

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09460

研究課題名(和文) 膵癌発症マウスにおける骨髄由来線維芽細胞・筋線維芽細胞の役割とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the roles of bone marrow-derived fibroblasts/myofibroblasts and their molecular mechanism in the carcinogenesis of mouse models of pancreatic cancer

研究代表者

高石 繁生 (Takaishi, Shigeo)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：20596829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：当初の研究テーマを下記に変更して研究を進めた：A) 2種類の膵癌マウスから樹立した2つの培養細胞株PanIN-PCとIPMN-PCに関してCAGE法による遺伝子発現解析により各細胞の特徴付けを行う。B) ヒト膵癌培養細胞株およびヒト膵癌オルガノイドを用いて上皮間葉転換(EMT)関連転写因子の発現を解析し、膵癌幹細胞の恒常性維持機構を探求する。
上記テーマに関して以下の結果を得た：A) PanIN由来細胞では幹細胞関連因子が、IPMN由来細胞では細胞増殖抑制因子が、各々高発現していた。B) EMT関連因子の中でSNAIL2が最も高発現しており、そのノックダウンにより抗癌剤への抵抗性が減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の5年相対生存率は男女平均で約8.5%であり、全癌腫中で最低の数値である。従って、膵癌の発癌機構を解明し新たな治療戦略を見出すことは現在の癌診療政策における喫緊の課題であると言える。
今回の研究成果は、PanINとIPMNで異なる転写因子ネットワークが機能しており、前者で幹細胞関連因子が高発現し、後者ではPI3K/Aktシグナルが亢進していることを示した。加えて、ヒト膵癌においてEMT関連因子であるSNAIL2の発現を抑制することにより、癌幹細胞分画が縮小し抗癌剤への抵抗性が減弱すること、従ってSNAIL2およびその主たる下流遺伝子であるIGFBP2が新規の治療標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： We changed the research subjects to the following new ones: A) Characterization of our newly established two murine pancreatic cancer cell lines: a) from pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN), b) from intraductal papillary-mucinous neoplasm (IPMN). B) Investigation of molecular mechanism of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human pancreatic cancer by using pancreatic cancer cell lines (PCLs) and patient-derived pancreatic cancer organoids (PDOs).

We obtained following results: A) The transcriptome of PanIN cells exhibited properties of stemness, while that of IPMN cells was enriched for PI3K/Akt signal-related genes. Various transcriptional factor networks in PanIN and IPMN cells reflect the distinct molecular profiles of these cell types. B) Among EMT-related transcriptional factors, SNAIL2 is most highly expressed in PCLs as well as PDOs. Suppression of SNAIL2 decreased tumorigenicity, and microarray analysis revealed the mechanism was mainly mediated by IGFBP2.

研究分野：消化器癌幹細胞

キーワード：膵癌発症マウス ヒト及びマウス膵癌培養細胞株 ヒト膵癌オルガノイド COX-1, -2遺伝子 CAGE法
膵癌幹細胞 上皮間葉転換(EMT) SNAIL2(別称SLUG)

1. 研究開始当初の背景

消化器発癌（胃癌・大腸癌など）に骨髄由来細胞が深く関与していることが、主に消化器癌自然発症マウスモデルを用いて詳細に解析されている。そして、腫瘍に随伴する間質内の線維芽細胞（腫瘍関連線維芽細胞：CAF）および筋線維芽細胞（腫瘍関連筋線維芽細胞：CAMF）の多くが骨髄由来であり、消化器発癌において重要な働きをしていると考えられて来た。しかし膵癌においては、CAF および CAMF のどの程度が骨髄由来であるか、そして骨髄由来（筋）線維芽細胞の発癌における具体的な分子機構は依然として不明である。そこで、本研究においては、膵癌自然発症マウスモデルを用いて膵発癌における骨髄由来（筋）線維芽細胞の関与とその分子機構、とりわけ Cox-1、-2 遺伝子の役割を詳細に解析することを目的として研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的と方法は下記であった：A)膵癌マウスにおける骨髄由来腫瘍関連（筋）線維芽細胞および Cox-1、-2 遺伝子の役割を明らかにする。B)ヒト膵癌幹細胞における COX-1、-2 遺伝子の機能を解析する。A に関しては、a) 膵臓特異的 Cre 発現マウス (Ptfla-Cre) b) 条件的変異型 KrasG12D 発現マウス (LSL-KrasG12D) c) 条件的 p53 ノックアウトマウス (p53flox) を交配させ膵癌の発症を確認した (KPC マウスの作成)。しかし d) 条件的 Cox-1 ノックアウトマウス (Cox-1flox) and/or e) 条件的 Cox-2 ノックアウトマウス (Cox-2flox) と交配させたが、コロニーの維持・拡大が難しかった。B に関しては、癌幹細胞分画を含有するヒト膵癌培養細胞株 KLM1, KMP-5 およびヒト膵癌手術検体から樹立した 3 次元オルガノイドを用いて Cox-1、-2 遺伝子の発現を解析したが、前者の発現は認められず後者の発現はわずかであったため機能解析には至らなかった。

