

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17579

研究課題名（和文）膵星細胞を介する2型糖尿病の膵導管癌への影響の検討

研究課題名（英文）Effect of type 2 diabetes on pancreatic ductal carcinoma via pancreatic stellate cells

研究代表者

内田 知顕（Uchida, Chiaki）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80791714

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病は膵管癌の予後不良因子であるが、詳細な機序は不明である。本研究は、膵星細胞に着目し、2型糖尿病が膵星細胞を介して膵管癌に与える影響を解明することを目的とした。マウス由来の膵星細胞に2型糖尿病に関連して分泌されるAGEsを加え活性度を解析し、膵星細胞の活性化が進んでいることを明らかにした。また2型糖尿病を合併した膵管癌患者の方が、膵星細胞由来と思われる癌細胞周囲の線維化が強いということも明らかにした。これらのことから2型糖尿病は膵星細胞を介して癌周囲間質の線維化を進め、それが予後の悪化につながっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、2型糖尿病が膵星細胞を介して膵管癌の悪性度に寄与している機序の一つを明らかにすることができた。この結果から、いまだに予後の最も悪い癌腫の一つである膵管癌の進行、進展の機序の解明につながる可能性がある。また、本研究をさらに発展させることができれば、癌周囲間質の制御を介した膵管癌の新規治療法の開発につながる可能性があると思われる。

研究成果の概要（英文）：Type 2 diabetes is a poor prognostic factor in pancreatic ductal carcinoma, but the detailed mechanism is unknown. This study focused on pancreatic stellate cells and aimed to elucidate the effect of type 2 diabetes on pancreatic ductal carcinoma via pancreatic stellate cells.

We add the AGEs that have increased secretion in type 2 diabetes, to mouse-derived pancreatic stellate cells, and analyzed the activity. We revealed that pancreatic stellate cells with AGEs were more activated. In addition, we observed the surgical specimens, it was clarified that patients with pancreatic ductal carcinoma who had type 2 diabetes had stronger fibrosis around the cancer cells that seem to be derived from pancreatic stellate cells. These findings suggest that type 2 diabetes promotes fibrosis of peri-tumor stroma via pancreatic stellate cells, which may lead to worse prognosis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵星細胞 膵管癌 2型糖尿病 AGEs

1. 研究開始当初の背景

膵導管癌 (PDC) は、罹患率と死亡率がほぼ同等の極めて予後不良な癌腫である。年間死亡者数も 3 万人を超え増加の一途をたどっている。手術以外の根治的治療法がなく新規治療法の開発が急務となっている。

PDC の進展には腫瘍細胞周囲の微小環境が深く関わっている。間質線維化は PDC に特徴的な病理組織学的所見の一つである。近年、間質線維化とその生物学的悪性度が密接に関わっていることが判明してきた。

膵臓の線維化には特別な細胞が関与している。1990 年に Apte らによって、肝星細胞と同様な細胞の存在が膵臓で明らかとなり、膵星細胞 (PSC) と命名された (Apte MV, et al. Gut. 1998)。PSC は腺房細胞や血管の周囲に静止状態で存在し、刺激が加わることで活性化状態となり、自らの増殖とともに細胞外マトリックス (ECM) を多量に産生する。特にこの ECM は膵癌細胞の足場となることで、癌の増殖、遊走を支持するだけでなく、種々のシグナル伝達 (Focal Adhesion Kinase の活性化、mcl-1 遺伝子の発現など) を介して癌の進展を促進することが明らかとなっている。さらに、活性化 PSC は液性因子 (TGF- β 、bFGF など) を分泌して PDC 細胞の増殖を促し、PDC 細胞も同様に PSC の増殖を促すという相互作用が注目されている。実際にヒト外科切除 PDC 標本に対し、 α -SMA による免疫染色を行うと多量の活性化 PSC が腫瘍内に存在していることが確認できる。

