

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09461

研究課題名(和文) インスリン分泌不全および抵抗性が膵発癌・進展機構に与える影響の解明

研究課題名(英文) The effect of insulin insufficiency and/or insulin resistance on pancreatic carcinogenesis and progression

研究代表者

重川 稔 (Shigekawa, Minoru)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00625436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ストレプトゾシン(STZ)投与により低インスリン、高血糖状態となった膵発癌マウスは12週齢でPanINsが増悪していた。高グルコース条件下での細胞実験では、Kras変異膵癌細胞においてのみ、増殖、腫瘍形成能が増強し、STAT3-MYC経路が関与していた。免疫染色ではSTZ投与群で、PanINs内のpSTAT3やMYC発現が増強していた。高グルコース条件下で培養した群で見られる細胞増殖、スフェア形成能、MYC発現増強は、STAT3阻害薬を培地に投与することで低グルコース条件下と同等まで低下した。本検討から、高血糖状態はSTAT3-MYCの発現増強を伴い膵発癌を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病と膵癌の関係性のメカニズムは不明な点が多い。本研究では糖尿病の重要な側面の一つである高血糖に注目し、高血糖が膵発癌に与える影響について検討を行った。結果、高血糖はin vitro, in vivoの系において、STAT3のリン酸化とMYCの発現増強を伴って、膵発癌を進展させることが示唆された。厚生労働省の報告では、糖尿病を否定できない患者は国内でも1000万人程度存在するとされている。糖尿病患者の膵発癌をどう抑制するのか、また糖尿病患者の中からどう膵癌の高リスク群を選別するかが差し迫った課題である。本研究が解明した高血糖と膵癌の関係性はその一助となると考えている。

研究成果の概要(英文)：We focused on hyperglycemia and showed that hyperglycemia enhances pancreatic cancer progression. Streptozotocin-induced hyperglycemia in Kras^{LSL} G12D Pdx1^{Cre} (KP) mice promoted PanINs formation and progression. High-glucose environment showed increased cell viability and sphere formation in PANC-1, a Kras-mutant human pancreatic ductal cancer cell line, and mPKC1, a Kras-mutant murine pancreatic cancer cell line. STAT3 phosphorylation and MYC expression was elevated under high glucose environment in Kras-mutant cells. PanINs from diabetic KP mice showed stronger phosphorylated-STAT3 and MYC staining than those from euglycemic counterparts. STAT3 inhibition in Kras-mutant cell lines blocked the enhanced cell viability and sphere formation induced by the hyperglycemia, and reversed the elevated pSTAT3 and MYC expression. In conclusion, hyperglycemia, on a Kras-mutant background, aggravates the PanINs progression accompanied by elevated pSTAT3 and MYC expression.

研究分野：消化器がん

キーワード：膵癌 糖尿病 高血糖状態 膵発癌 膵癌進展

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は5年生存率が10%に満たず、年間死亡者数が年間罹患数とほぼ同数である難治癌の1つである。膵癌の罹患数、死亡数はともに、本邦を含め世界的に年々増加傾向を認め、膵癌の克服は世界的な課題の一つである。5年生存率が望めない原因の一つに早期発見が難しい点が挙げられ、膵癌の高危険群の同定、適切なスクリーニング法の確立は重要な課題である。2007年に我が国で行われた膵癌登録報告によると、膵癌患者の既往歴として糖尿病が25.9%と最も頻度が高いと報告されている。また、膵癌発症は糖尿病の新規発症から2年以内が多く¹、糖尿病の新規発症例では膵癌診断時の2年前から、糖尿病の既往症例では1年前から空腹時血糖の増悪が認められ²、糖尿病新規発症や増悪は膵癌の発見契機となる。糖尿病罹患期間と発症の関連については、糖尿病発症の1年以内で相対危険度が6.69、10年以内で1.36と罹患早期で最もハイリスクとなり、長期罹患では一般人口より高い発癌率を呈することが報告されている³。糖尿病発症後短期間における膵発癌リスクの上昇は、膵癌に伴う膵機能低下や耐糖能異常の影響が原因の一つとして考えられるが、糖尿病長期罹患では糖尿病によるインスリン抵抗性やインスリン分泌量低下、高血糖状態の持続が発癌リスク上昇に關与している可能性がある。

インスリン分泌不全のある1型糖尿病では若年発症でインスリン分泌不全がその病態であるが、膵癌のリスクが2倍程度に上昇したと報告されている⁴。一方で、高血糖や高インスリン血症、HOMA-R高値がそれぞれ膵癌の危険因子と報告されている⁵。細胞実験で高血糖状態が膵癌細胞の浸潤能を高めること⁶や、インスリンが細胞増殖を促進することが報告されている⁷。しかし、高血糖状態やインスリンの多寡が、癌間質細胞の増殖・活性化や膵癌細胞と間質細胞の相互作用に対してどのような影響を与えるのか、またその機序については十分な検討がなされていない。動物モデルを用いた検討では、2次的にインスリン抵抗性を呈する高脂肪食負荷が膵発癌リスクを上昇させるが、インスリン分泌低下やそれに起因する高血糖状態が膵発癌や腫瘍の増殖進展に与える影響については十分に検討されていない。さらに、重症2型糖尿病で認められるインスリン抵抗性とインスリン分泌不全が同時に存在する病態において、それらが膵発癌や腫瘍進展に与える影響についても明らかではない。

