

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893109

研究課題名(和文)膵癌に対する腫瘍抑制因子としてのTFF2の検討

研究課題名(英文)The role of TFF2 as tumor suppressor for pancreatic cancer

研究代表者

山口 淳平(Yamaguchi, Junpei)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00566987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Trefoil Family Factor 2 (TFF2)は新たな胃癌抑制因子として近年注目を集めている低分子タンパクである。我々はKRAS遺伝子変異とTFF2欠損を併せ持った遺伝子改変マウスにおいて膵癌が発生することを発見し、またTFF2は癌抑制遺伝子SMAD4を活性化することが確認され、TFF2は膵臓においても癌の発生を抑制していることが判明した。しかしTFF2タンパクを癌細胞に直接投与しても癌抑制効果はなく、癌を抑制するには癌細胞にTFF2を産生させる必要があり、そのためには糖尿病治療薬ピオグリタゾンが有用であることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Trefoil Family Factor 2 (TFF2) is a low-molecular weight protein which recently has been reported to have novel tumor suppressive function in gastric carcinogenesis. We found that pancreatic cancer develops in TFF2-deficient mouse with the activation of KRAS mutation, and that TFF2 can activate cancer suppressor gene SMAD4, indicating that TFF2 can act as tumor suppressor in pancreatic carcinogenesis. However, TFF2 protein cannot show tumor-suppressive effect when administered to cancer cells. We found that TFF2 must be expressed by cancer cells to suppress cancer proliferation, and that pioglitazone, a prescription drug to treat diabetes, is useful for this purpose.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 TFF2 癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治性の悪性疾患であり、手術を含めた各種抗癌治療をもってしても依然予後不良である。膵癌患者の予後を改善するためには新たな治療戦略の開発が望まれる。

細胞の増殖には各種の増殖促進・抑制因子が関与しており、正常組織においては幹細胞ニッチ (stem cell niche)においてこの複雑な制御が行われているが、このバランスが崩れた際に stem cell から癌が発生すると考えられている。膵癌の発生母地は膵管上皮細胞であると考えられているが、膵管上皮細胞の stem cell niche は PDG (pancreatic duct gland) であると指摘されている¹⁾。この PDG に特異的に発現している遺伝子のうちの一つが Trefoil Family Factor 2 (TFF2) である。

TFF2 は古くから知られる分泌型低分子量タンパクである。主に胃粘膜における発現が豊富であり、その役割は障害を受けた粘膜上皮の再生であるとされてきた²⁾。しかし近年では胃癌の発生を抑制している癌抑制遺伝子であるとの報告がある³⁾。これらの状況証拠を踏まえれば、TFF2 は膵癌においても癌抑制遺伝子として働いており、PDG において膵癌の発生を防ぐ役割があるものと推察される。

2. 研究の目的

本研究の目的は TFF2 が膵癌を抑制する癌抑制遺伝子であるかどうかを突き止めることと、そうであった場合 TFF2 が腫瘍を抑制するメカニズムの解明、および TFF2 をターゲットとした新たな膵癌治療戦略の開発につながる成果を得る事である。

3. 研究の方法

(1) マウスモデルを用いた検討

TFF2 が膵癌の発生防止に寄与するかどうかを検討するため、TFF2 ノックアウトマウスを用いる。また広く用いられる膵腫瘍発生

マウスモデルとして、Pdx1-Cre: LSL-KRAS^{G12D} マウスを用いる。このマウスは膵に前癌病変である PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasm) が発生するが、膵癌の発生は稀である。この2種類のマウスを交配して Pdx1-Cre: LSL-KRAS^{G12D}: TFF2-KO を作成し、膵癌の発生を認めるかどうかを検討する。

(2) TFF2 の作用機序の検討

TFF2 の腫瘍抑制効果のメカニズムは未だ解明されていない。既存の腫瘍抑制因子、膵癌においては p53, SMAD4, p16 などが主要な癌抑制遺伝子であるが、これらの活性と TFF2 との関係を検討して作用機序の解明を目指す。具体的には膵癌培養細胞株に対して TFF2 強制発現ベクターを導入し、その影響を検討する。

