

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04804

研究課題名(和文)膵疾患における酸化ストレスのダイナミズム解明と治療応用

研究課題名(英文) Role of oxidative stress response in pancreatic diseases and therapeutic application

研究代表者

正宗 淳 (Masamune, Atsushi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90312579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵発癌において持続的なNrf2活性化が癌進展を促進しうるかを検討した。膵特異的に変異Kras・p53を発現するKPC::Keap1 CKOマウス、膵特異的に変異Krasのみを発現するKC::Keap1 CKOマウスは進行性の膵実質脱落を来して早期に死亡することが明らかとなった。これらのマウスへNrf2+/-またはNrf2-/-バックグラウンドを導入することで膵萎縮は抑制され、変異KrasとKeap1欠損による組織変化がNrf2に依存することを確認した。KPC::Keap1 CKO::Nrf2+/-マウス膵癌組織に由来する細胞株の解析ではサイトケラチン発現低下が確認された。

研究成果の概要(英文)：We assessed the effect of continuous Nrf2 activation due to the pancreas-specific deletion of Keap1 in a mouse model of pancreatic cancer. Pancreas-specific expression of mutant Kras and p53 or Kras alone with conditional knockout of Keap1 resulted in poor weight gain after birth, leading to early death due to loss of pancreatic parenchyma. Additional introduction of Nrf2+/- or Nrf2-/- background rescued this phenotype, suggesting dependence on Nrf2. We observed no cancer promoting effect in KPC::Keap1 CKO::Nrf2+/- mice. Pancreatic cancer cell lines derived from these mice showed increased expression of Nrf2 target genes as well as decreased expression of cytokeratin family genes, indicating possible reprogramming of cellular phenotype.

研究分野：膵臓病学

キーワード：酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

難治性疾患である膵炎、膵癌ともに、その成因やリスクファクターに酸化ストレスの関与が想定されている。すなわち、急性膵炎、慢性膵炎ともに最多の成因であるアルコールは、その酸化代謝に伴い酸化ストレスが生じ膵腺房細胞や導管細胞を傷害するとされる。また膵癌のリスクファクターである糖尿病や肥満、喫煙や慢性炎症は各種臓器での酸化ストレスを増大させ、長期的にジェネティック・エピジェネティックな変化を介して癌の発生に関わる可能性がある(膵癌診療ガイドライン 2013、糖尿病と癌に関する委員会報告)。しかし、これらの効果をヒトにおいて示すことは容易ではない。そのため、酸化ストレスの作用を解析しうるモデルを用い、様々な膵疾患において酸化ストレスが果たす役割を解明することが急務である。

生体内における酸化ストレスは組織・細胞の種類によって多様な効果をもたらす。正常組織において、酸化ストレスは組織傷害を促進し、臓器機能の低下を引き起こす。一方、慢性膵炎や膵癌の際にみられる膵線維化形成に中心的役割を果たす膵星細胞は、酸化ストレスにより活性化されサイトカインや細胞外基質を産生する(Masamune A, 2013)。酸化ストレスに応答するための防御機構は正常組織の機能温存に重要であるが、癌細胞においてはこの防御機構は逆に癌の細胞生存を促進し、腫瘍増殖に寄与していることが明らかとなっている(Jaramillo MC, 2013)。すなわち、各種膵疾患における酸化ストレスの役割は多面的であり、context-specificに作用している。

現在、コンディショナルノックアウト・遺伝子ノックインの手法を用いた遺伝子改変マウスの作製により、酸化ストレス応答を臓器・組織特異的に操作することが可能となっている。本学医化学研究室にて樹立された Nrf2 flox マウス・Keap1 flox マウスは、組織特異的プロモーター制御下に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスと交配することにより、標的組織・細胞中での酸化ストレス応答を抑制または増強することが可能である。膵組織特異的なノックアウトには Pdx1 プロモーターで制御される Cre が、骨髄由来細胞特異的なノックアウトには Lys プロモーターで制御される Cre が使用される。当教室で導入済みである膵自然発癌モデル、KPC マウス(活性化型変異 Kras および機能喪失型 p53 を膵特異的に発現; Hingorani SR, 2005) へ Nrf2 flox あるいは Keap1 flox バックグラウンドを導入することで、膵発癌過程における酸化ストレス応答を抑制あるいは増強した発癌モデルを作製しうる。また、セルレイン腹腔内投与などによる急性膵炎、慢性膵炎モデルも野生型マウス同様に作製可能である。