3. 研究の方法

そこで研究の目的と方法を下記に変更して研究を勧めた。1)2 種類の膵癌マウス(注)から樹立した各々の膵癌培養細胞株 PanIN-PC と IPMN-PC に関して、Cap Analysis of Gene Expression (CAGE)法による遺伝子発現解析を用いて各細胞の特徴付けを実施した。2)癌幹細胞分画を有するヒト膵癌培養細胞株 (KLM-1, KMP-5) および患者由来ヒト膵癌オルガノイド (PD-PCO) を用いて上皮間葉転換 (EMT) 関連転写因子の発現を解析し膵癌幹細胞の恒常性維持における役割を探求した。(注)PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) 由来膵癌マウス:Ptfla-Cre x LSL-KrasG12D x p53f/+ および IPMN (intraductal papillary mucinous neoplasia) 由来膵癌マウス: Ptfla-Cre x LSL-KrasG12D x Brg1f/f.

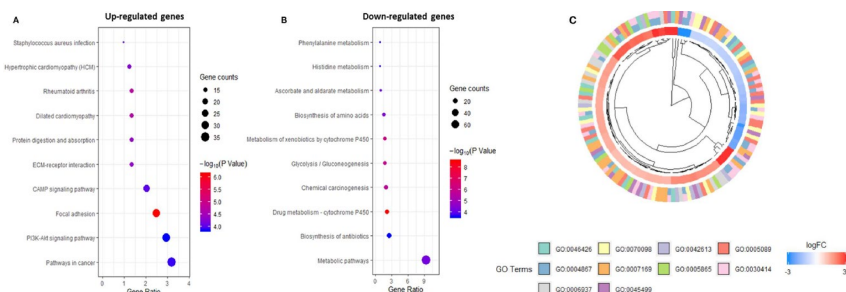
4. 研究成果

前述した 2 つの研究テーマに関して、それぞれ下記の成果を得た。なお、1) の成果は英語論文にて査読付き学術誌に既に掲載済みである。(Chen et al, *Frontiers in Oncology* 2020, March, volume 10, article 316, p1-4)、2) の成果は現在英語論文を査読付き学術誌に投稿中である。そこで、以下の成果は英語にて記載する。

1) Promoter-level transcriptome identifies stemness associated with relatively high proliferation in pancreatic cancer cells.

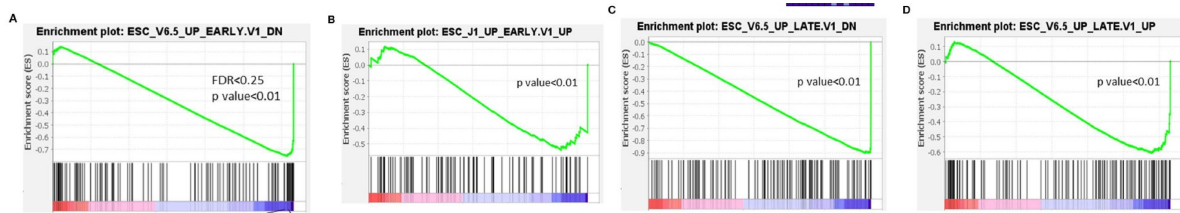
1A: Identification of enriched processes among promoters in PanIN-PC and IPMN-PC cells

KEGG/GO term enrichment analysis revealed that the commonly upregulated promoters were enriched primarily in important pathways such as PI3K-Akt signaling and focal adhesion (left: A). The downregulated promoters were enriched in P450 metabolic systems such as drug metabolism and xenobiotic metabolism (center: B). In IPMN-PC cells, upregulated promoters were enriched for the GO categories related to inhibitory enzymatic activity, negative regulation of cell communication, and immune processes (right: C), indicating a more suppressive signature when compared with that of PanIN-PC cells.



