

令和 3 年 4 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19546

研究課題名（和文）単一細胞解析技術と革新的マウスモデルを用いた膵癌転移機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of pancreatic cancer metastasis using single cell analysis technology and innovative mouse models

研究代表者

竹原 徹郎（Takehara, Tetsuo）

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は膵臓がんを対象とし、単一細胞での網羅的遺伝子発現解析技術を用いたヒト膵がん臨床試料の解析と、ゲノム編集技術による革新的膵がんマウスモデルを用いた基礎的研究により、膵癌転移の分子基盤を解明することを目的とした。遺伝子改変マウスとエレクトロポレーション技術の融合によりKrasやTp53などのがん遺伝子の活性化・不活性化を膵特異的かつ時間依存的に誘導することで膵がんを発症するマウスモデルの樹立に成功した。また、膵癌患者の原発組織・肝転移組織を用いてシングルセル遺伝子発現解析を行い、転移巣のがん細胞におけるHLA分子の発現低下が、免疫監視機構からの逃避・転移促進に寄与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんは非常に難治であり、原発巣が非常に小さな腫瘍の段階から高率に肝臓などの多臓器へ転移し、進展する。転移を伴う膵癌の予後は極めて不良であり、その予後改善には転移の分子基盤や転移抑制を目指した治療開発が極めて重要である。本研究により膵癌細胞が免疫機構からの逃避を促進することで転移が促されるといいう新たな分子基盤を見出しており、転移抑制を目指した治療開発において極めて重要な結果であると考えられる。また、今後見出した分子の治療標的としての有用性を生体モデルで検討するための基盤となるマウスモデルの樹立が出来た点も今後の研究発展や臨床への展開に重要な意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the molecular basis of pancreatic cancer metastasis by analyzing clinical samples of human pancreatic cancer using comprehensive gene expression analysis technology in single cells and basic research using an innovative mouse model of pancreatic cancer based on genome editing technology. We have succeeded in establishing a mouse model that develops pancreatic cancer by inducing activation and inactivation of oncogenes such as Kras and Tp53 in a pancreas-specific and time-dependent manner through the fusion of gene-edited mice and electroporation technology. We also conducted single-cell gene expression analysis using primary tissues and liver metastasis tissues of pancreatic cancer patients, and found that down-regulation of HLA molecules in cancer cells at metastasis sites may contribute to escape from immune surveillance mechanisms and promote metastasis.

研究分野：消化器内科

キーワード：膵癌 肝転移 免疫逃避 HLA シングルセル解析 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

膵癌は自覚症状が乏しい為早期診断が困難であり、転移能が高いことから、その5年生存率はわずかに約8%と著しく予後不良である。この高い死亡率の改善には、膵がん転移分子基盤の解明が非常に重要である。近年、膵がん転移巣においては特異的なゲノム異常は認められず、エピゲノムのリプログラミングが生じていることから、癌細胞内でのトランスクリプトームの変化が転移に重要である可能性が一流誌に複数報告された(McDonald OG, Nat Genet 2017, Kugel S, Cell 2016)。そこで我々は転移を有する膵がん患者のがん組織を用いて、転移に寄与した遺伝子発現変化の同定を試みた。しかし、膵がんは間質細胞が極めて豊富なため、がん組織全体から採取したRNAには非がん細胞成分が多量に存在し、膵癌細胞のみの遺伝子発現変化を検討することが困難であった。その結果、実際の遺伝子の変化が転移のドライバーとして働いているのかは不明であった。また、これまで膵がん原発巣と転移巣の膵癌細胞における網羅的な遺伝子発現解析の報告もなく、既存の方法では実現困難であると考えられた。一方近年、個々の細胞レベルでの分子動態を検討する目的で単一細胞解析技術が開発され、多数の細胞の網羅的な遺伝子発現解析を一度に行えるまでその技術は進歩を遂げてきた。また、Tiroshらは悪性黒色腫検体を用いて単一細胞解析を行い、がん組織中に存在する各細胞集団の分離・同定に成功した(Tirosh I et al., Science 2016)。しかし、膵癌の原発巣・転移巣においてこの技術を用いた報告は未だ存在しなかった。

