

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08767

研究課題名（和文）膵癌で高発現する転写因子の進展・転移における役割

研究課題名（英文）Role of transcription factors highly expressed in pancreatic cancer

研究代表者

深町 勝巳（Fukamachi, Katsumi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：90381798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌は間質の豊富な予後の悪い難治癌である。膵癌細胞が種々の因子を放出し周囲の環境を形成し悪性化に関与していると考えられる。我々の開発したラット膵癌モデルにおいて高発現する因子およびその因子の遺伝子発現を制御する高発現する転写因子同定した。間質より放出されるサイトカインが転写因子を活性化することにより種々の標的遺伝子の発現を亢進させ癌間質相互作用により膵癌の進展に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において膵癌間質相互作用を介した転写因子による悪性化への関与を示唆する結果が得られた。また、膵癌の診断マーカーとなる候補を同定できた。本研究結果をさらに発展させることにより難治癌である膵癌の克服のための新たな治療法や早期診断マーカーの開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：It is thought that pancreatic cancer cells release various factors that develop the surrounding environment and contribute to tumor malignancy. We established genetically engineered animal models for human pancreatic ductal adenocarcinoma that can develop in a short period. In our rat pancreatic cancer model, we identified some genes that are highly expressed. In addition, we identified transcription factors that regulate gene expression of these genes. The cytokines released from the stroma activate the transcription factors, which in turn upregulate the expression of various target genes and are thought to be involved in the progression of pancreatic cancer through cancer-stromal interactions.

研究分野：腫瘍学

キーワード：膵がん

1. 研究開始当初の背景

膵管癌は、予後不良な難治癌である。膵管癌の発生は膵管上皮細胞に KRAS 変異がおき PanIN (Pancreatic intraepithelial neoplasia、膵上皮内腫瘍性病変) と定義された前癌病変を経て進行すると考えられている。膵癌の浸潤・転移の過程には、癌遺伝子の変異やその蓄積、癌周囲の微小環境など様々な因子が関与している。膵癌の遺伝子異常は KRAS、CDKN2A、p53、SMAD4 の 4 遺伝子に高頻度に見られる。p53、SMAD4 は高異形度 PanIN において異常が見られることから進展に関与していると考えられている。その後進行癌へと進展し、転移する過程は、まだ不明な点が多い。

我々は活性型 RAS トランスジェニックラットを用いたラット膵癌モデル動物を確立した。活性型 RAS の発現は Cre/loxP システムにより制御可能で、Cre recombinase を膵臓に発現させることで短期間に膵管癌を発生させることができる。活性型 HRAS および活性型 KRAS トランスジェニックラットを作成した。活性型 HRAS または活性型 KRAS トランスジェニックラットの膵臓に Cre recombinase をアデノウイルスベクターにより発現させると両トランスジェニックラット共に膵癌を発生させることに成功している。発生した膵癌の組織像はヒト膵癌に極めて類似しており、発生する膵病変は膵管の形質をもち、腺房の形質は全く示さない。このモデルでは腺房細胞のみに活性型 RAS を発現させても腫瘍性病変は発生しなかったことから、腺房細胞からではなくヒトと同様に膵管由来の膵管癌が発生することが示されている。さらに、ヒト膵癌では腫瘍細胞を取り囲む高度な線維化を伴う間質での繊維あるいは結合組織の増生が特徴であるが、ラットに発生した膵癌はヒト膵癌と同様に間質が豊富でありヒトに極めて類似した組織像を示す。腫瘍形成には、腫瘍を形成する上皮細胞の存在と同時に癌細胞の微小環境を規定する間質細胞が極めて重要な意義を有している。間質細胞は、血管や免疫細胞と腫瘍細胞の物理的な障壁として、また膵癌の進展に関与する特徴的な微少環境として機能する。正常間質と癌間質ではその性格が変化していることが知られており、癌間質は癌細胞から何らかの影響を受け、癌の生育し易い環境を作りだしていると考えられる。膵癌の浸潤・転移の過程には、上皮間葉転換、癌遺伝子の変異や発現異常、癌周囲の微少環境など様々な要因が関与している。

2. 研究の目的

遺伝子発現を制御する転写因子の発現異常は、癌を含む多くの疾患で見られている。癌の悪性化には様々な要因が関与しており、癌の悪性化機構にはいまだ不明な点が多い。癌間質は癌細胞から何らかの影響を受け癌の成育しやすい環境を作り出していると考えられる。間質の豊富な予後の悪い膵癌においても膵癌細胞が種々の因子を放出し周囲の環境を形成し悪性化に関与していると考えられる。これらの放出される因子がどのように調節され機能を発揮しているかは解明されていない。本研究においては、膵癌で高発現する転写因子に着目し、複数の遺伝子を制御する転写因子が膵癌の悪性化に関与していると考えた。ラット膵癌モデルにおいて高発現する遺伝子を同定し、その発現を制御する転写因子を検索することにより活性化している転写因子の悪性化における役割を明らかにし、さらに膵癌の診断や治療に応用できるか検討を行う。