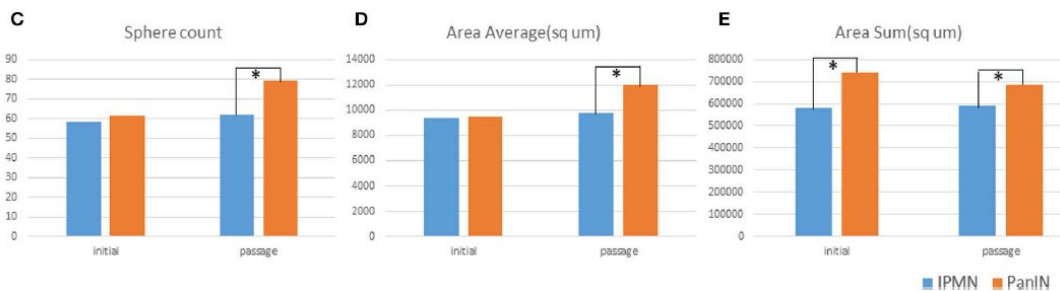
1B: Gene set enrichment analysis of the promoteromes in the two types of mouse pancreatic cancer cell lines, PanIN-PC and IPMN-PC.

Only the expression matrix from PanIN had a detectably distinct pattern different from that of stepwise development in a mouse embryo. On the contrary, PanIN cells exhibited negative correlations with all genes that were downregulated during the early/late differentiation of embryoid bodies from ESCs, suggesting that these cells tend to lose the capacity for pluripotency.



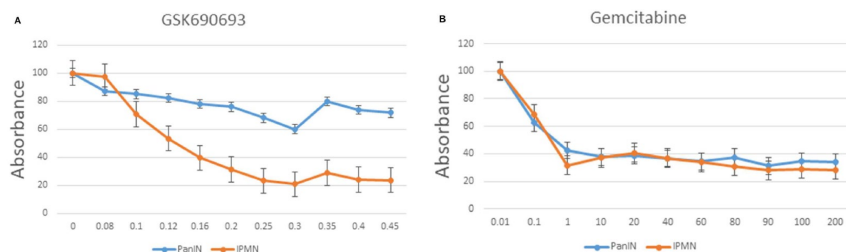
1C: Validation of stemness in a mouse cell line derived from pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN-PC.

The spheres formed by IPMN-PC cells tended to merge upon reaching a diameter of $100\ \mu\text{m}$, followed by a transformation into an irregular shape and loss of the round shape (C,D,E). In a comparison of the cell lines, both the numbers of spheres with diameters $> 80\ \mu\text{m}$ and the average area of a single sphere were likely to exhibit insignificant differences. After passage, however, PanIN exhibited a greater capacity in terms of overall sphere formation and spherical size.



1D: Evaluation of chemoresistance in the two types of mouse pancreatic cancer cell lines, PanIN-PC and IPMN-PC.

To evaluate the activation of the PI3K-Akt signaling pathway in IPMN-PC cells, GSK690693 (Akt inhibitor) was added to cultures of both cell lines, and the effect was investigated. Notably, GSK690693 decreased the proliferation rate of IPMN-PC cells in an approximately dose-dependent manner (left: A). We also treated both cell lines with gemcitabine, and IPMN-PC and PanIN-PC cells did not differ greatly in terms of sensitivity on gemcitabine (right: B).

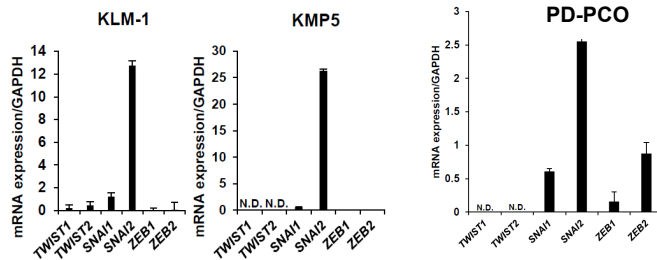


***In conclusion, the various transcriptional factor network systems detected in PanIN-PC and IPMN-PC cells reflect the distinct molecular profiles of these cell types. Further, we hope that these findings will enhance our mechanistic understanding of the characteristic molecular alterations underlying pancreatic cancer precursors. These data may provide a promising direction for therapeutic research.**

2) SNAIL2 is a critical factor for tumorigenicity and chemoresistance in human pancreatic cancer.