Keap1-Nrf2 経路を標的とする薬剤を膵疾患の治療薬として、あるいは膵発癌予防に利

用するためには、各種膵疾患における組織・細胞ごとの酸化ストレス応答をモニタリングして作用点を明らかにし、有効な治療標的を探索する必要があると考え、本研究を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、Keap1-Nrf2 経路の機能改変を行った膵疾患モデルマウスを作製し組織特異的な酸化ストレス応答の抑制・増強とモニタリングを行うことにより、有効な治療標的となる酸化ストレスの作用点を特定し、膵炎・膵癌に対する新規治療法の開発へ応用することである。

### 3. 研究の方法

膵発癌過程へ Keap1-Nrf2 系が寄与する過程を検討するため、KPC マウスへ Keap1 flox バックグラウンドを導入した。膵特異的に Cre を発現する Pdx-Cre マウスと交配を行うことにより、Keap1 が膵で発現しないマウスが作製できる。膵特異的な Keap1 ノックアウトでは酸化ストレス応答が増強された状態となる(Taguchi K, 2014)。通常の KPC マウスとこれらのマウスにおいて腫瘍増大速度・転移形成能・個体の生存期間を比較し、膵における Keap1-Nrf2 系の恒常的活性化が膵癌進展を促進するか否かを評価した。

(1) Keap1 欠損 KPC マウスにおける膵癌進展形式の解析

野生型バックグラウンドの KPC マウスおよび Keap1 flox バックグラウンドを導入した KPC::Keap1 CK0 マウスについて、経時的に体重の変化を記録し生後 90 日の時点で犠牲死させ、組織変化や前癌病変である PanIN の形成、浸潤癌形成の有無を評価した。

(2) Keap1 CK0 への Nrf2<sup>-/-</sup>バックグラウンド追加による表現型レスキューの確認

KC::Keap1 CK0 マウスでみられる進行性の膵実質脱落に Nrf2 が必須であるかを確認するため、KC::Keap1 CK0 マウスへさらに Nrf2<sup>-/-</sup>または<sup>+/-</sup>バックグラウンドを導入し、表現型がレスキューされるかを確認した。

(3) Keap1 欠損による Nrf2 過剰状態と膵癌進展との関連についての検討

KPC::Keap1 CK0::Nrf2<sup>+/-</sup> マウスと KPC::Keap1 CK0::Nrf2<sup>-/-</sup> マウスを生後 90 日の時点で犠牲死させ、PanIN 形成数および浸潤性膵癌の頻度を比較した。

(4) KPC::Keap1 CK0::Nrf2<sup>+/-</sup> マウスおよび KPC::Keap1 CK0::Nrf2<sup>-/-</sup> マウス膵癌由来細胞株の比較

それぞれ Nrf2 過剰状態と Nrf2 欠損状態にある上記細胞株について、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにて比較した。

### 4. 研究成果

(1) Keap1 欠損 KPC マウスにおける膵癌進展形式の解析

KPC::Keap1 CK0 マウスは生後 2 週間前後か

ら体重増加が不良となり、生後 45 - 60 日でその大部分が衰弱により死亡した。また、膵特異的に変異 Kras のみを発現する Keap1 CKO マウス (KC::Keap1 CKO マウス) でも同様の体重増加不良・早期死亡を来すことが確認され、この現象が膵特異的な変異 p53 発現の有無に影響されないことが判明した。これらのマウスは死亡直前の採血で著明な低血糖を示しており、膵は肉眼的に硬い白色の線維性結合組織に置換され、著しい萎縮を来していた (図 1)。