2. 研究の目的

早期診断のためには膵癌高危険群に対する効率的なスクリーニング検査が望まれる。糖尿病は膵癌の高危険群として報告されているが、糖尿病におけるインスリン分泌低下やインスリン抵抗性、高血糖状態が膵発癌および増殖に与える影響およびその機序については十分に検討がなされていない。本研究課題では、糖尿病を誘発した膵発癌マウスや膵癌細胞株/膵星細胞株を用いて、インスリンの多寡や高血糖状態などがPanINs形成や腫瘍の増殖、進展に与える影響について解析を行い、糖尿病をインスリン分泌不全とインスリン抵抗性の観点から層別化し、糖尿病のどのような側面が膵発癌のリスクとなるのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

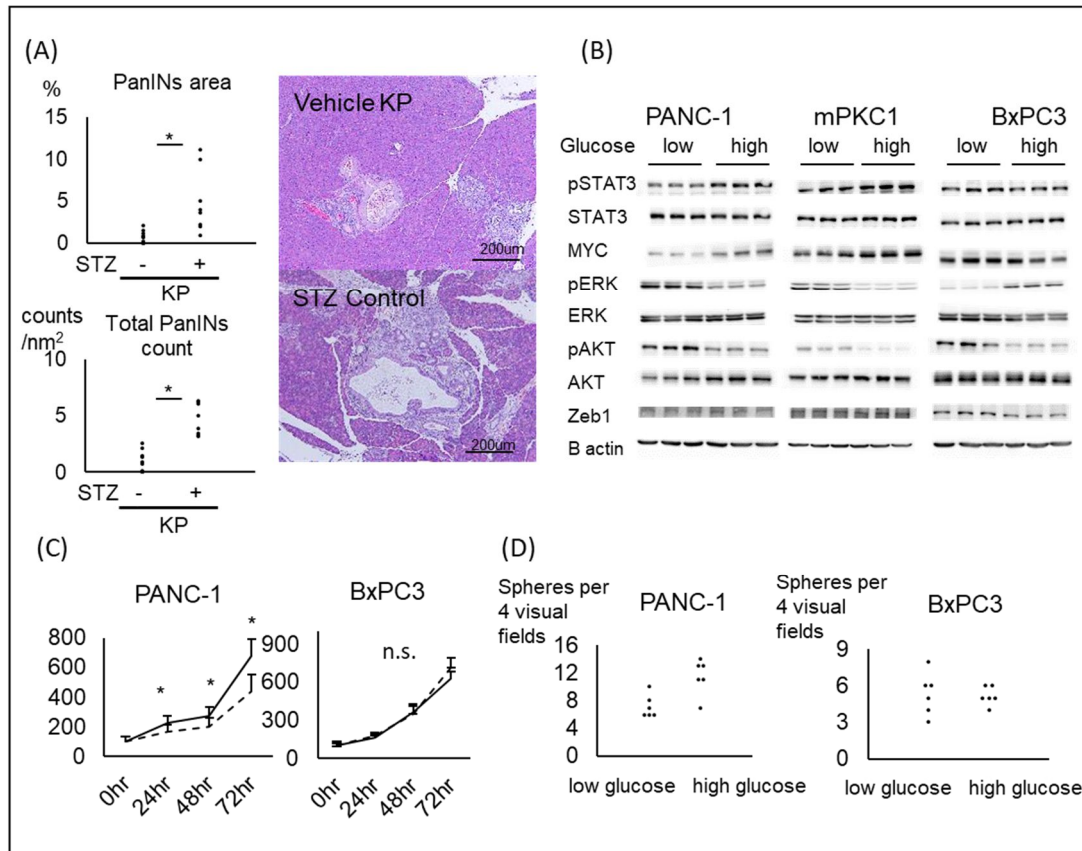
- 膵発癌モデルマウスである *Kras^{LSLG12D} Pdx1 Cre* マウスに対して、7日齢でストレプトゾトシン(STZ) 100mg を腹腔内投与し、8週齢で血糖値 300mg/dL 以上の個体(糖尿病の誘導が成功したマウス)を選別し、STZで糖尿病の誘導に成功した膵発癌マウス(STZ投与膵発癌モデルマウス)を作製した。同マウスを12週齢で sacrifice し、膵組織検体を HE 染色で評価し、PanINs 領域の個数、専有面積によって評価を行った。
- 膵癌細胞株を low or high glucose 条件下で 72 時間もしくは 28 日間培養を行い、遺伝子発現、細胞増殖、腫瘍形成能の変化を解析した。Low もしくは high glucose 条件下で 28 日間培養したマウス由来膵癌細胞株 (mPKC1、膵発癌マウスより樹立) を B16/J に膵同所移植し腫瘍重量を評価した。
- STZ 投与膵発癌モデルマウス (12 週齢) の膵組織検体を用いて免疫染色を行い、上記 in vitro 実験で蛋白発現変化を認めた MYC、pSTAT3 の発現を評価した。
- Low or high glucose 条件下で培養した膵癌細胞株に STAT3 阻害薬を投与し、STAT3 阻害薬が膵癌細胞株に与える影響(遺伝子発現、細胞増殖、腫瘍形成能)を評価した。
- *Kras* 変異を伴う膵癌細胞株である PANC-1 と mPKC1 において、siMYC を用いた MYC ノックダウン実験を行い、細胞増殖、腫瘍形成能、pSTAT3、STAT3、MYC、pERK、ERK のタンパク発現に与える影響を評価した。

