

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：90101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14716

研究課題名(和文)膵腸相関から解き明かす膵癌の難治性機構とその克服

研究課題名(英文) Pancreatic-Intestinal Crosstalk: a novel approach to elucidate the tumorigenic process of PDAC

研究代表者

小野 裕介 (ONO, Yusuke)

医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・臨床生体情報解析部・部門長

研究者番号：40742648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵発がんとその進展過程において、腸管の恒常性維持機構との密接な繋がりが存在すると考えられる。この「膵腸クロストーク」の全貌解明を目的として、膵癌前駆病変を自然発症するモデルマウスを用いて、膵炎の負荷に伴う病変の進展という膵癌初期発生過程の擬時間を再現し、腸内環境の変化について解析を行った。

次世代シーケンサーにより糞便由来DNAの16SrRNA遺伝子解析を行った結果、膵組織の変化に伴って生じた特異的な腸内微生物叢プロファイルが見出された。また、モデルマウスにて腸管および小腸パネト細胞の形態と膵癌前駆病変の悪性化の関連性を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The tumorigenic process of pancreatic ductal carcinoma (PDA) may be closely associated with homeostasis of the intestinal tract, e.g., innate immune system. To elucidate the "Pancreatic-Intestinal Crosstalk" during the tumor initiation, we analyzed the alterations in an intestinal environment using a mouse strain which spontaneously develops acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs), offering a model of the early-stage of the pancreatic tumorigenesis.

16S rRNA gene-based metagenomics assay of stool DNA provided a specific microflora profile during pancreatitis-induced progression from ADM into PanIN. Besides, the morphological study demonstrated the close link between the tumorigenic process in the pancreas and the intestinal tract where Paneth cells may play an essential role.

研究分野：分子生物学、臨床医学

キーワード：膵腸相関 膵がん 自然免疫 腸内細菌叢 医食同源

1. 研究開始当初の背景

大規模ゲノムシーケンスを始めとした遺伝子解析技術を背景に、遺伝子異常という側面から見たがんの全体像は徐々に明らかになりつつある。難治性がんの代表格である膵がんにおいても、細胞レベル、さらに個体レベルでの遺伝子異常がもつ生理的意義が明らかになっており、発症メカニズムや治療に関わる情報が蓄積されてきた。

栄養素の変換の場である「腸」は、生体において最大の外界との接点であり、多くの細菌種が宿主と相互作用している。これら微生物との「共生」の破綻は、宿主に様々な疾患を誘発する。この共生メカニズムの中核を担うのが自然免疫と考えられる。腸管粘膜の陰窩に存在するパネト細胞は、抗菌物質であるα-ディフェンシンを産生することで、その司令塔的な役割を演ずる。腸内の細菌叢や自然免疫機構と疾患との関連については、これまでに我々が行った炎症性腸疾患をターゲットとした先駆的研究を皮切りに、肥満や糖尿病、さらにはがんへと拡大してきた。

膵臓はその機能上、小腸・十二指腸をはじめとした消化管と深く結びついている。しかし、膵がんが悪性形質を獲得する仕組みと腸内環境、及びこれを制御する消化管免疫系との関係に求めた研究は未だ展開されていない。膵がんの初期発生とその進展過程において、腸管自然免疫系をはじめとする生体統合性の維持システムの破綻が深く関わっている可能性があるが、その核心に迫る知見はこれまでに得られていない。

2. 研究の目的

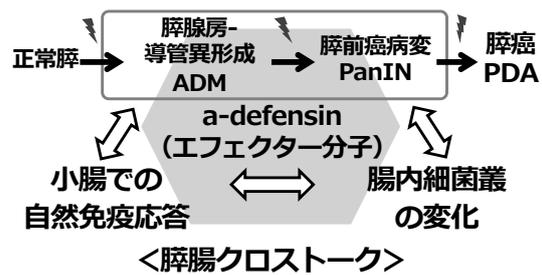
膵発がんの母地、あるいはこれを取り巻く微小環境という膵局所でのイベントから視野を広げ、「膵腸クロストーク」が存在するという仮説(図1)のもと、膵がん前駆病変を自然発症するマウスモデルを用い、腸内環境の変化、すなわち腸内細菌叢の変化とその制御に関与すると考えられる自然免疫系の変化を評価し、前駆病変の進展との関連が見られるかを明らかにすることを本研究の目的とした。

