

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26293171

研究課題名（和文）膵発癌過程におけるselection pressureの網羅的解析と治療応用

研究課題名（英文）Analysis of selection pressure in pancreatic carcinogenesis

研究代表者

下瀬川 徹（Shimosegawa, Tooru）

東北大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：90226275

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膵癌進行過程における癌細胞・間質細胞に対するselection pressureが腫瘍内のコンポーネントへ与える影響を解析し、浸潤性増殖や治療抵抗性等の形質を獲得させないための新たな治療法開発に向けた基礎検討を行うことを目的とした。膵発癌モデルマウス、KPCマウスにおいて酸化ストレス応答機構を欠損させた場合の影響を検討し、発癌・進展過程の抑制と抗癌剤感受性の回復がみられることを確認。酸化ストレス応答機構の中核を担うKeap1-Nrf2経路が膵癌進展に寄与することを明らかにした。また、膵癌宿主側の要因として腸内細菌叢変化に着目し、他の膵疾患と膵癌症例での細菌叢の差異を見出した。

研究成果の概要（英文）：This research project aimed to clarify the effect of selection pressure during pancreatic cancer progression, which involves cancer cell and stromal cells. The research goal is to develop novel therapy conquering therapy resistance. We used KPC mouse, a genetically-engineered mouse model of pancreatic cancer. Deletion of Nrf2, a master regulator of oxidative stress response in KPC mouse resulted in attenuated pancreatic carcinogenesis and re-sensitization to chemotherapeutic agent. In addition, we performed microbiome analysis of stool samples from patients with pancreatic cancer, which also affects cancer progression. This analysis identified certain difference in microbiome profile in pancreatic cancer patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

膵癌は画像診断の進歩や治療技術の向上にもかかわらず、いまだに根治が困難な消化器癌である。適切なスクリーニング法の欠如、通常の抗癌剤や放射線療法への抵抗性、手術後の再発率の高さといった課題は完全には解決されていない。膵癌においては desmoplasia と呼ばれる厚い線維性結合織が癌細胞を取り囲む組織像が特徴的であり、抗癌剤の拡散や免疫細胞による癌細胞の排除を妨げる物理的な障壁として機能する。Desmoplasia は膵癌細胞と間質細胞の相互作用により形成され、その過程には癌細胞・間質細胞の活性化と骨髄由来細胞を含む免疫細胞が関与している。これらの細胞間相互作用は単に線維化形成を増加させるだけでなく、癌細胞の浸潤性増殖を促進し、癌幹細胞機能の維持にも貢献している (Erkan M et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012)。これまで膵癌の desmoplasia 形成を促進することが明らかにされた Sonic hedgehog 経路や connective tissue growth factor の抑制は実験的膵癌モデルにおける腫瘍増殖を抑制することが示唆されている (Olive KP et al. Science 2009, Ijichi H et al. J Clin Invest 2011)。

膵線維化に中心的な役割を果たす膵星細胞が膵癌の浸潤性増殖や転移巣形成、治療抵抗性の獲得に寄与することがこれまでの検討で明らかにされてきたが、免疫不全マウスを用いた皮下腫瘍移植モデルや膵同所移植モデルでは癌細胞と宿主細胞の相互作用や免疫機構への影響についての総合的な評価は困難である。Hingorani SR らにより樹立された KPC マウスは膵特異的に恒常的活性化型変異 K-ras (G12D) と機能喪失型 p53 (R172H) を発現し、ヒト膵癌と同様に膵前癌病変である PanIN 形成から浸潤癌を発症するモデルである (Hingorani SR et al. Cancer Cell 2005)。KPC マウスで形成される膵癌はヒト膵癌と同様に desmoplasia を有している。また、KPC マウス膵癌はゲムシタピン投与に抵抗性を示すことも報告されており、治療抵抗性を再現するモデルであることが推察される。ゆえに、本モデルは癌・間質相互作用や抗癌剤耐性の経時的な解析に有用であると考えられる。

