

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16323

研究課題名（和文）糖代謝・転写因子KLF4/FOXM1を標的とした膵癌の新規治療法の基盤的研究

研究課題名（英文）Fundamental research on novel therapies for pancreatic cancer targeting glucose metabolism and transcription factor KLF4/FOXM1

研究代表者

及能 拓朗（Kyuno, Takuro）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20722458

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌は浸潤・転移の際に細胞形態を変える上皮間葉移行(EMT)の過程を経ており、EMTの制御は予後を改善する可能性がある。膵癌ではEMT誘導因子snailが細胞間結合因子claudin-1を減少させてEMTを促進する。一方、転写因子FOXM1はあらゆる癌で悪性化に関与しており、FOXM1とEMTの関係の解析が、膵癌のEMTの機序解明や治療法開発につながる可能性が考えられた。

本研究では、膵癌細胞でFOXM1を抑制すると、snailの抑制、claudin-1の高発現がみられた。膵癌細胞を低糖濃度培養するとFOXM1は発現低下しており、細胞内糖代謝の制御により膵癌のEMTが抑制され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

膵癌は化学療法・放射線治療などの集学的治療の発展により、個々の症例では手術可能となる症例が増えている。しかし、日本では5年生存率が7.7%と依然として予後が極めて悪い難治性癌であり、新たなメカニズムを介した治療法の開発が急務である。

本研究では、細胞内代謝、特に糖代謝の観点から膵癌の転写因子を抑制すると、膵癌の悪性化の指標である上皮間葉移行(EMT)を制御できた。この結果より、実臨床において糖代謝のコントロールによって膵癌の発癌予防や浸潤・転移などの悪性化の抑制につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer undergoes an epithelial-mesenchymal transition (EMT) process that alters cell morphology during invasion and metastasis, and regulation of EMT may improve prognosis. In pancreatic cancer, the EMT-inducing factor snail promotes EMT by decreasing the intercellular binding factor claudin-1. On the other hand, the transcription factor FOXM1 is involved in malignant transformation in all cancers, and analysis of the relationship between FOXM1 and EMT could lead to elucidation of the mechanism of EMT in pancreatic cancer and development of therapeutic strategies.

In the present study, suppression of FOXM1 in pancreatic cancer cells resulted in downregulation of snail and enhanced expression of claudin-1. When pancreatic cancer cells were cultured with low glucose concentration, FOXM1 expression was decreased, suggesting that EMT of pancreatic cancer is suppressed by the regulation of intracellular glucose metabolism.

研究分野：消化器癌

キーワード：膵癌 EMT タイト結合 FOXM1 snail claudin-1 低濃度グルコース培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌に対しては集学的治療の発展により、個々の症例では手術可能となる症例が増えているが、日本では5年生存率7.7%と依然として予後は悪い難治性癌であり、新たなメカニズムを介した治療法の開発が急務である。

各癌種で確認される上皮間葉移行(epithelial-to-mesenchymal transition; EMT)は、上皮細胞が細胞間の接着機能を失い、遊走能や浸潤能のある間葉系の形質を獲得するプロセスであり、膵癌の悪性化を考える上で重要な現象である。

EMTでは細胞間接着装置の一つであるタイト結合分子の発現異常がみられる。膵癌においてはEMT誘導因子であるsnailがタイト結合分子claudin-1の発現を低下させてEMTを促進することが報告されているため、claudin-1はEMTの上皮マーカーとして非常に有用と考えられる。

転写因子FOXファミリーの一つあるForkhead Box M1 (FOXM1)は、膵癌を含むあらゆる癌種で過剰発現しており、癌の細胞周期調節やWarburg効果、浸潤や転移に関与し、EMTを促進して癌の悪性化に寄与するため注目されているが、正常組織では胸腺を除いてほぼ発現がないのが特徴で良い標的分子と考えられる。膵癌におけるFOXM1とEMTの関係を調べることで膵癌のEMTの機序解明や新たな治療法につながる可能性が考えられる。

一方、肝癌細胞株において低グルコース濃度培養がEMTを抑制するとの報告があるが、糖代謝に関わる臓器である膵臓でのEMTに対する影響は報告されておらず、糖代謝の観点からも膵癌におけるEMTの抑制効果が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌におけるFOXM1の発現調節によるEMTへの影響を、タイト結合分子claudin-1の変化を指標に解析することである。また細胞内糖代謝に注目してFOXM1の役割や制御についても解析した。これにより新たな膵癌の治療法開発への基盤となる可能性がある。