また、膵がん転移に関与する遺伝子の機能解析を行うに当たり、これまでの転移の制御機構に関する検討手法はいずれも問題点が多いと考えられた。*In vitro*での遊走能や浸潤能等の形質の評価は、それだけでは転移の一側面のみを検討で不十分である。また、癌細胞株の免疫不全マウスへの移植モデルは、癌免疫の欠如や異種の微小環境等の問題がある。遺伝子改変マウスは有用な手法であるが、検討する遺伝子其々に対してマウスを作製するのは時間や多大な労力が必要となる。一方、近年マウス生体で直接ゲノム編集を行う技術が報告された(Xue W, Nature 2014)が、膵癌の転移に関する遺伝子の解析においてこの技術を用いられた報告は存在しなかった。

2. 研究の目的

本研究は転移能が高く極めて予後不良な膵臓がんを対象とし、単一細胞での網羅的遺伝子発現解析技術を用いたヒト膵がん臨床試料の解析により転移を制御する遺伝子を探索すること、そして生体内での遺伝子改変を可能とする膵がんマウスモデルを樹立して探索した遺伝子の機能解析をすることを通じて、膵がん転移の分子基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

A) ヒト膵がん臨床試料を用いた単一細胞網羅的遺伝子発現解析

膵がん患者の原発巣並びに肝転移巣から吸引針生検によりがん組織を採取し、其々単一細胞での網羅的遺伝子発現解析を行った。BD社のRhapsodyを利用して約5000-10000細胞からRNAシーケンス用のライブラリー調整を行った。Illumina社のHiSeq4000を用いてシーケンス解読し、主成分分析により癌細胞集団と非癌細胞集団の同定を行った。膵癌細胞集団内での網羅的な遺伝子発現情報を原発巣と転移巣間で比較し、転移巣において有意に発現上昇・低下を生じる遺伝子を、膵がん転移に関与する遺伝子候補として其々同定した。

B) 生体内ゲノム編集による新たなマウスモデルの樹立

ヒト膵がんの主要な癌遺伝子である Kras の恒常的活性化変異に加えて p53 を片方のアリルのみ欠損させたマウスは膵がんのモデルマウスとして用いられている。このマウスモデルに対して、任意の遺伝子を標的とした CRISPR/Cas を膵内に導入することで、任意の遺伝子が膵がんや転移に与える影響を解析できるモデルの樹立を目指した。膵へのプラスミド導入法として、レンチウイルスの膵管内逆行性注入法とエレクトロポレーション法を試みた。これらの手法を用いて膵で任意の時期に遺伝子改変を誘導することで、内在性の膵がんを発症するマウスを作成できるか検証した。

4. 研究成果

A) ヒト膵がん臨床試料を用いた単一細胞網羅的遺伝子発現解析 (図 1)

膵癌患者での原発巣並びに転移巣から、吸引針生検 (FNA) により癌細胞を含んだ癌組織を採取した。これらの癌組織を氷上で研究室へ輸送し、メスにて細断後、コラゲナーゼなどのタンパク質分解酵素を用いて 37℃ で浸透培養を行い、単一細胞を採取した。得られた単一細胞の生存率が不良であったために、サンプル採取後の輸送時間の短縮、タンパク質分解酵素の濃度調整、浸透培養時間をそれぞれ検討し、最終的に約 10 万個の細胞を約 80% の生存率で得られる条件を同定した。2 万個の単一細胞を用いて、BD Rhapsody シングルセル解析システムにより、全トランスクリプトームシーケンス解析用のライブラリー調整を行い、シーケンスに適したライブラリーが作成できることを確認した。次に膵癌転移機構の解明を目指して、膵癌患者の原発組織・肝転移組織を用いて、上記の検討した条件によりシングルセル遺伝子発現解析を行った。tSNE 解析の結果、採取したがん組織中にごん細胞に加えて、多数の種々の免疫細胞集団を同定した。原発巣と転移巣の比較解析の結果、転移巣のがん細胞において HLA 分子の発現が低下し、免疫監視機構からの逃避が転移促進に寄与している可能性を見出した。また原発巣・転移巣においてがん微小環境における細胞集団の形質的な多様性が異なっていることも見出した。本検討により、腫瘍組織の Bulk 解析では解析が困難であった、癌細胞自身の免疫逃避機構の存在が明らかとなった。