最終的にはヒト膵発がんにおけるリスク管理を食と腸内環境の整備という視点からアプローチすることにより、新規の概念による予防や治療へと繋がることを期待する。

3. 研究の方法

膵がんの前駆病変として、腺房の脱分化に伴う化生病変である acinar-to-ductal metaplasia (ADM) ならびに pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) が重要である。これらの前駆病変を自然発症する遺伝子改変マウスモデルを用いて、糞便メタゲノム解析による腸内細菌叢の変化を比較し、また研究チームがこれまでに独自に開発した

図1 ; 膵発癌過程における「膵腸クロストーク」のモデル検証

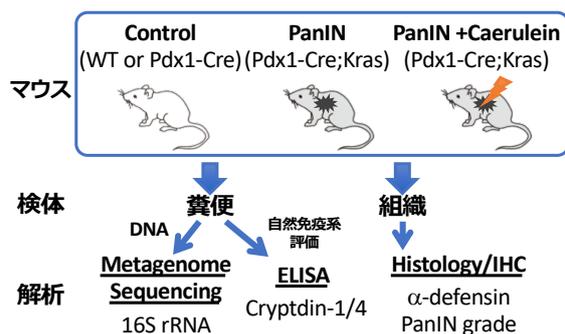


自然免疫機構の定量的な解析を行った。

膵特異的に変異型 *KRAS* を発現する遺伝子改変マウス (*Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}*; 以下 KC マウス) では、生後 8~12 週で ADM に類似する前駆病変の多発が見られる。これらの病変が癌化することは稀であるが、腸管ペプチドの一つでコレシストキニンの構造類似物であるセルレインを腹腔内投与すると、誘導される膵炎に伴い、臓器全体に分布する PanIN へと進展する。

本研究ではこのマウスを用いて、膵癌前駆病変の発生と膵炎負荷に伴う腫瘍進展に至る過程を再現した。生後 8 週齢のマウスにセルレインの投与を行い、経時的に糞便を回収して、1) 16S rRNA 遺伝子による腸内細菌叢のプロファイル (16S rRNA; V3-V4 領域を Illumina MiSeq を用いて解析)、2) 腸管自然免疫のエフェクター分子であるα-ディフェンシンの発現を比較した。その 8 週後の個体により得た腸管を組織学的に解析し、小腸パネト細胞の形態の評価を行った。さらに膵組織観察により前駆病変の質的・量的な評価を行った (図 2-1)。

図2-1 ; 研究方法の概略

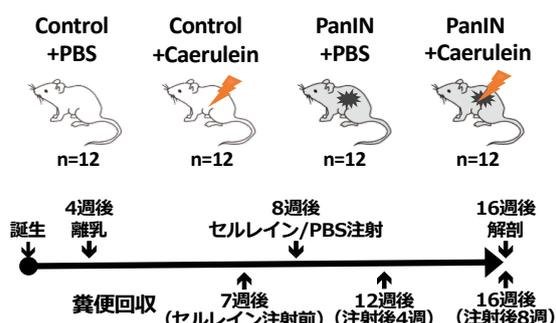


具体的なマウスの比較個体設定 (コントロール、および KC マウス) や糞便、組織採取のタイムラインを図 2-2 に示した。

正常マウス (*Pdx1-Cre* または *LSL-Kras*) および KC マウス (*Pdx1-Cre;LSL-Kras*) に対し、生後 8 週にセルレイン (50 μg/kg を 1 時間間隔で 6 回、2 日間) または PBS を腹腔内注射した。各条件での個体数は 12 匹とし、糞便回収を随時行い、8 週後の糞便採取をもって解剖し、小腸、大腸、膵臓を摘出して組織学的解析を行った。また盲腸便を別途採取し、