(3) 抗癌治療への応用

TFF2 が腫瘍抑制効果を示すならば、膵癌の治療に応用できる可能性があるためこれを模索する。具体的には膵癌培養細胞株に対して TFF2 タンパクを投与し、その効果を検討する。

4. 研究成果

(1) マウスモデルにおける検討

① TFF2 欠損マウスにおける PDG 増殖

TFF2 ノックアウトマウス (TFF2KO) の膵を詳細に検討したが、明らかな腫瘍性病変は認められなかった。一方、Pdx1-Cre: LSL-KRAS^{G12D} マウス (KC) の膵臓には PanIN の発生を認めたが、月齢6か月までに膵癌の発生は認められなかった。そこでこのマウスを交配して KC: TFF2KO を作成したところ、TFF2 が発現する stem cell niche である PDG の著名な増殖が認められた (図1)。

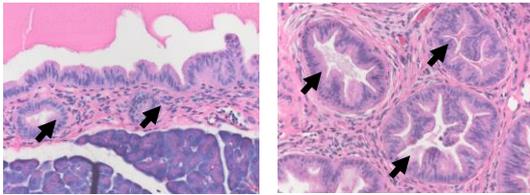


図 1: KC(左)に対して KC: TFF2KO (右) では PDG (矢印) の過形成と増殖を認める。

② TFF2 欠損マウスにおける IPMN の発生

KC: TFF2KO マウスの主膵管を詳細に検討したところ、主膵管内に乳頭状に増殖する腫瘍性病変を認めた (図 2)。これはヒトにおける IPMN に酷似した像であり、基底部に PDG の増生を伴っていることより、PDG における TFF2 欠損により PDG からの腫瘍細胞の発生をきたしたものと考えられた。

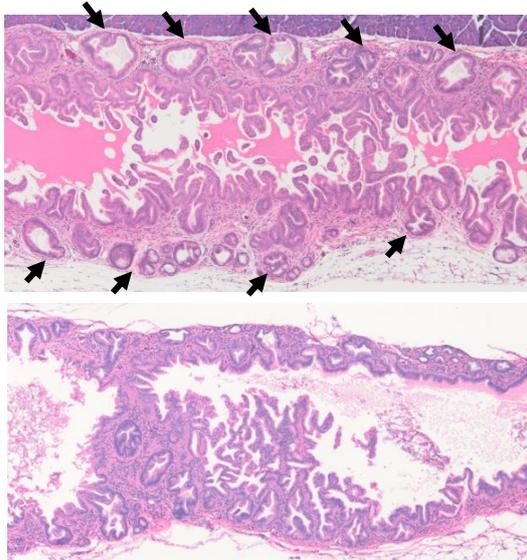


図 2: (上)月齢 2 か月、(下)月齢 4 か月の KC: TFF2KO マウスに認められた IPMN。PDG の増生を伴う (矢印)。

③ TFF2 欠損マウスにおける IPMN の発生

月齢 6 か月の **KC: TFF2KO** マウスの一部において、膵頭部腫瘍の発生と多発肝・肺転移を認めた。組織学的には腺癌であり、ヒトにおける浸潤性膵管癌の像であった (図 3)。

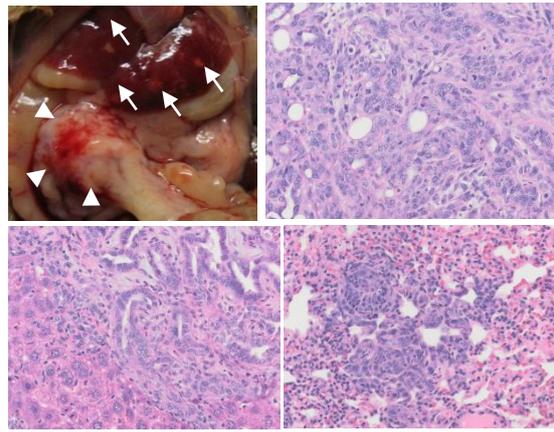


図 3: 【左上】膵頭部腫瘍 (矢頭) と肝転移 (矢印)。【右上】主腫瘍【左下】肝転移【右下】肺転移、各組織像 (HE 染色)。

これらマウスモデルの結果より、TFF2 は PDG において腫瘍細胞の発生を抑制する役割を果たしており、TFF2 の欠損は膵癌発生につながることを示された。

(2) TFF2 の作用機序

① 膵癌細胞増殖抑制

膵癌培養細胞である *panc1* に TFF2 overexpression vector を transfection して TFF2 を過剰発現させたところ、BrdU の取り込みが著明に減少した (図 4)。これは TFF2 が膵癌細胞の増殖能を抑制したことを示している。