ヒトにおいて臨床的に明らかな膵癌が確立されるまでには 10 年以上にもわたる遺伝子変異の蓄積が必要であるとされている (Yachida S et al. Nature 2010)。すなわち、膵癌にみられる間質組織は同様の期間を経て形成された癌細胞・宿主間の反応の結果であり、癌細胞および間質細胞はある selection pressure にさらされた結果、特徴的な組織像を呈していると考えられる。癌細胞では K-ras や p53 といった key mutation に加えて多数の遺伝子変異が蓄積されていくことが明らかにされているが、間質細胞に

対する selection pressure は遺伝子変異を蓄積させるのか、分化傾向や細胞種を規定することで膵癌の間質としての形質を完成させるのかについてはいまだに明らかとはなっていない。また、抗癌剤に対する抵抗性が治療中に顕在化してくる現象も selection pressure の結果であると考えられるが、癌細胞の質的变化についての報告はみられるものの間質細胞での変化については不明なままである。以上のような selection pressure による膵癌組織内での影響を網羅的に解析することは転移形成や抗癌剤耐性などの好ましくない形質の獲得に関わる因子を特定し、治療標的として利用する手がかりとなることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌進行過程における癌細胞・間質細胞に対する selection pressure が腫瘍内のコンポーネントへ与える影響を解析し、浸潤性増殖や治療抵抗性などの形質を獲得させないための新たな治療法開発に向けた基礎検討を行うことである。

3. 研究の方法

本研究では、モデルマウスを用いた膵発癌過程の経時的検討と薬剤耐性獲得に関わるシグナル伝達機構の関与、ヒト膵癌における宿主側の因子について解析するために以下の検討を行った。

(1)膵発癌モデルマウス、KPC マウスの作成と発癌過程の解析

膵特異的に変異 K-ras および p53 を発現する KPC マウスは、NCI mouse repository より入手した LSL-Kras G12D、p53 LSL R172H、Pdx-1-Cre マウスの交配により作成した。マウスを生後 90 日で犠牲死させ、膵前癌病変の有無・浸潤癌形成の有無につき組織学的検討を行った。

(2)酸化ストレス応答機構欠損マウスの作成

酸化ストレス応答機構欠損状態を KPC マウスに付与するため、LSL-Kras G12D、p53 LSL R172H、Pdx-1-Cre マウスを Nrf2-/- マウスと交配して Nrf2-null バックグラウンドを導入した。KPC::Nrf2-null マウス (以下 KPCN マウス) を生後 90 日で犠牲死させ、膵前癌病変の有無・浸潤癌形成の有無につき KPC マウスと比較検討した。

(3)マウス由来膵癌細胞株の機能解析

KPC マウス・KPCN マウス膵癌組織を摘出して細胞株を樹立し、細胞増殖・発現遺伝子プロファイルの網羅的解析を実施した。酸化ストレス誘導剤・ゲムシタピンに対する感受性評価を行い、活性酸素種 (ROS) 消去能についても比較した。

(4)ヒト膵疾患患者における腸内細菌叢解析

膵癌および各種膵疾患 (自己免疫性膵炎・慢性膵炎) 患者において腸内細菌叢のプロファイルに差がみられるかを検討するため、次世代シーケンズによるメタゲノム解析を

実施した。対象患者より採取した便検体より DNA 抽出を行い、細菌由来 16S ribosomal RNA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR にて得的な増幅がみられた検体を細菌叢解析に供した。類似性の高い(相同性 97%以上の)配列データを1つのグループのクラスタとしてまとめ、最も出現頻度の高い配列を代表 OTU (OTU; Operation Taxonomic Unit; 操作的分類単位)配列とし、その代表配列を用いてデータベースに対する相同性検索を行い、系統分類を推定した。

4. 研究成果

(1)KPC マウスの作成と解析

既報に従い Pdx-1-Cre マウスと LSL-Kras G12D::p53 LSL R172H マウスを交配して KPC マウスを作成した(図1)。

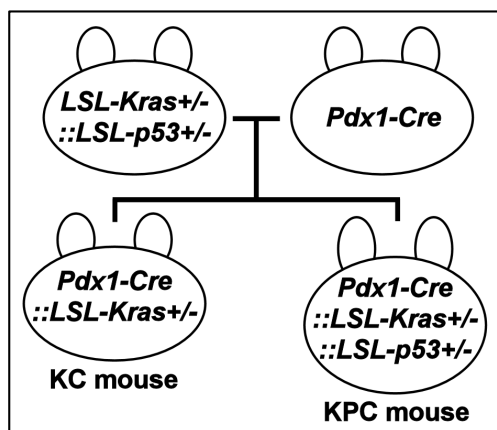


図1

膵特異的に変異 Kras と p53 を発現する KPC マウスでは、生後 90 日の時点において変異 Kras のみを発現する KC マウスと比較して前癌病変である PanIN の形成が有意に多く、また肝転移やリンパ節転移を伴う進行膵癌を発症する個体も散見された。膵癌組織の一部を摘出し、後述する細胞株の樹立に供した。