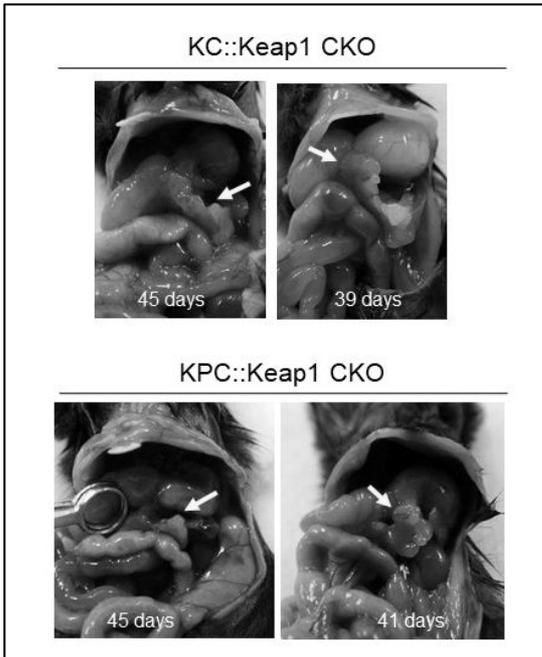


図 1

組織学的には膵腺房細胞・ラ氏島細胞の両者が変性脱落を来しており、わずかに残存した腺管構造と線維性結合組織の増生が確認された (図 2)。

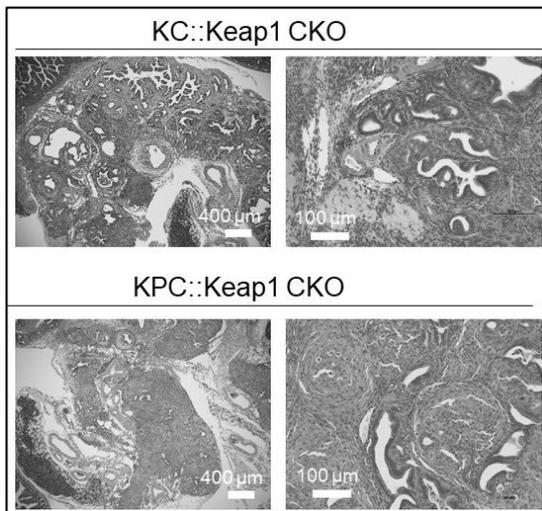


図 2

残存した腺管構造では Nrf2 標的遺伝子の Nqo1 が高発現しており、同経路の活性化を反映しているものと考えられた。

(2)Keap1 CKO への Nrf2<sup>-/-</sup>バックグラウンド

追加による表現型レスキューの確認

変異 Kras 発現と Keap1 CKO による膵萎縮が Nrf2 に依存しているかを確認するため、KC::Keap1 CKO::Nrf2<sup>+/-</sup>マウスと KC::Keap1 CKO::Nrf2<sup>-/-</sup>マウスを作成し (図 3)

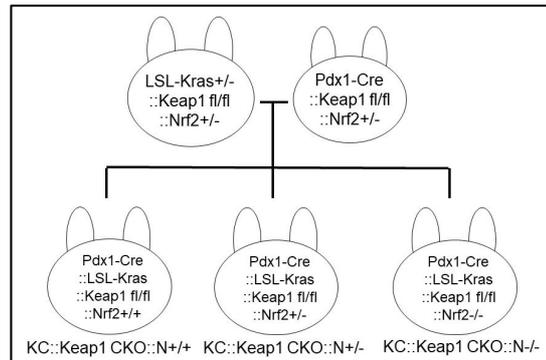


図 3

表現型を解析した。両マウスとも体重増加不良や早期での死亡は見られなくなり、生後 90 日の時点で膵実質は残存していることを確認した (図 4)。

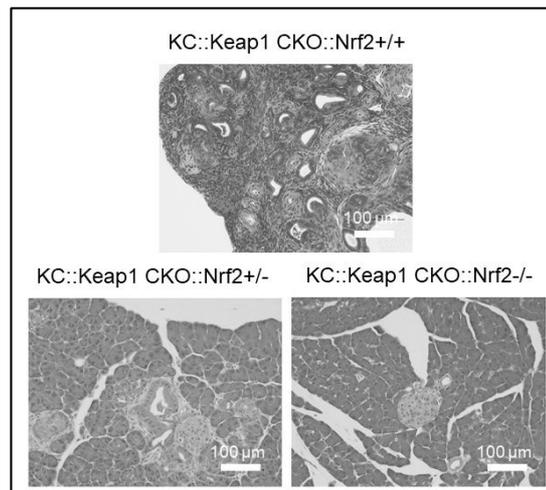


図 4

KC::Keap1 CKO::Nrf2<sup>-/-</sup>マウスでは KC::Keap1 CKO::Nrf2<sup>+/-</sup>マウスに比べ腺房細胞周囲への炎症細胞浸潤が軽減しており、膵萎縮の進行と Nrf2 の発現量が関連していることが示唆された。KC::Keap1 CKO::Nrf2<sup>-/-</sup>マウス膵では Nrf2 標的遺伝子の Nqo1 発現が消失しており、同経路の欠損を反映する結果であった。