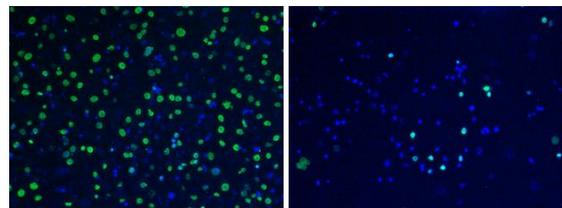


図 4: 対象 (左) に対して TFF2 発現細胞 (右) では BrdU 取り込み細胞 (緑) が著明に減少している。

② SMAD4 発現誘導と活性化

TFF2 発現 *panc1* 細胞からタンパクを採取し、western blotting にて各種癌抑制因子の発現を検討したところ、SMAD4 の発現上昇が認め

られた (図 5)。また SMAD4 の局在は細胞質から核内へ移行していることが確認された (図 6)。これは TFF2 が SMAD4 の発現を誘導しているのみならず、SMAD4 の活性化にも寄与していることを示している。Panc1 以外の膵癌細胞である MiaPaca2, colo357 細胞においても同様の傾向が認められ、TFF2 は膵癌普遍的に SMAD4 を介して抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

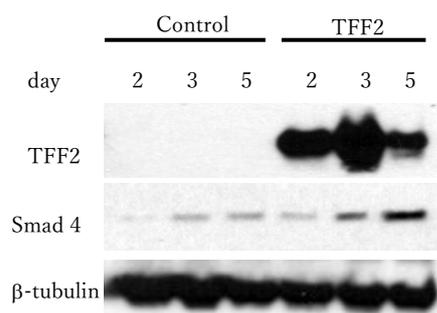


図 5: TFF2 発現 panc1 細胞における SMAD4 の発現上昇が認められた。

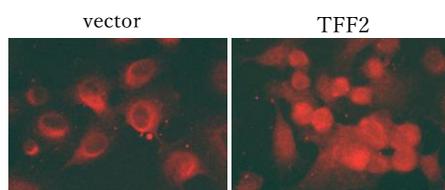


図 6: TFF2 発現細胞においては SMAD4 の核内への移行が確認された。

(3) 抗癌治療への応用

① TFF2 タンパク投与

以上の研究結果より、TFF2 は膵癌の発生を抑制する癌抑制因子であること、またその作用は SMAD4 を介するものであることが示唆された。次に、TFF2 を利用した膵癌治療への応用を目指すため、タンパク質としての TFF2 を膵癌細胞 panc1 に投与してその作用を観察した (表 1) と、予想に反して TFF2 投与群で癌細胞増殖能の亢進を認めた。

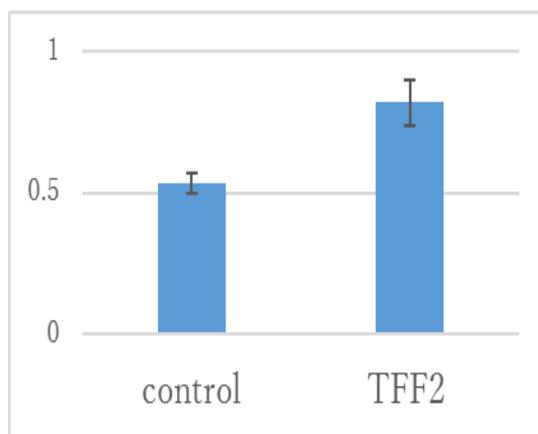


表 1: TFF2 投与群で細胞数が増加しており、細胞増殖能の亢進が認められた。

これらの結果から、TFF2 は分泌型タンパクではあるが、細胞外から作用した場合と細胞内で作用する場合では効果が異なることが示唆された。すなわち TFF2 は、paracrine には癌細胞の増殖亢進を促し、また autocrine には癌細胞の増殖抑制に働くことが示唆される。このことは、TFF2 を抗癌治療に用いるためには細胞外から TFF2 を投与するのではなく、細胞内での TFF2 の発現を誘導する必要があることを示している。