3. 研究の方法

ラット膵癌の発生

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを HEK293 細胞に感染させて、アデノウイルスを増幅し精製した。精製したアデノウイルスを活性型 RAS トランスジェニックラットの膵管内に注入することによって膵管癌を発生させた。

病理解析

採取した組織は、ホルマリンまたはパラホルムアルデヒドで固定しパラフィン包埋した。薄切した組織切片は HE 染色または免疫染色を行なった。

RAN 抽出

ISOGEN (日本ジーン) を用いて total RNA を抽出した。Total RNA から逆転写酵素により cDNA を合成し PCR を行なった。

細胞培養

活性型 HRAS トランスジェニックラットに発生した膵癌上皮に由来するラット膵癌細胞株を用いた。

4. 研究成果

活性型 RAS トランスジェニックラットに Cre recombinase 発現アデノウイルスを膵臓に注入することにより、膵臓に活性型 RAS の発現を誘導すると、4 週間後には膵臓に多数の結節が肉眼で確認できた。発生した膵癌の組織像は病理学的にヒトに極めて類似した間質の豊富な膵管癌であった。導入遺伝子の活性型 KRAS の発現は、腫瘍性病変にのみ検出され間質にはみられなかった。我々の確立したラット膵管癌モデルでは、活性型 RAS のみの発現で発生する膵癌は短期間では他臓器への転移はみられない。そこで、ヒト膵癌でみられる癌抑制遺伝子 p53 の変異や欠損がラットに発生した膵癌でみられるか検討した。ラットに発生した膵癌組織の全体を用いて p53 遺伝子変異の有無を調べたが p53 遺伝子の発現はみられ p53 をコードする領域に変異は検出されなかった。ラット膵癌モデルに発生する膵癌はヒトと同様に間質が豊富である。このモデルでは膵病変においてのみ活性型 KRAS が発現し間質には活性型 KRAS の発現はみられないことから、上皮性腫瘍のみにおける p53 の変異の有無をラット膵癌モデルより樹立した膵癌細胞株を用いることにより調べた。その結果、同様に p53 に変異はみられなかった。このラット膵癌モデルに発生した膵癌が転移するためには p53 遺伝子などの変異がさらに必要であると考えられる。ラットに発生した腫瘍は長期間飼育することにより転移する例がみられたことから、長期飼育を行うことにより膵癌転移モデルとして利用できる可能性が示唆された。

このラット膵管癌において高発現する因子を検索した。高発現する遺伝子群の中から診断マーカーとして用いることが可能な血清中にみられる N-ERC をはじめとする因子を同定することができた。また、この因子の発現を制御すると考えられる転写因子も高発現していることをみいだした。さらに、5' 上流域における転写因子の結合配列を検索すると、この転写因子の他にも数種の転写因子が結合すると思われる配列が存在した。これら転写因子の発現もトランスクリプトーム解析の結果から発現亢進していることが示唆された。これら因子を検索する過程で、膵癌で高発現しており分泌蛋白である細胞外に放出される LRG-1 を同定した。正常膵では LRG-1 遺伝子の発現量は非常に低かったが、膵癌組織での LRG-1 遺伝子は正常膵に比較し高発現していた。さらに、TCGA を用いた生存曲線解析を行うと LRG-1 高発現の膵癌患者は低発現の膵癌患者と比較し生存率が悪いことが示された。血清中の LRG-1 の濃度を ELISA により測定すると膵癌を発生したラットにおいて膵癌のないコントロールラットに比べ有意に高い濃度で存在していた。したがって、血清中の LRG-1 が膵癌の診断マーカーとなる可能性が示された。この LRG-1 はラット膵癌より樹立した細胞株にはほとんど発現していなかった。免疫染色では膵癌において発現がみられることから間質からの影響を受けて発現が亢進していると考えられた。プロモーター領域には IL-6 に反応する STAT3、NF-IL6 の結合配列が存在した。そこで、STAT3、NF-IL6 を活性化するサイトカインである IL-6 により LRG-1 の発現が誘導されるか検討した。ヒト膵癌細胞株を用いた検討により LRG-1 は IL-6 により発現誘導されることが明らかとなった。癌化により間質より放出される IL-6 を始めとするサイトカインが転写因子を活性化することにより LRG-1 などの因子を介して、癌の進展に関与していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukamachi K, Hagiwara Y, Futakuchi M, Alexander DB, Tsuda H, Suzui M	4. 巻 32
2. 論文標題 Evaluation of a biomarker for the diagnosis of pancreas cancer using an animal model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Toxicol Pathol	6. 最初と最後の頁 135-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1293/tox.2018-0062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深町勝巳
2. 発表標題 Rasトランスジェニックラットを用いた発がん研究
3. 学会等名 環境変異原学会2019年度公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深町勝巳、Sultana Nahida、松本晴年、津田洋幸、酒々井眞澄
2. 発表標題 膵癌モデルラットを用いた膵癌の血清診断マーカーLRG-1の同定
3. 学会等名 第38回日本毒性病理学会
4. 発表年 2022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
---------	---------