2 型糖尿病 (T2DM) により PDC の発症率は約 1.8 倍高くなる。さらに、近年 T2DM は PDC の予後不良因子の一つであることも明らかとなった。T2DM による高血糖状態は、終末糖化産物 (AGEs) とその受容体 (RAGE) を介したシグナルや、ポリオール経路の活性化により T2DM 合併症を引き起こす。このうち RAGE に関して、Fehrenbach H らは肝線維化に深く関わる肝星細胞には RAGE が発現しており、RAGE 経路の活性化が肝の線維化を促進することを証明した (Fehrenbach H, et al. Hepatology. 2001)。申請者は予備実験で、ラット由来の PSC に RAGE が発現していることを RT-PCR で確認した。RAGE のリガンドには AGEs の他に、HMGB1 などの Damage-associated molecular patterns (DAMPs) などがあり、これらのリガンドは T2DM で産生が高くなることが知られている。このことから T2DM による PDC の予後低下には、RAGE シグナルを介する PSC 活性化の関与が予想される。T2DM に対する治療により PSC の活性化が抑制でき、PDC を制御できるならその臨床的意義は極めて大きい。

2. 研究の目的

2 型糖尿病 (T2DM) は膵導管癌 (PDC) の予後不良因子であるが、詳細な機序は不明である。近年、膵星細胞 (PSC) が、PDC 細胞の増殖、進展に関与することが明らかとなり、PSC が新たな治療標的として注目されている。一般的に、PSC は炎症などの様々な因子によって活性化する。高血糖に起因する終末糖化産物、及びその受容体 (RAGE) を介したシグナルは、T2DM 合併症の発症機序の 1 つであるが、PSC の活性化にも重要である。その機序を利用した新規治療法の探索を目的とする。本研究は、PDC における T2DM による RAGE を介した PSC の活性化を明らかにし、PSC を標的とした PDC の新規治療法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 2 型糖尿病 (T2DM) による膵星細胞 (PSC) 活性化、線維化への影響

膵導管癌 (PDC) 外科手術標本で、T2DM の有無により腫瘍内線維化に違いがあるかを α -SMA の免疫染色を用いて明らかにする。

(2) T2DM 影響下 PSC の解析

T2DM モデル動物 (db/db mouse) から PSC を単離、培養し collagen 産生能、TGF- β 1 や α -SMA の発現に違いがあるかを検討する。

(3) 終末糖化産物 (AGEs) による PSC 活性化への影響

野生型マウスと RAGE ノックアウトマウスから単離、培養した PSC に AGEs を加え、活性化への影響を PCR を用いて解析する。また野生型マウス、RAGE ノックアウトマウスに高脂肪食を与え T2DM に罹患させた後に、PSC を単離、培養し同様の解析を行い、PSC に対する糖尿病状態が与える影響を明らかにする。

4. 研究成果

長期 2 型糖尿病 (T2DM) 合併膵管癌患者では PanIN 周囲の α -SMA の発現が上昇している

—長期 T2DM 合併膵管癌患者群と非糖尿病膵管癌患者群では、膵導管癌 (PDC) 部を膵星細胞 (PSC) の活性化のマーカーの 1 つである α -SMA に対する免疫染色を行うと、どちらの群の標本も癌周囲間質の大部分が染色され、糖尿病合併患者であるか否かで差を見い出すことは難しいと思われた。そこで、腫瘍周囲に存在する PanIN に注目した。PanIN を含む部分を α -SMA で染色し、その周囲の陽性部分の距離を測定し比較検討した。その結果、長期 T2DM 合併膵管癌患者の PanIN 周囲の α -SMA 陽性部分の距離は、

非糖尿病膵管癌患者のそれと比べて有意に増大していた。

糖尿病モデルマウスの PSCs は活性化している

糖尿病状態の膵臓では PSCs が活性化しているかどうかを検討するために、糖尿病モデルマウスである db/db マウスを用いて PSCs の活性化を qPCR で観察した。db/db マウスから単離、培養した PSCs では野生型マウスの PSCs と比べて、TGF 1、SMA、Collagen 1A1 の RNA 発現は有意に上昇していた。また、RAGE の発現も有意に上昇していた。

