guidance molecules, ROBO4 expression is significantly downregulated in primary tumor tissues rather than that in adjacent normal tissues in the public database analysis, among Slit/Robo family.

We focused on this molecule to find out its correlation with pancreatic carcinogenesis. ROBO4 was revealed to work tumor-suppressively in pancreatic carcinogenesis. Decreased ROBO4 expression activates the cancer cell ability and was correlated with unfavorable survival outcomes through EMT related MMP-9 pathway.

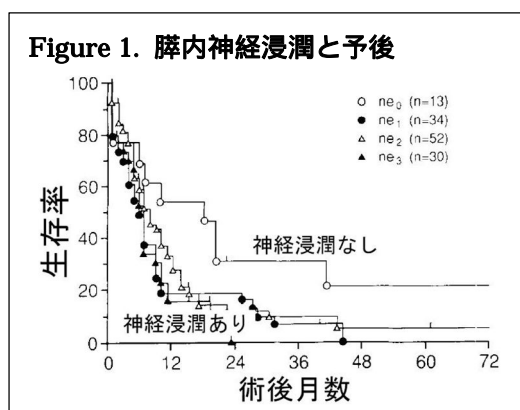
研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 軸索誘導 ROBO4

1. 研究開始当初の背景

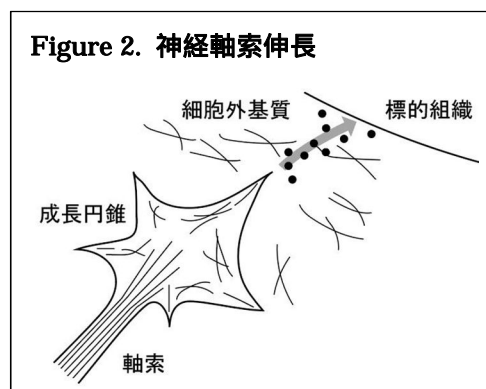
膵癌の5年生存率は未だ15%に満たず、極めて予後不良である。膵癌に対して唯一根治が望める治療は外科的切除であるが、切除可能例の5年生存率も20-40%と決して満足できるものではなく、局所治療としての手術だけでは難治癌である膵癌の根治および治療成績向上は不可能と考えられる。膵癌に有効な化学療法薬・分子標的薬も他の消化器癌と比べて限定的であるが、この原因として膵癌は他の腫瘍と比較して組織内の不均一性 (heterogeneity) が強く、炎症性細胞や間質組織などの量も個々の腫瘍で大きく異なり、膵癌における炎症性組織反応を伴う線維化が化学療法の有効性に影響している可能性もある。これらの背景から、膵癌の臨床的特徴も多様性に富むものとなっており、膵癌の予後改善のためにはどの膵癌に対しても一般的な治療では不十分である。

膵癌が予後不良な疾患である原因の一つとして、特徴的な局所進行様式があげられる。組織学的に局所進行膵癌において神経周囲浸潤が高頻度に認められ、特に腹腔動脈とその分枝である総肝動脈、固有肝動脈や上腸間膜動脈周囲の神経叢は膵癌の浸潤を受けやすい。これら主要動脈周囲の浸潤はたとえ動脈合併切除を伴う拡大手術を行ったとしても高度進行例のため、予後不良であることが知られており、動脈合併切除を伴う膵切除は一般的ではない。実際に、我々の教室で過去に施行された膵癌症例の検討でも、膵外・膵内の神経周囲浸潤を認める膵癌は根治切除を行っても有意に予後が不良で、神経浸潤が膵癌の予後を不良なものとする特徴の一つといえる結果であった (Figure 1. Nakao A, *Pancreas*, 1996)。したがって、膵癌の制御を考えるうえで神経周囲浸潤に関わる機序を解明することは最も重要な課題の一つであり、治療ターゲットの候補ともなりうる。



膵癌の組織学的所見のもう一つの大きな特徴は、豊富な間質 (stroma) を伴うことである。この間質には癌細胞の増殖進展に関わる cancer associated fibroblast なども含まれ、癌細胞周囲の間質は腫瘍の浸潤などに貢献するとする報告が近年見られる。また、密に増殖した間質は癌細胞を化学療法などの薬剤から保護する障壁の役割を果たすと考えられてきた。これを裏付ける研究としてビタミン D の投与による間質の再構築が腫瘍微小環境の正常化をもたらし、腫瘍内の化学療法薬剤の濃度を上昇させるという報告が見られる。しかし、近年の新たな研究において、むしろ反応性の間質増生が起こっている膵癌の方が予後が良いという報告も多々見られるなど、間質と膵癌の関りは極めて複雑であり、未知の部分が多い (Rhim AD, *Cancer Cell*, 2014)。いずれにしても豊富な間質が膵癌と他の消化器癌の組織学的所見の大きな差異の一つであることから、間質の存在を抜きにして膵癌の進展における分子生物学的メカニズムを解明することは不可能であると考えられる。我々はこれまでも消化器癌の間質リモデリングに関与し、癌細胞の転移・分化に影響を及ぼすとされる LOXL2 が膵癌の予後とも関連することを明らかにしている (Tanaka N, *Scientific Reports*, 2018)。