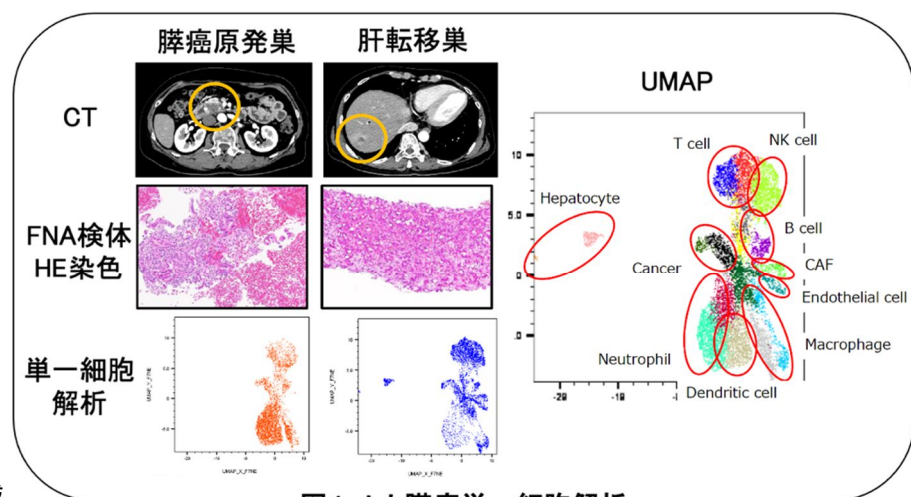


図1. ヒト膵癌単一細胞解析

B) 生体内ゲノム編集による新たなマウスモデルの樹立 (図 2) PDX1-Cre を用いて膵特異的に Kras 活性化 p53 ヘテロ欠損を生じるマウスを作成

したところ、約 3 ヶ月齢で膵に腫瘍形成を認めため、このモデルをプラットフォームとすることとした。次にエレクトロポレーションによる膵内へのプラスミド導入効率と膵組織に与える影響を検討するために、野生型マウスを用いて GFP 発現ベクターのエレクトロポレーションを施行した。既報に基づき、A) 1 0 0 v 3 回のパルスもしくは B) 5 0 v 2 回のパルスで施行したところ、導入 2 4 時間後に血清アミラーゼ値は A 群平均 4189IU/L、B 群で平均 2704IU/L、血清リパーゼ値は A 群で平均 166IU/L、B 群で平均