4. 研究成果

- STZ 投与膵発癌モデルマウスの膵組織検体を用いた PanINs 形成の程度の病理学的検討
12 週齢の *Pdx1 Cre* マウス(control)、*Kras^{LSLG12D} Pdx1 Cre* マウス(KP)に対して、vehicle もしくは STZ を投与し、得られる 4 群で比較検討を行った。STZ 投与マウスは低インスリンかつ高血糖を呈し、インスリン依存性糖尿病が誘導された。vehicle 群と比し、STZ 投与群では control マウス、KP マウスのいずれも低体重を呈した。また血清アミラーゼ値、肉眼的、組織学的評価ではいずれの群も、sacrifice 時点で膵炎を示唆する所見に乏しかった(data not shown)。Vehicle KP 群と STZ KP 群で PanINs を評価すると、PanINs 領域および PanINs 個数が STZ KP 投与群で大きかった (図 1A)。

● 膵癌細胞株に対する low or high glucose 条件下における細胞増殖の検討

膵癌細胞 PANC-1、BxPC3 を low もしくは high glucose 条件下で培養した。72 時間培養では遺伝子発現(ERK, STAT3, MYC)に変化は認めなかったが、28 日培養では high glucose 条件下かつ PANC-1 (Kras 変異あり)においてのみ pSTAT3、MYC 発現増強が確認された(図 1B)。細胞増殖は、high glucose 条件下で Kras 変異を有する細胞株において 24 時間、48 時間、72 時間培養において増強を認めた(図 1C)。腫瘍形成能は 72 時間培養では変化はないものの、28 日間培養では high glucose 条件下で Kras 変異を有する細胞株において増強を認めた(図 1D)。また、マウス由来 Kras 変異型膵癌細胞株において、同細胞を 28 日間 low もしくは high glucose



条件下で培養した。PANC1 で認められたように high glucose 条件下において pSTAT3、MYC の発現増強および細胞増殖、腫瘍形成能の増強が認められた(図 1B)。

さらに low もしくは high glucose 条件下で培養した mPKC1 細胞を Bl6/J マウスの膵尾部に同所移植したところ、腫瘍重量が 14 日後に high glucose 条件下培養細胞においてより増大していることが確認された。

● STZ 投与膵発癌モデルマウスの膵組織検体を用いた免疫染色の検討

12 週齢の Vehicle KP 群と STZ KP 群から得られた膵組織検体を用いて免疫染色を行うと、STZ-KP 群において vehicle KP 群と比し、PanINs 部の pSTAT3 および MYC 発現が増強していた(data not shown)。

● STAT3 阻害薬が膵癌細胞株に与える影響の検討

Low もしくは high glucose 条件下で 28 日間培養した PANC1、mPKC1、BxPC3 に対して、STAT3 阻害薬(STATTIC)を添加したところ、high glucose 条件下で認められていた pSTAT3、MYC の発現増強は low glucose 条件下における pSTAT3、MYC の発現レベルまで低下し、細胞増殖、腫瘍形成能も同様に同程度まで低下した。また STAT3 阻害は MYC の発現を抑制した。

● MYC ノックダウンが膵癌細胞株に与える影響の検討

Kras 変異を伴う膵癌細胞株 PANC-1、mPKC1 において、siMYC で良好なノックダウンを得た。MYC のノックダウンにおいて、STAT3 の上昇はなく、MYC は STAT3 の上流にあるタンパクではないことが判明した。また siMYC において、細胞増殖は変化せず、腫瘍形成能のみ劇的に低下した。

< 参考文献 >

1. DiMaqno EP, et al. Gastroenterology 1999; 117: 1464-84.
2. Chari ST, et al. Gastroenterology 2008; 134: 95-101.
3. Batabyal P et al ,Ann Surg Oncol 2014; 21: 2453-62.
4. Stevens RJ, et al. Br J Cancer 2007; 96: 507-9.
5. Stolzenberg-Solomon RZ, et al. JAMA 2005; 294: 2872-8.
6. Li W, et al. Oncol Rep 2011; 25: 1279-87.
7. Bincy P, et al. Gastroenterology 2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	小玉 尚宏 (Takahiro Kodama) (10623275)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	巽 智秀 (Tomohide Tatsumi) (20397699)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	疋田 隼人 (Hayato Hikiita) (20623044)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	