通常糞便との細菌叢との比較を行った。

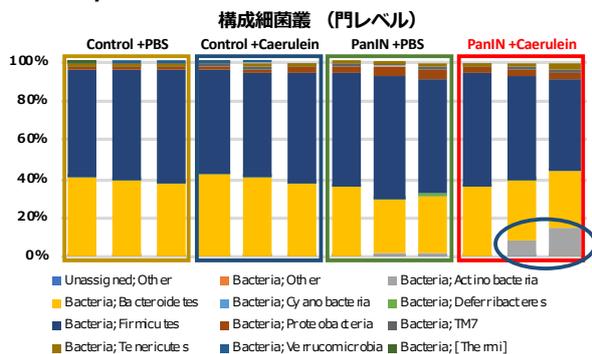
図2-2 ; サンプルサイズとタイムライン



4. 研究成果

生後7週（セルレイン注射前）、12週（注射後4週）、16週（注射後8週）のマウス糞便から単離したDNAを用い、細菌叢解析を行った。その結果、セルレインを注射したKCマウスにおいて、特徴的な細菌群の出現が確認された（図3、丸印）。この結果から、膵癌前駆病変の発生・進展に伴い、微生物叢からみた腸管内環境の変化が誘導された可能性が示唆される。

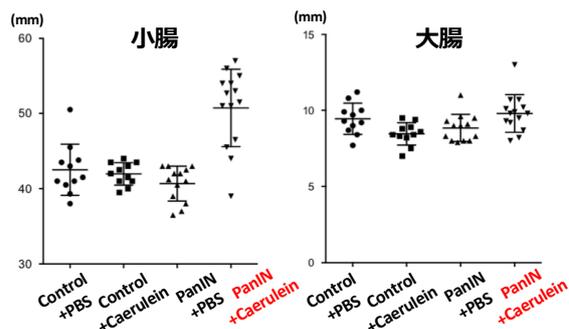
図3 ; 糞便16S rRNA メタゲノム解析



また、上記のモデルマウスにて腸管の組織形態、小腸パネト細胞の形態、また膵臓の病理学的組織観察を行った結果、セルレインを注射したKCマウスにおいて、小腸の全長や、小腸パネト細胞の形態と膵癌前駆病変の異型度との比較から、形態学的に興味深い関連を見出している（論文投稿準備中のため一部データのみ記載；図4）。また、遺伝子プロファイリングにより、特に小腸粘膜における形態変化についての裏付けを進めている。

これらのKCマウスを用いた解析結果から、「膵腸クロストーク」という仮説が裏付けられた。今後、「膵がんの悪性形質獲得機構」と「腸内環境およびそれを制御する自然免疫系」との直接的作用機序について明らかにし、膵がんの成り立ちに関する新展開の知見を得ることにより、臨床研究への足がかりとする。