101IU/LとA群において高値であった。しかしいずれの群も導入72時間で血清アミラーゼ・リパーゼ値は導入前と同程度まで改善し、以降20日後までの経時的な検査において上昇を認めなかった。導入効率はA群において平均1.4%、B群において平均2.3%とB群で有意に導入効率は高値であった。次にレンチウイルスによる膵内へのプラスミド導入効率と膵組織に与える影響を検討するために、野生型マウスの膵管に逆行性に各種タイターでGFP発現ベクターレンチウイルスを注入し、導入効率をGFP発現量により検討した。ウイルス量を 10^5 、 10^6 、 10^7 の三段階で投与したところ、導入効率は其々平均2.5%、3.8%、6.4%であり、ウイルス量依存的に導入効率は増加した。また、逆行性膵管内導入法による遺伝子導入24時間後の血清アミラーゼ値は平均2880IU/L、血清リパーゼ値は平均16IU/Lであり、膵酵素の著明な上昇は認めなかった。次に、生体内で任意の時期に遺伝子改変を行う膵癌マウスモデルを樹立するため、エレクトロポレーションによる遺伝子導入法を用いて、Cre発現ベクターをKrasG12D/+;p53 fl/+マウスに導入し、Pdx1-Cre Tg/+; KrasG12D/+;p53 fl/+マウスで認めた膵発癌が再現されるかどうかについて検討を行った。Cre発現ベクターを導入したKrasG12D/+ ;p53 fl/+マウスを長期飼育し、CTによる画像観察を行ったところ、導入3.5ヶ月において膵尾部に5mm大の腫瘍形成を認め、2週間後には18mmまで増大した。解剖を行ったところ、膵尾部に結節形成を認めたが、明らかなマクロでの肝・肺転移は認めなかった。また、組織学的解析ではやや未分化な膵癌を呈していた。一方、野生型マウスにCre発現ベクターを導入した群では同様の腫瘍を全く認めなかった。発症した膵腫瘍の解析を行ったところ、非腫瘍部と比し、腫瘍部でERKのリン酸化亢進を認め、また腫瘍部においてp53 flox alleleの発現低下を認めたことから、Creの導入によりp53遺伝子のヘテロ欠損、Krasの活性化が生じ、膵癌が発症したと考えられた。以上から、エレクトロポレーション技術を用いることで、生体内で任意の時期にプラスミドを介して膵に遺伝子導入を行うことで、膵発癌を生じさせるマウスモデルの確立に成功した。