(3)Keap1 欠損による Nrf2 過剰状態と膵癌進展との関連についての検討

KPC::Keap1 CKO::Nrf2<sup>+/-</sup>マウスと KPC::Keap1 CKO::Nrf2<sup>-/-</sup>マウスを生後 90 日で犠牲死させて膵組織を解析したが、前癌病変である PanIN 形成数に有意な差は認めず、また生後 90 日までに浸潤性膵癌を生じた個体は両群ともにみられなかった。以上の結果から、発癌初期段階からの Keap1 欠損による恒常的な Nrf2 活性化は変異 Kras・p53 による膵癌進展過程を促進する効果に乏しいものと考えられた。

(4)KPC::Keap1 CKO::Nrf2+/- マウスおよび KPC::Keap1 CKO::Nrf2-/- マウス膵癌由来細胞株の比較

KPC::Keap1 CKO::Nrf2+/- マウスと KPC::Keap1 CKO::Nrf2-/- マウスを生後 6 か月程度まで飼育したところ、それぞれ 2 頭のマウスで膵癌の形成を認めた。これらの膵癌組織をコラゲナーゼ処理して細胞株化し、発現遺伝子のプロファイルをマイクロアレイにて解析した。KPC::Keap1 CKO::Nrf2+/- マウス由来細胞株では KPC::Keap1 CKO::Nrf2-/- マウス由来細胞株に比べて Nqo1、Gstm をはじめとした典型的な Nrf2 標的遺伝子が高発現していた。これらの遺伝子群に加えて KPC::Keap1 CKO::Nrf2+/- マウス由来細胞株では多くのサイトケラチンファミリー遺伝子の発現が低下しており、上皮形質の維持に影響していると推測された。

以上の結果から、膵における変異 Kras の発現と酸化ストレス応答の持続的な亢進は細胞形質のリプログラミングにつながっていると考えられる。このような変化がもたらす細胞内シグナルや細胞機能への影響につき、今後更なる解析を要する。

#### 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 15 件)

1. Masamune A, Yoshida N, Hamada S, Takikawa T, Nabeshima T, Shimosegawa T. Exosomes derived from pancreatic cancer cells induce activation and profibrogenic activities in pancreatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495:71-77.

doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.141.

査読有

2. Hamada S, Shimosegawa T, Taguchi K, Nabeshima T, Yamamoto M, Masamune A. Simultaneous K-ras activation and Keap1 deletion cause atrophy of pancreatic parenchyma.

*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018;314:G65-G74.

doi: 10.1152/ajpgi.00228.2017.

査読有

3. Masamune A, Kikuta K, Hamada S, Nakano E, Kume K, Inui A, Shimizu T, Takeyama Y, Nio M, Shimosegawa T.

Nationwide survey of hereditary pancreatitis in Japan.

*J Gastroenterol*. 2018;53:152-160.

doi: 10.1007/s00535-017-1388-0.

査読有

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

Nrf2 promotes mutant K-ras/p53-driven pancreatic carcinogenesis.

*Carcinogenesis*. 2017;38:661-670.

doi: 10.1093/carcin/bgx043.

査読有

5. Masamune A, Kikuta K, Nabeshima T, Nakano E, Hirota M, Kanno A, Kume K, Hamada S, Ito T, Fujita M, Irisawa A, Nakashima M, Hanada K, Eguchi T, Kato R, Inatomi O, Shirane A, Takeyama Y, Tsuji I, Shimosegawa T; Research Committee of Intractable Pancreatic Diseases in Japan. Nationwide epidemiological survey of early chronic pancreatitis in Japan.

*J Gastroenterol*. 2017;52:992-1000.

doi: 10.1007/s00535-017-1311-8.

査読有

6. 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

7. 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

8. Masamune A, Nishimori I, Kikuta K, Tsuji I, Mizuno N, Iiyama T, Kanno A, Tachibana Y, Ito T, Kamisawa T, Uchida K, Hamano H, Yasuda H, Sakagami J, Mitoro A, Taguchi M, Kihara Y, Sugimoto H, Hirooka Y, Yamamoto S, Inui K, Inatomi O, Andoh A, Nakahara K, Miyakawa H, Hamada S, Kawa S, Okazaki K, Shimosegawa T; Research Committee of Intractable Pancreas Diseases in Japan. Randomised controlled trial of long-term maintenance corticosteroid therapy in patients with autoimmune pancreatitis.

*Gut*. 2017;66:487-494.

doi: 10.1136/gutjnl-2016-312049.