終末糖化産物 (AGEs) は PSCs を活性化させる

野生型マウスから PSCs を単離、培養し AGEs による刺激実験を行った。AGEs の濃度を一定として、時間経過による PSCs の活性化を qPCR で観察した。IL-6、TGF 1、SMA、Collagen 1A1 の RNA 発現は刺激前と比べて有意に上昇した。次に AGEs の濃度を変えて刺激した時の PSCs の活性化を qPCR で観察したところ、ある一定の濃度以上になると PSCs の活性化が低下してくることが明らかとなった。AGEs の作用を確認するために、RAGE をノックアウトしたマウスからも同様に PSCs を単離、培養し AGEs による刺激を行い、活性化を qPCR で観察した。その結果、いずれの項目でも有意な発現の上昇は認めなかった。

次に野生型マウスと RAGE ノックアウトマウスにそれぞれ高脂肪食を 8 週間投与し、経口ブドウ糖負荷試験 (2g/kg) を行ったところ、野生型マウスに通常の餌を与えた群 (W - ND 群) と RAGE ノックアウトマウスに通常の餌を与えた群 (RK - ND 群) には有意な差は認めなかったが、野生型マウスに高脂肪食を与えた群 (W - HFD 群) は W - ND 群と比べてブドウ糖投与後 30 分と 60 分の血糖値が有意に上昇していた。また W - HFD 群と同様に RAGE ノックアウトマウスに高脂肪食を投与した群 (RK - HFD 群) は、RK - ND 群に比べてブドウ糖投与後 30 分と 60 分の血糖値が有意に上昇していた。これらのマウスから PSCs を単離、培養し活性化を PCR を用いて解析した。PCR の結果は、W - ND 群から単離した PSCs と RK - ND 群から単離した PSCs では、TGF 1、SMA、Collagen 1A1 の発現に有意な差は認めなかった。W - ND 群から単離した PSCs は W - HFD 群から単離した PSCs に比べて、TGF 1、SMA、collagen 1A1 の RNA 発現が有意に上昇していた。RK - ND 群から単離した PSCs と RK - HFD 群から単離した PSCs では、TGF 1、SMA、Collagen 1A1 の発現に有意な差は認めなかった。

上述の結果から T2DM は膵星細胞を介して PDC 周囲間質の線維化を進め、それが予後の悪化につながっている可能性が示唆された。期間内に PDC の新規治療法の開発までの発展には至らなかったが、本研究の成果を基に研究を継続させていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田 知顕
2. 発表標題 2型糖尿病が膵星細胞を介して膵管癌に与える影響の検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 知顕
2. 発表標題 2型糖尿病が膵星細胞を介して膵管癌の間質線維化に与える影響の検討
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 知顕
2. 発表標題 抄録タイトルAGEs-RAGE経路を介して2型糖尿病が膵管癌に与える影響の検討
3. 学会等名 第36回日本胆膵病態・生理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 知顕
2. 発表標題 2型糖尿病が膵星細胞を介して膵管癌に与える影響の検討
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019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
研究協力者	水上 浩哉 (Mizukami Hiroki)		
研究協力者	梅津 誠子 (Umetsu Satoko)		
研究協力者	齋藤 傑 (Saitou Takeshi)		
研究協力者	井川 明子 (Igawa Akiko)		
研究協力者	遅野井 祥 (Osonoi Sho)		
研究協力者	高橋 和久 (Takahashi Kazuhisa)		
研究協力者	工藤 和洋 (Kudou Kazuhiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	板橋 智映子 (Itabashi Chieko)		
研究 協力 者	八木橋 操六 (Yagihashi Souroku)		
研究 協力 者	袴田 健一 (Hakamada Kenichi)		