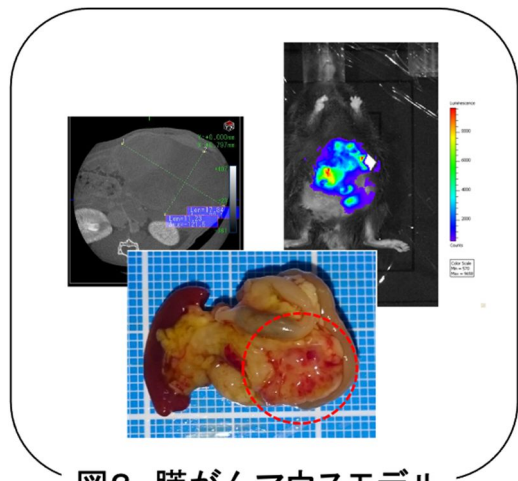


図2. 膵がんマウスモデル

以上から、本研究課題において、膵癌患者の原発組織・肝転移組織を用いてシングルセル遺伝子発現解析を行い、転移巣のがん細胞におけるHLA分子の発現低下が、免疫監視機構からの逃避・転移促進に寄与している可能性を見出した。また、遺伝子改変マウスとエレクトロポレーション技術の融合によりKrasやTp53などのがん遺伝子の活性化・不活性化を膵特異的かつ時間依存的に誘導することで膵がんを発症するマウスモデルの樹立に成功した。膵臓がんは非常に難治であり、原発巣が非常に小さな腫瘍の段階から高率に肝臓などの多臓器へ転移し、進展する。転移を伴う膵癌の予後は極めて不良であり、その予後改善には転移の分子基盤や転移抑制を目指した治療開発が極めて重要である。本研究により膵癌細胞が免疫機構からの逃避を促進することで転移が促されるといいう新たな分子基盤を見出しており、転移抑制を目指した治療開発において重要な結果であると考えられる。また、今後見出した分子の治療標的としての有用性を生体モデルで検討するための基盤となるマウスモデルの樹立が出来た点も今後の研究発展や臨床への展開に重要な意義があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Yoshioka Teppei, Shigekawa Minoru, Ikezawa Kenji, Tamura Takeshi, Sato Katsuhiko, Urabe Makiko, Sueyoshi Hironari, Yamai Takuo, Suda Takahiro, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 49
2. 論文標題 Risk Factors for Pancreatic Cancer and the Necessity of Long-Term Surveillance in Patients With Pancreatic Cystic Lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 552 ~ 560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001521	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 Sato Katsuhiko, Hikita Hayato, Myojin Yuta, Fukumoto Kenji, Murai Kazuhiro, Sakane Sadatsugu, Tamura Takeshi, Yamai Takuo, Nozaki Yasutoshi, Yoshioka Teppei, Kodama Takahiro, Shigekawa Minoru, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 15
2. 論文標題 Hyperglycemia enhances pancreatic cancer progression accompanied by elevations in phosphorylated STAT3 and MYC levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0235573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0235573	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 Ikezawa Kenji, Shigekawa Minoru, Yamai Takuo, Suda Takahiro, Kegasawa Tadashi, Yoshioka Teppei, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 in press
2. 論文標題 Endoscopic biliary stenting as the risk factor for cholangitis after endoscopic ultrasound in patients with biliary strictures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15264	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 Kegasawa Tadashi, Tatsumi Tomohide, Yoshioka Teppei, Suda Takahiro, Ikezawa Kenji, Nakabori Tasuku, Yamada Ryoko, Kodama Takahiro, Shigekawa Minoru, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Takehara Tetsuo	4. 巻 517
2. 論文標題 Soluble UL16-binding protein 2 is associated with a poor prognosis in pancreatic cancer patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 84 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.020	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 Kimura Hirokazu, Yamamoto Hideki, Harada Takeshi, Fumoto Katsumi, Osugi Yoshihito, Sada Ryota, Maehara Natsumi, Hikita Hayato, Mori Soichiro, Eguchi Hidetoshi, Ikawa Masahito, Takehara Tetsuo, Kikuchi Akira	4. 巻 25
2. 論文標題 CKAP4, a DKK1 Receptor, Is a Biomarker in Exosomes Derived from Pancreatic Cancer and a Molecular Target for Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1936 ~ 1947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-2124	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 Iwahashi Kiyoshi, Hikita Hayato, Makino Yuki, Shigekawa Minoru, Ikezawa Kenji, Yoshioka Teppei, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 503
2. 論文標題 Autophagy impairment in pancreatic acinar cells causes zymogen granule accumulation and pancreatitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 2576 ~ 2582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.07.018	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岡部純弥、小玉尚宏、竹原徹郎
2. 発表標題 炎症制御分子Regnase-1を介した膵癌発症機構の解明
3. 学会等名 JDDW2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清田良介、重川 稔、吉岡鉄平、竹原徹郎
2. 発表標題 膵多血性腫瘍に対するEUS-FNAの工夫
3. 学会等名 第105回日本内視鏡学会近畿支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重川 稔、吉岡鉄平、竹原徹郎
2. 発表標題 長期経過観察例からみる自己免疫性膵炎の課題
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村猛、小玉尚宏、吉岡鉄平、重川稔、疋田隼人、阪森亮太郎、秋田裕史、江口英利、巽智秀、竹原徹郎
2. 発表標題 慢性膵炎におけるHippo/PI3K経路の調節不全と治療標的としての可能性
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野崎 泰俊、疋田 隼人、竹原 徹郎
2. 発表標題 がん特異的アミノ酸トランスポータを標的とした膵癌治療の可能性
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teppeï Yoshioka, Minoru Shigekawa, Yu Sato, Junya Okabe, Takeshi Tamura, Katsuhiko Sato, Makiko Urabe, Takuo Yamai, Takahiro Suda, Ryoko Yamada, Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi and Tetsuo Takehara
2. 発表標題 THE RELATIONSHIP BETWEEN OBSERVATION INTERVAL AND PROGNOSIS IN PANCREATIC CANCER ASSOCIATED WITH PANCREATIC CYSTIC LESIONS
3. 学会等名 Digestive Disease Week (DDW2019) (国際学会)
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 分担 者	小玉 尚宏 (Kodama Takahiro) (10623275)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

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
---------	---------