(2)KPCN マウスの作成と解析

LSL-Kras G12D, p53 LSL R172H, Pdx-1-Cre マウスを Nrf2-/- マウスと交配して Nrf2-null バックグラウンドを導入し、KPCN マウスを作成した(図2)。

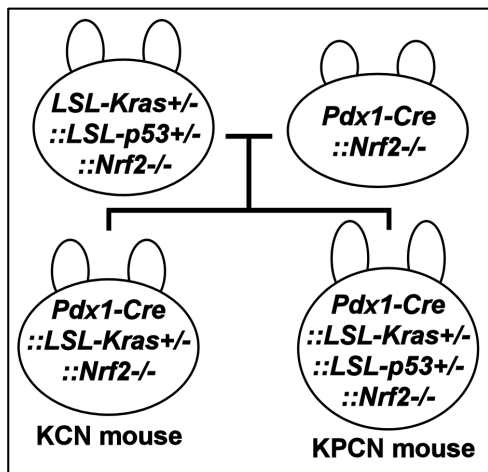


図2

KPCN マウス、KC マウスではそれぞれ KPC マウス、KC マウスと比較して PanIN 形成数が有意に少ないとの結果であった。KPCN マウスでは KPC マウスと比較して浸潤性膵癌がみられるマウスが少なく、肝転移やリンパ節転移もみられなかった。組織学的には KPC マウス・KPCN マウスのいずれでも腺癌に矛盾しない組織像を呈していたが、KPC マウス由来膵癌に比べ KPCN マウス由来膵癌では細胞内酸化ストレスの増加を反映する 8-OHdG 染色にて陽性を示す細胞が多く、対照的に Ki-67 染色陽性細胞数は少ないとの結果であった。以上の結果から、Keap1-Nrf2 経路は KPC マウスにおける前癌病変の形成・浸潤癌への進展過程の両者に寄与していることが示唆された。

(3)KPC マウス・KPCN マウス由来膵癌細胞株の機能解析

KPC マウス・KPCN マウスに生じた膵癌組織の一部を摘出し、コラゲナーゼ処理によって細胞を遊離させることで細胞株を樹立した。いずれの細胞も 10% FBS 添加 DMEM 培地で継代可能であり、上皮性の細胞間接着を有していた(図3)。

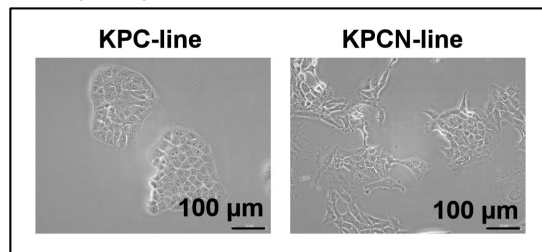


図3

これらの細胞では上皮性マーカーである E-cadherin、CK19 の発現も確認された。

これらの細胞株について in vitro での細胞増殖を比較したところ、通常培養条件では BrdU 取り込みアッセイで有意な差は認められなかった。通常培養条件では KPC 由来細胞株と KPCN マウス由来細胞株で細胞内 ROS の量に差は認めず、通常の培養条件では生体内と比較して酸化ストレスが少ないことが判明した。

しかしながら酸化ストレス誘導剤であるマレイン酸ジエチル、膵癌に対する標準的な抗癌剤のゲムシタピンによる処理を行った場合、KPC マウス由来細胞株に比べ KPCN 由来細胞株の生存率は著明に低下し、酸化ストレスや xenobiotics に対する脆弱性を示した。以上の結果より、Keap1-Nrf2 経路は抗癌剤を含む種々の外的ストレスに耐性を獲得するのに不可欠であることが示された。