② TFF2 発現誘導

TFF2 の発現を誘導する化合物として、アスピリンやインドメタシン、プロスタグランジンや核受容体の一種である PPAR γ リガンドが胃上皮細胞の TFF 発現を誘導するとする報告がある。癌細胞における TFF 発現誘導の報告はないため、膵癌細胞におけるこれらの効果を検証したところ、PPAR γ リガンドであるピオグリタゾン (糖尿病薬として認可) 投与により膵癌細胞 (panc1) の TFF2 発現誘導を認め、また容量依存性に増殖抑制作用を示すことが判明した (表 2, 3)。

これらの結果より、TFF2 発現誘導による膵癌治療開発の可能性が示唆された。今後はさらなる TFF2 発現誘導物質の検索と、既存の抗癌剤との相互作用などの検証が必要である。

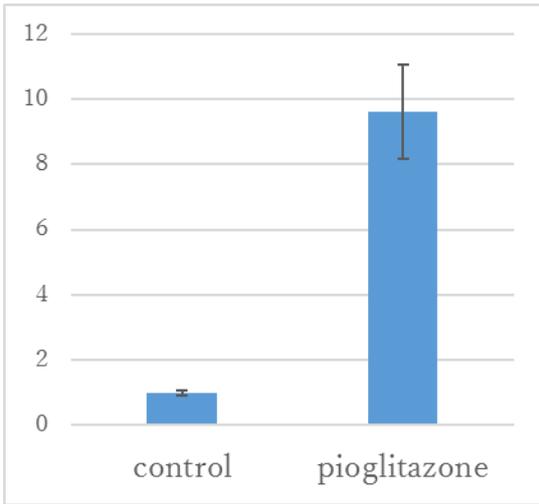


表 2: ピオグリタゾン (30 μ M) 投与により TFF2 発現が誘導された (panc1)。

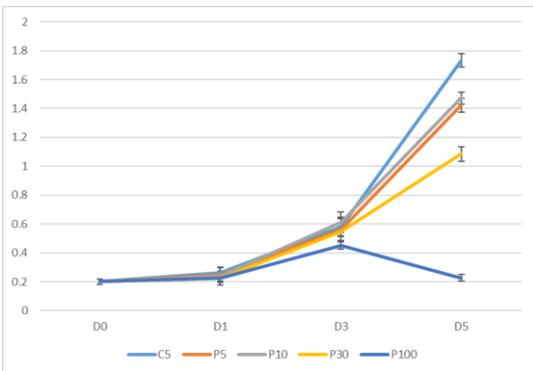


表 3: ピオグリタゾン容量依存性に膵癌細胞増殖抑制効果が示された (panc1)。

<引用文献>

- 1) Strobel O et al. Pancreatic Duct Glands are Distinct Ductal Compartment That React to Chronic Injury and Mediate Shh-Induced Metaplasia. *Gastroenterology* 2010; 138:1168-1177
- 2) Taupin D et al. Trefoil Factors: initiators of mucosal healing. *Nature reviews Molecular Cell Biology* 2003; 4: 721-734
- 3) Peterson AJ et al. Helicobacter pylori infection promotes methylation and silencing of Trefoil Factor 2, leading to gastric tumor development in mice and humans. *Gastroenterology* 2010;

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 山口 淳平、S.P. Thayer, A.L. Warshaw、江畑智希、横山幸弘、國料俊男、椰野正人 Trefoil Family Factor 2 (TFF2)抑制による膵 IPMN 発生マウスモデルの検討 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015 年 4 月 17 日、愛知県名古屋市 名古屋国際会議場

② 山口 淳平、S.P. Thayer, A.L. Warshaw、江畑智希、横山幸弘、國料俊男、伊神剛、菅原元、水野隆司、椰野正人 膵癌に対する Trefoil Factor Family 2 (TFF2)の抗腫瘍効果の検討 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015 年 7 月 16 日、静岡県浜松市 アクトシティ浜松

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 淳平 (YAMAGUCHI, Junpei)
 名古屋大学医学部附属病院 助教
 研究者番号: 00566987