図4 ; 腸管全長の比較



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11件）

1. Patra KC, Kato Y, Mizukami Y, Widholz S, Kottakis F, Boukhali M, Revenco I, Grossman EA, Liss AS, Screatton RA, Ryan DP, Mino-Kenudson M, Fernandez-del Castillo C, Nomura DK, Haas W, Bardeesy N. Mutant GNAS drives pancreatic tumorigenesis via PKA-SIK signaling and reprogramming lipid metabolism. *Nat Cell Biol* (2018, in press) (査読あり)
2. Goto T, Fujiya M, Konishi H, Sasajima J, Fujibayashi S, Hayashi A, Utsumi T, Sato H, Iwama T, Ijiri M, Sakatani A, Tanaka K, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Moriichi K, Mizukami Y, Kohgo Y, Okumura T. An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker. *BMC Cancer* 18:2018:116
doi: 10.1186/s12885-018-4006-5 (査読あり)
3. Ono Y, Sugitani A, Karasaki H, Ogata M, Nozaki R, Sasajima J, Yokochi T, Asahara S, Koizumi K, Ando K, Hironaka K, Daito T, Mizukami Y. An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by resolving “subsampling” issues. *Mol Oncol* 11:2017:1448-1458
doi: 10.1002/1878-0261.12110. (査読あり)
4. Patra KC, Bardeesy N, Mizukami Y. Diversity of precursor lesions for pancreatic cancer: Genetics and biology of intraductal papillary mucinous neoplasm (Review). *Clin Transl Gastroenterol* 8:2017:e86
doi: 10.1038/ctg.2017.3. (査読あり)

5. Saha S, Gordan JD, Kleinstiver BP, Vu P, Najem MS, Yeo JC, Shi L, Kato Y, Levin RS, Webber JT, Damon LJ, Egan RK, Greninger P, McDermott U, Garnett MJ, Jenkins RL, Rieger-Christ KM, Sullivan TB, Hezel AF, Liss AS, Mizukami Y, Goyal L, Ferrone CR, Zhu AX, Joung JK, Shokat KM, Benes CH, Bardeesy N. Isocitrate dehydrogenase mutations confer dasatinib hypersensitivity and SRC-dependence in cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* 6(7):727-39 (2016) doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1442. (査読あり)
 6. Matsuzaka S, Karasaki H, Ono Y, Ogata M, Oikawa K, Tamakawa S, Chiba S, Muraki M, Yokochi T, Funakoshi H, Kono T, Nagashima K, Mizukami Y. Tracking the clonal evolution of adenosquamous carcinoma, a rare variant of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas* 45:915-8 (2016) doi: 10.1097/MPA.0000000000000556. (査読あり)
 7. Driscoll DR, Karim SA, Sano M, Gay DM, Jacob W, Yu J, Mizukami Y, Gopinathan A, Jodrell DI, Evans J, Bardeesy N, Hall MN, Quattrochi BJ, Klimstra DS, Barry ST, Sansom OW, Lewis BC, Morton JP. mTORC2 signaling is required for pancreatic cancer development and progression. *Cancer Res* 76:6911-6923 (2016) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0810 (査読あり)
 8. Sugiyama Y, Sasajima J, Mizukami Y, Koizumi K, Kawamoto T, Karasaki H, Ono Y, Tanabe H, Fujiya M, Kohgo Y. The protein expression level of Gli2 is a feasible marker of ligand-dependent hedgehog activation in pancreatic neoplasms. *Pol J Pathol* 67(2):136-44 (2016) (査読あり)
 9. Sasajima J, Uehara J, Goto T, Fujibayashi S, Koizumi K, Mizukami Y, Ishida-Yamamoto A, Fujiya M, Okumura T. Pancreatic metastasis of angiosarcoma (Stewart-Treves syndrome) diagnosed using endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration: A case report. *Medicine* 95:e4316 (2016) doi: 10.1097/MD.0000000000004316. (査読あり)
 10. Sugiyama Y, Kawamoto T, Sasajima J, Koizumi K, Karasaki H, Mizukami Y. A Rare Case of Epidermoid Cyst in the Pancreatic Tail Invaginated from the Splenic Hilum: Long-term Alteration in Imaging Findings. *Intern Med* 55(24): 3591-3594 (2016) doi: 10.2169/internalmedicine.55.7466 (査読あり)
 11. Imai K, Karasaki K, Ono Y, Sasajima J, Chiba S, Funakoshi H, Muraki M, Hanaoka H, Furukawa T, Furukawa H, Kono T, Nagashima K and Mizukami Y. Metachronous pancreatic cancer originating from disseminated founder pancreatic intraductal neoplasias (PanINs). *The Journal of Pathology: Clinical Research* 1:76-82 (2015) doi: 10.1002/CJP2.8 (査読あり)
- [学会発表] (計 14 件)
1. Ono Y, et al. An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by resolving “subsampling” issues. 25th UEG Week (2017.10.31; Barcelona, Spain)
 2. Mizukami Y, et al. Plasma DNA genotyping using digital PCR for surveillance of pancreatic cancer in high-risk individuals. 25th UEG Week (2017.10.31; Barcelona, Spain) * SELECTED FOR POSTER OF EXCELLENCE
 3. Omori Y, et al. Concomitant pancreatic cancers arising adjacent to index IPMN share identical KRAS mutations and are associated with a favorable prognosis. 25th UEG Week (2017.10.30; Barcelona, Spain) *SELECTED FOR BEST POSTER AWARD
 4. Mizukami Y, et al. Digital PCR-based liquid biopsy for early detection of pancreatic cancer. 第76回日本癌学会学術総会 (2017.9.28; 横浜)
 5. Ono Y, et al. Improved digital PCR protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by pre-amplification. 第76回日本癌学会学術総会 (2017.9.30; 横浜)
 6. 水上裕輔 他. Liquid biopsy による早期発見、再発転移の評価システムの開発 (Liquid biopsy for Cancer Screening & Detection). 第15回日本臨床腫瘍学会学術総会 (2017.7.29; 神戸)
 7. 西川重輝 他. 当院における大腸がん症例の cfDNA 量と腫瘍マーカーの推移. 第66回日本医学検査学会 (2017.6.17; 千葉)
 8. Ono Y, et al. Molecular tracing of IPMN and related adenocarcinoma to define distinct routes to invasive carcinomas of the pancreas. 47th APA annual meeting (2016.10.28; Boston, USA)
 9. Mizukami Y, et al. Liquid biopsy for early detection of pancreatic cancer. 47th APA annual meeting (2016.10.28; Boston, USA)