3. 研究の方法

(1)正常膵、膵癌組織、高分化型膵癌細胞株HPAC/低分化型膵癌細胞株PANC-1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)導入ヒト正常膵管上皮細胞(HPDE)におけるFOXM1、snail、claudin-1の発現を調べた。

(2)siRNA処置によるFOXM1の抑制、およびEMTの抑制効果が報告されている低グルコース濃度培養(1000mg/L; 0.1%)を行い、

細胞内シグナルの変化

EMTおよびタイト結合の調節機構

細胞遊走能の変化

ミトコンドリア代謝量の変化

を解析した。

4. 研究成果

(1)免疫染色では正常膵組織においてFOXM1の発現はみられず、claudin-1は細胞膜に高発現していた。一方、膵癌組織でFOXM1は核に高発現しており、claudin-1は発現量が低下されていた。Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)/Western blotting(WB)では、免疫染色と同様に、膵癌細胞株(HPAC/PANC-1)でFOXM1およびsnailは高発現し、claudin-1は発現抑制がみられた。

(2)低グルコース濃度培養したHPACにおいてDNAマイクロアレイによる遺伝子解析を行ったところ、通常の糖濃度培養(4500mg/L; 0.45%)と比べてFOXM1のmRNA量は著しく低下し、claudin-1の発現量は増加した。この結果をWBで確認すると、FOXM1/snailは発現が低下し、claudin-1は発現が増強した。またsiRNAを用いてHPAC/PANC-1のFOXM1を直接抑制すると、snailは発現抑制され、claudin-1は高発現した。一方、hTERT-HPDEにおいてtransfectionによりFOXM1を強制発現させると(正常膵細胞の癌化誘導モデル)、snailは高発現し、claudin-1は発現抑制された。以上より、FOXM1はsnailを調節して、その結果claudin-1を制御することが示唆された。

(2)EMTの実際として細胞遊走能を調べた。HPACにおいて低グルコース濃度培養およびsiRNA-FOXM1によりFOXM1を抑制すると、細胞単層の間隙は有意に長くなり、細胞遊走能は低下した。

(2)細胞外フラックスアナライザーを用いてHPAC/PANC-1におけるミトコンドリア代謝量を測定した。低グルコース濃度培養およびsiRNA処置によりFOXM1を抑制すると、膵癌細胞株の基礎呼吸量/ATP産生量/最大呼吸量/予備呼吸能はともにコントロール群よりも上昇した。これはFOXM1抑制によりミトコンドリア代謝量(好気呼吸量)が増加したことを意味し、FOXM1とWarburg効果の関連を示唆する結果となった。

以上の結果を総括すると、低グルコース濃度培養およびsiRNA処置によりFOXM1を抑制すると、snailの抑制、claudin-1の増加がみられ、細胞遊走能の低下やEMTの抑制を認めた。また、FOXM1

の抑制によりミトコンドリア代謝量は増加した。

糖尿病と発癌の関係はよく知られており、高血糖状態は全癌種の発癌リスクが上昇し、予後も悪化することが報告されている。つまり、糖代謝異常と膵癌の発癌や進展との関係が示唆され、本研究では糖のコントロールが癌の抑制を可能にするかもしれないことを示した。

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 Kyuno Takuro, Kohno Takayuki, Konno Takumi, Yamaguchi Hiroshi, Kyuno Daisuke, Imamura Masafumi, Kimura Yasutoshi, Kojima Takashi, Takemasa Ichiro	4. 巻 49
2. 論文標題 Glucose-Dependent FOXM1 Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition Via Cellular Metabolism and Targeting Snail in Human Pancreatic Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 273 ~ 280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000001485	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Glucose-dependent FOXM1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition via cellular metabolism and targeting snail in human pancreatic cancer
2. 発表標題 Takuro Kyuno, Hiroshi Yamaguchi, Masafumi Imamura, Yasutoshi Kimura, Takumi Konno, Takayuki Kouno, Takashi Kojima, Ichiro Takemasa
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 及能拓朗、金野匠、幸野貴之、山口洋志、今村将史、木村康利、竹政伊知朗、小島隆
2. 発表標題 糖代謝・転写因子FOXM1を標的とした膵癌の新規治療法の基盤的研究
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuro Kyuno
2. 発表標題 The role of transcriptional factors FOXM1/KLF4 in glucose metabolism during EMT of pancreatic cancer
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuro Kyuno
2. 発表標題 The role of transcriptional factors FOXM1/KLF4 in glucose metabolism during EMT of pancreatic cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 及能拓朗
2. 発表標題 糖代謝・転写因子FOXM1を標的とした膵癌の新規治療法の基盤的研究
3. 学会等名 第118回北海道癌談話会例会
4. 発表年 2018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
---------	---------