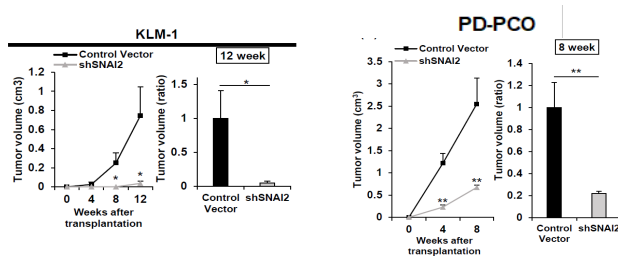
2A: SNAIL2 was highly expressed in pancreatic cancer cell lines as well as patient-derived pancreatic cancer organoid.

We analyzed mRNA expression of epithelial mesenchymal transition (EMT)-related transcription factors such as SNAIL1, 2, TWIST1, 2 and Zeb1, 2 for highly tumorigenic human pancreatic cancer cell lines KLM1 and KMP5 as well as patient-derived pancreatic cancer organoid (PD-PCO). Results showed that SNAIL2 expression was significantly higher than that of others.



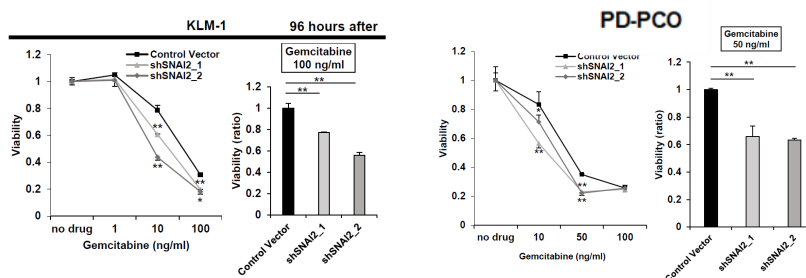
2B: Lentivirus-mediated SNAIL2 knockdown reduced tumorigenic potential.

We generated SNAIL2 gene knockdown stable clones (shSNAIL2) via gene transduction of short hairpin RNAs with lentiviral vectors against KLM1, KMP5 and PDPCO. Xenograft assay using subcutaneous transplantation model of immunodeficient mice showed that a difference in the number of tumors formed via the dilution of cell numbers that should be transplanted and the growth rate of tumor formation reduced. Thus, shSNAIL2 had a lower tumorigenic capacity.



2C: SNAIL2 knockdown attenuated resistance to chemotherapy in pancreatic cancer cell lines as well as patient-derived pancreatic cancer organoid.

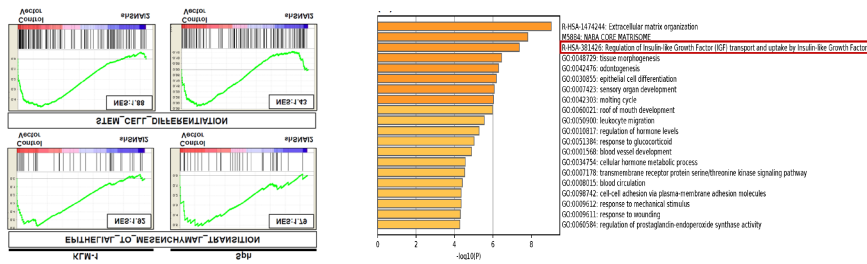
To evaluate chemotherapy resistance, we performed cell proliferation assay using WST-8 for survival after gemcitabine treatment. Results showed a significant reduction in the survival of shSNAIL2 compared with controls, thereby indicating a reduction in treatment resistance to gemcitabine.



2D: Microarray analysis identified significant annotations.

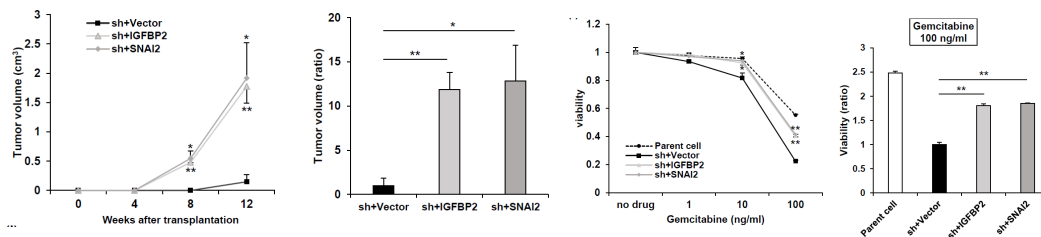
To elucidate the mechanisms associated with the results, we performed a microarray analysis comparing RNA samples between the control vector and shSNAIL2 groups using KLM1 and PD-PCO. A gene set enrichment analysis showed significant differences in the gene sets involved in EMT and stem cell differentiation in both the KLM1 and PD-PCO groups (left panel). In addition, Metascape was explored to examine for Gene Ontology (GO) terms with significant changes in the KLM1 and PD-PCO groups. Among the top listed GO terms, there were EMT-related and biological function terms as expected, but apart from them, insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-related term are uniquely