査読有

9. Masamune A, Nakano E, Niihori T, Hamada S, Nagasaki M, Aoki Y, Shimosegawa T.

Variants in the UBR1 gene are not

associated with chronic pancreatitis in Japan.

Pancreatology. 2016;16:814-818.

doi: 10.1016/j.pan.2016.06.662.

査読有

10. Hamada S, Masamune A, Kikuta K, Shimosegawa T.

Clinical impact of elevated serum triglycerides in acute pancreatitis: validation from the nationwide epidemiological survey in Japan.

Am J Gastroenterol. 2016;111:575-576.

doi: 10.1038/ajg.2015.421.

査読有

11. Zou WB, Boulling A, Masamune A, Issarapu P, Masson E, Wu H, Sun XT, Hu LH, Zhou DZ, He L, Fichou Y, Nakano E, Hamada S, Kakuta Y, Kume K, Isayama H, Paliwal S, Mani KR, Bhaskar S, Cooper DN, Férec C, Shimosegawa T, Chandak GR, Chen JM, Li ZS, Liao Z.

No association between CEL-HYB hybrid allele and chronic pancreatitis in Asian populations.

Gastroenterology. 2016;150:1558-1560.

doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.071.

査読有

12. 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

13. Nakano E, Geisz A, Masamune A, Niihori T, Hamada S, Kume K, Kakuta Y, Aoki Y, Matsubara Y, Ebert K, Ludwig M, Braun M, Groneberg DA, Shimosegawa T, Sahin-Tóth M, Witt H.

Variants in pancreatic carboxypeptidase genes CPA2 and CPB1 are not associated with chronic pancreatitis.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015;309:G688-694.

doi: 10.1152/ajpgi.00241.2015.

査読有

14. Masamune A, Nakano E, Hamada S, Kakuta Y, Kume K, Shimosegawa T.

Common variants at PRSS1-PRSS2 and CLDN2-MORC4 loci associate with chronic pancreatitis in Japan.

Gut. 2015;64:1345-1346.

doi: 10.1136/gutjnl-2015-309802.

査読有

15. Nakano E, Masamune A, Niihori T, Kume K, Hamada S, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T.

Targeted next-generation sequencing effectively analyzed the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in pancreatitis.

Dig Dis Sci. 2015;60:1297-1307.

doi: 10.1007/s10620-014-3476-9.

査読有

〔学会発表〕(計 9件)

1. Masamune A.

Using genetics to identify novel therapeutic targets in pancreatitis.

招待講演

2017 annual meeting of American Pancreatic Association. 2017

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

Pancreatic cancer cells induce profibrogenic activities in pancreatic stellate cells: Roles of microRNAs and exosomes. 口演発表

Digestive Disease Week 2017, 2017

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

Critical roles of pyruvate kinase muscle isozyme M2-dependent glycolysis in the interactions between pancreatic stellate cells and cancer cells. 口演発表

Digestive Disease Week 2017, 2017

4. Masamune A.

Corticosteroid maintenance therapy for AIP: The Japanese experience. 招待講演  
International Symptom on IgG4-RD and fibrosis. 2017

5. Masamune A.

Pancreatic stellate cells and cancer -Why targets stroma ?- 招待講演

The 10th International Symposium on Alcoholic liver and Pancreatic Diseases and Cirrhosis (ISALPD/C) 2016

6. Masamune A.

Pancreatic cancer and stellate cells -Role of exosomes in the interaction- 招待講演

Satellite Symposium on Alcoholism, ASH, NASH, and Pancreatitis 2016

7. Masamune A, Kume K, Shimosegawa T.

What is early chronic pancreatitis and why is diagnosis important? Alcohol as a risk

factor for early chronic pancreatitis. IAP  
International Consensus  
The joint meeting of 47th JPS/ 20th IAP/  
6th AOPA 2016

8. Masamune A, Nishimori I, Kikuta K,  
Okazaki K, Shimosegawa T, Research  
Committee of Intractable Pancreas  
Diseases in Japan.

Consensus for treatment of autoimmune  
pancreatitis Randomized controlled  
trial of maintenance corticosteroid  
therapy in patients with autoimmune  
pancreatitis. IAP International Consensus  
The joint meeting of 47th JPS/ 20th IAP/  
6th AOPA 2016

9. Masamune A.

Genetics of pancreatitis in Japan.

招待講演

PancreasFest 2016

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (2)研究分担者

田口 恵子 (Taguchi, Keiko)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20466527

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