悪性度の強い膵癌ではあるが、遺伝子異常の観点からみると驚くべきことに発癌に関わる代表的な遺伝子変異は KRAS, CDKN2A, TP53, SMAD など他の癌種と大差ない。近年、膵癌に対する多検体の genome-wide な transcriptome 解析の報告がされているが、オーストラリアを中心とする国際チームの研究により、膵癌では神経軸索伸長に関わる分子群 (axon guidance gene : AGG) に変異が多い事が分かった (Biankin AV, *Nature*, 2012)。生体の神経回路を構成する個々の神経細胞は軸索を介して電気信号を遠隔の標的細胞へ伝達する。この神経回路形成過程において軸索の先端部分は高い運動性をもったアメーバのような形状の「成長円錐」となっている。成長円錐が正しい目的地にたどり着くためには標識として多数存在する「axon guidance factor」が必要である (Figure 2)。膵癌の神経周囲浸潤が高いことと合わせて、これらの遺伝子変異・発現量変化は未来の創薬ターゲットや分子マーカーとして有用な可能性があるという発想から本研究の立案に至った。



2. 研究の目的

膵癌は他の消化器癌と比較して極めて予後不良な疾患であり、予後の改善のためには未だ不明な点の多い膵癌の組織学的、分子生物学的理解が重要である。これまでの膵癌をめぐる研究では、axon guidance gene に属する遺伝子群や個々の遺伝子に関して、膵癌の進展に関わる報告がいくつかなされているが、その詳細は未だ不明な部分が多い。また、基礎研究のみならず、実臨床から得られた組織、血液などのサンプルを用いたトランスレーショナル研究も十分なされているとは言い難い。膵癌の間質における研究も蓄積されつつあるが、この間質と癌との相互作用を検討する上で axon guidance gene に着目した研究は乏しい。当教室は以前より、消化器癌における EMT (上皮間葉転換) に関連した分子生物学的機構の研究や臨床検体における発現検討などに取り組んできており、研究成果を多数報告している (Yamada S, *Surgery*, 2013; Yamada S, *Ann Surg Oncol*, 2014; Yamada S, *Pancreas*, 2014; Niwa Y, *J Surg Oncol*, 2014; Mashita N, *J Surg Oncol*, 2014; Asano T, *Int J Oncol*, 2017; Ninomiya G, *Oncol Rep*, 2018)。さらに、当教室において膵癌における LOX ファミリーの発現状況と予後への関与、膵癌 EMT への関わりを検討して報告している (Tanaka N, *Scientific Reports*, 2018)。LOX ファミリーは各種消化器癌の間質において発現上昇が報告され、癌の間質におけるリモデリングに関与することで癌細胞の転移・分化に影響を与えている分子群である。他にも、これまでの EMT に関連した研究や他のグループから報告された研究から、EMT に関わるシグナル伝達系に癌細胞周囲の間質から分泌された分子が影響を及ぼすことなどが明らかになってきており、膵癌における間質の存在を抜きにして詳細な分子腫瘍学的検討を行うことは不十分であるとの考えに至った。

以上の観点から、臨床検体における axon guidance gene の発現を解析するとともに膵癌の進展に重要な役割を果たす間質との相互作用を調査することで、これまでとは異なる視点で膵癌の進展に関わる遺伝子群を明らかにし、間質とのクロストークを理解することで不均一性の高い膵癌に対する有効な治療やバイオマーカーを発見する足掛かりにすることを目的として本研究を立案した。

3. 研究の方法

本研究ではまず、手術検体から採取された膵癌組織を用いて AGG の PCR アレイを行い、正常膵組織における発現との比較から AGG の中でも特に膵癌進展に関わる gene を抽出した。これについて切除膵検体 (n=51) における発現を調査し、臨床病理学的特徴との関連を調査した。さらに膵癌細胞株を用い、当該遺伝子の発現調整で生じる増殖・浸潤能などの変化を調べた。さらに、transfection 細胞株を用いて AGG の発現に相関する EMT 関連遺伝子群を網羅的に解析により抽出し、AGG が膵癌進展に関与するメカニズムの理解を試みた。

(1) 膵癌に関連する axon guidance gene の解析

パブリックデータベースを用いて、膵癌の癌部、非癌部における AGG 関連遺伝子の発現変化の傾向を調べた。その結果、相関が見られる遺伝子について、膵癌切除検体 51 例の免疫組織学的染色を行い、タンパクレベルの発現強度を調べた。その強弱と臨床病理学的情報や予後データとの相関を調べた。

(2) 膵癌細胞株を用いた強制発現系・発現消失系の作成

(1) で同定された膵癌の悪性度・予後と関連があるとされる AGG につき、プラスミドベクターを用いた強制発現系および siRNA による強制発現抑制系を膵癌細胞株で作成した。細胞株で遺伝子発現の変化や増殖能・浸潤能の変化および、抗アポトーシス能の変化を検討した。