found. (right panel) Next, we examined changes in mRNA expression of these IGFBPs, and IGFBP2 was found to be most significantly downregulated in shSNAI2 compared with controls in both KLM1 and PD-PCO (data not shown).



2E: Gene transduction of IGFBP2 restored the properties of cancer stem cells.

The overexpression of IGFBP2 in SNAI2 gene knockdown clones (sh+IGFBP2) confirmed the transcriptional overexpression of the transduced IGFBP2 gene (data not shown). In the assessment of xenograft tumorigenicity, sh+IGFBP2 and sh+SNAI2 had a greater number of tumors formed via the dilution of cell count and that the tumor size increased (left panel). In addition, cell proliferation assays showed an almost complete restoration of treatment resistance to gemcitabine in sh+IGFBP2 compared with sh+SNAI2 (right panel). Thus, SNAIL2 contributed to the properties of cancer stem cells mainly via IGFBP2 in pancreatic cancer.



*Taken together with 2A-2E, we conclude that SNAIL2 is a critical factor for tumorigenicity as well as chemoresistance in human pancreatic cancer, and IGFBP2 is the main downstream target regulated by SNAIL2.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tamura S, Isobe T, Ariyama H, Nakano M, Kikushige Y, Takaishi S, Kusaba H, Takenaka K, Ueki T, Nakamura M, Akashi K, Baba E.	4. 巻 40 (2)
2. 論文標題 E-cadherin regulates proliferation of colorectal cancer stem cells through NANOG.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 693-703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6464.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiramatsu Y, Fukuda A, Ogawa S, Goto N, Ikuta K, Tsuda M, Matsumoto Y, Kimura Y, Yoshioka T, Takada Y, Maruno T, Hanyu Y, Tsuruyama T, Wang Z, Akiyama H, Takaishi S, Miyoshi H, Taketo MM, Chiba T, Seno H.	4. 巻 116 (5)
2. 論文標題 Arid1a is essential for intestinal stem cells through Sox9 regulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 1704-1713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1804858116.	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 該当する
1. 著者名 Ikuta K, Fukuda A, Ogawa S, Masuo K, Goto N, Hiramatsu Y, Tsuda M, Kimura Y, Matsumoto Y, Kimura Y, Maruno T, Kanda K, Nishi K, Takaori K, Uemoto S, Takaishi S, Chiba T, Nishi E, Seno H.	4. 巻 68 (5)
2. 論文標題 Nardilysin inhibits pancreatitis and suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma initiation in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 882-892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2017-315425.	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 -
1. 著者名 Chen R, Sugiyama A, Kataoka N, Sugimoto M, Yokoyama S, Fukuda A, Takaishi S, Seno H	4. 巻 10
2. 論文標題 Promoter-level transcriptome identifies stemness associated with relatively high proliferation in pancreatic cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.00316.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chen R, Masuo K, Yogo A, Yokoyama S, Sugiyama A, Seno H, Yoshizawa A, Takaishi S	4. 巻 42 (2)
2. 論文標題 SNAIL regulates gastric carcinogenesis through CCN3 and NEFL.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 190-201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgaa133	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 増尾謙志、高石繁生、余語覚匡、陳如、福田晃久、増井俊彦、妹尾浩
2. 発表標題 SNAIL2は膵癌の幹細胞性維持において重要である
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 (ポスター発表)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 余語覚匡、高石繁生、増尾謙志、陳如、増井俊彦、妹尾浩
2. 発表標題 胆道癌におけるドーパミンの自己分泌作用は癌幹細胞の微小環境に寄与する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 (ポスター発表)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陳如、高石繁生、増尾謙志、余語覚匡、杉山愛子、妹尾浩
2. 発表標題 SNAIL regulates gastric carcinogenesis through CCN3 and NEFL.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 (口頭発表)
4. 発表年 2020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
---------	---------