10. Mizukami Y, et al. Plasma DNA genotyping using digital PCR for early detection of pancreatic cancer; 2nd report (UMIN000012810). 第75回日本癌学会学術総会 (2016. 10. 6; 横浜)
11. Ono Y, et al. Liquid biopsy using digital PCR for early- and advanced-stage lung cancer. 第75回日本癌学会学術総会 (2016. 10. 6; 横浜)
12. Mizukami Y, et al. Plasma DNA genotyping using digital PCR; Novel diagnostic tool for early detection of pancreatic cancer. Joint Conference of JPS&IAP&AOA (2016. 8. 4; 仙台)
13. Mizukami Y, et al. Plasma DNA genotyping using digital PCR for early detection of pancreatic cancer. 第74回日本癌学会学術総会 (2015. 10. 9; 名古屋)
14. Ono Y, et al. Tracking the clonal evolution of adenosquamous carcinoma, a rare variant of intraductal papillary mucinous neoplasm. 第74回日本癌学会学術総会 (2015. 10. 9; 名古屋)

[その他]

ホームページ情報
札幌東徳洲会病院 医学研究所
http://www.higashi-tokushukai.or.jp/clinical_study/index.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 裕介 (ONO, Yusuke)
医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院
臨床試験センター 医学研究所
臨床生体情報解析部
部門長、主任研究員

研究者番号：40742648

(2) 研究分担者

水上 裕輔 (MIZUKAMI, Yusuke)
旭川医科大学 医学部
准教授
医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院
臨床試験センター 医学研究所
がん研究部 部門長

研究者番号：30400089

中村 公則 (NAKAMURA, Kiminori)
北海道大学大学院 先端生命科学研究院
生命機能科学部門・細胞生物科学分野
自然免疫研究室
准教授

研究者番号：80381276

前本 篤男 (Atsuo, Maemoto)
医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院
臨床試験センター 医学研究所
IBD 研究部 部門長

研究者番号：40400113

(3) 研究協力者

なし