(3) 膵癌細胞株における axon guidance gene がもつ作用機序の解明 ①

(2) で作成した強制発現系と強制発現抑制系の細胞株から抽出した核酸から cDNA を作成し、EMT 関連遺伝子を網羅的に解析するキットに適用して相関の見られる遺伝子群を抽出した。

(4) 膵癌細胞株における axon guidance gene がもつ作用機序の解明 ②

(3) で抽出した候補遺伝子群が extracellular matrix 関連遺伝子であったため、gelatin zymography を用いてタンパクレベルで AGG 遺伝子の発現変化による活性化が観察されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 膵癌に関連する axon guidance gene の解析

軸索誘導 (axon guidance) は発生の段階で神経回路形成が適切に行われるための重要なプロセスである。軸索誘導に関わる遺伝子群は各種癌の発生・進展にも関わるとされ、さらに膵癌は神経周囲浸潤が特徴的であるため、軸索誘導関連遺伝子として代表的な遺伝子ファミリーについて公共データベース The Cancer Genome Atlas の遺伝子情報を用いて解析を行った。軸索誘導に関連する Slit/Robo signaling pathway に関連する ROBO は膜貫通型受容体の一つであり、

SLITはこのシグナル伝達機構におけるリガンドである。このROBOファミリーおよびSLITファミリーは軸索誘導に関連するだけでなく、細胞接着・細胞極性・細胞骨格等の現象にも関連するとされており、膵癌における発癌・進展に重要な役割を果たす可能性がある。SLIT/ROBOファミリーにはROBO1~4、SLIT1~3の分子が存在する。これらについてThe Cancer Genome AtlasのRNA-seqデータにおける膵癌腫瘍部・非腫瘍部の発現を解析するとROBO4の発現が腫瘍部で有意に低い結果であった。さらに腫瘍部でのROBO4低発現は予後不良な経過と関連していたため、膵におけるROBO4低下が発癌及び腫瘍学的悪性度の進展に重要であると確認した。術前治療(化学療法及び化学放射線療法)を施行していない切除膵癌症例51例について免疫組織学的染色を行い、再発・予後等を含めた臨床病理学的情報の結果を収集し、関連を解析した。

(2) 膵癌細胞株を用いた強制発現系・発現消失系の作成

膵癌細胞株を用いてROBO4の強制発現系および発現消失系を作成し、細胞増殖能・浸潤能の変化を解析した。さらに上皮間葉転換に関わる遺伝子群の発現変化を解析し、ROBO4が膵癌の進展に関わるプロセスを検討した。

(3) 膵癌細胞株におけるaxon guidance geneがもつ作用機序の解明 ①

膵癌細胞株を用いてROBO4の発現抑制株、および強制発現株を作成し、ROBO4発現低下により、膵癌細胞の遊走能、浸潤能、増殖能が亢進することが観察された。同じ細胞株セットを用いて、癌細胞内でのROBO4の発現変化が、特にEMT関連遺伝子の発現変化にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

具体的には、ROBO4発現抑制1株、強制発現2株についてEMT関連89遺伝子の発現定量キットにのせ、前者と後者で発現上昇/低下、あるいは低下/上昇と発現変化が相反する遺伝子群を抽出した。その結果、extra-cellular matrixに関連する候補遺伝子が複数個挙がってきたため、これらのうち、癌の転移能に関与するとの報告がある遺伝子がコードするタンパクXについて、ROBO4との相関をタンパクレベルで解析することとした。

(4) 膵癌細胞株におけるaxon guidance geneがもつ作用機序の解明 ②

Gelatin zymographyの実験系を用いて、先に使用したROBO4発現抑制2株、強制発現2株について、ROBO4の発現変化がタンパクXの発現変化を引き起こしていることが確認できた。

以上より、axon guidance geneのひとつであるROBO4の発現低下が、タンパクXの発現上昇を介して膵癌進展に寄与する可能性が考えられることについて、本研究を通して見出した。この点について2021年に学会発表を行い、その後論文作成を済ませ、現在投稿中である。

本研究の位置づけ

神経浸潤のある膵癌が予後不良であるという後ろ向きの研究成果のメカニズムとして、膵癌進展において正常な神経ネットワーク構築の破綻が、EMTの亢進を促し、膵癌の悪性度を助長するという流れを示すことができた。今後は、EMT進展に関与するタンパクXの発現調整機構としてROBO4を分子標的ターゲットと考えられないかという観点から、実験をすすめる必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masaya Yamanaka, Fuminori Sonohara, Masamichi Hayashi, Yunosuke Suzuki, Nobuhiko Nakagawa, Keisuke Kurimoto, Yoshiyasu Katou, Yuki Sunagawa, Nobutake Tanaka, Yoshikuni Inokawa, Hideki Takami, Yasuhiro Kodera
2. 発表標題 ROB04 expression suppresses the progression of pancreatic cancer
3. 学会等名 第33回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------