(4)ヒト膵疾患患者における腸内細菌叢解析

膵癌進展に関わる宿主側の因子として腸内細菌叢の変化が関与する可能性を考え、膵癌のほか自己免疫性膵炎・慢性膵炎患者との間で細菌叢プロファイルの網羅的解析を実施した。便検体より抽出した DNA 検体を template として細菌由来 16s rRNA 遺伝子を

標的として実施したリアルタイム PCR の増幅曲線を図 4 に示す。

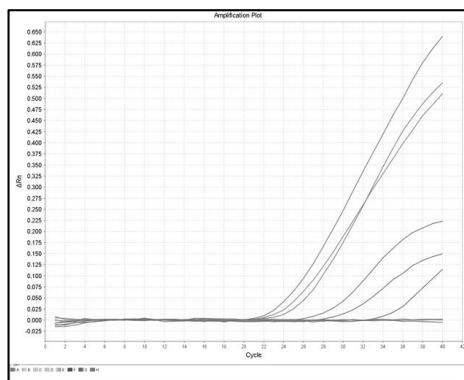


図 4

Taqman probe により検出される特異的な増幅がみられたサンプルでは、全例で次世代シーケンスによる十分なリード数が得られた(表 1)。

サンプル名	リード数
AIP1 pre-PSL	15674
AIP2 pre-PSL	35102
AIP3 pre-PSL	30379
AIP4 pre-PSL	29503
AIP5 pre-PSL	31051
AIP6 pre-PSL	17148
AIP7 pre-PSL	16570
AIP3 post-PSL	26217
AIP4 post-PSL	31879
AIP6 post-PSL	26769
Pca1	70115
Pca2	29330
Pca3	25023
Pca4	44684
Pca5	20159
CP1	29076
CP2	13949
CP3	13743

表 1

AIP10 例(ステロイド治療前 7 名・治療後 3 名)に加え、慢性膵炎(3 例)・膵癌(5 例)を解析対象として比較を行い、AIP を含めた各種膵疾患において、症例ごとの variation はみられるものの腸内細菌叢には一定の差がみられる可能性が示唆された(膵癌では AIP に比べ Parabacteroides 属が多く検出・慢性膵炎での Faecalibacterium 属、Fusobacterium 属の増加)。膵癌患者においてみられる腸内細菌叢の変化は宿主側の因子として癌進展や抗腫瘍免疫の抑制に寄与している可能性があり、さらに症例を追加して検討を進める必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Yoshida N, Masamune A, Hamada S, Kikuta K, Takikawa T, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T.

Kindlin-2 in pancreatic stellate cells promotes the progression of pancreatic cancer.

Cancer Lett. 2017;390:103-114.

doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.008

査読有

2. Takikawa T, Masamune A, Yoshida N, Hamada S, Kogure T, Shimosegawa T.

Exosomes derived from pancreatic stellate cells: microRNA signature and effects on pancreatic cancer cells.

Pancreas. 2017;46:19-27.

doi: 10.1097/MPA.0000000000000722

査読有

3. Hamada S, Masamune A, Yoshida N, Takikawa T, Shimosegawa T.

IL-6/STAT3 plays a regulatory role in the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells.

Dig Dis Sci. 2016;61:1561-1571.

doi: 10.1007/s10620-015-4001-5

査読有

[学会発表](計 2 件)

1. Hamada S, Masamune A, Taguchi K, Yamamoto M, Shimosegawa T.

Nrf2 knockout suppresses pancreatic carcinogenesis in a mouse model.

Digestive Disease Week 2016 年 5 月 21-24 日 San Diego, USA

2. Hamada S, Masamune A, Taguchi K, Yamamoto M, Shimosegawa T.

Impact of Nrf2 on pancreatic carcinogenesis in mice.

The joint meeting of 47th JPS/ 20th IAP/ 6th AOPA 2016 年 8 月 4-7 日 仙台 仙台国際センター

6. 研究組織

(1)研究代表者

下瀬川 徹 (Shimosegawa, Tooru)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90226275

(2)研究分担者

正宗 淳 (Masamune, Atsushi)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90312579

濱田 晋 (Hamada, Shin)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20451560