

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07690

研究課題名(和文)(プロ)レニン受容体を介した膵管癌の進化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Evolutionary mechanism of pancreatic ductal adenocarcinoma mediated by (pro) renin receptor

研究代表者

柴山 弓季 (Shibayama, Yuki)

香川大学・医学部・研究員

研究者番号：90401190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、プロレニン受容体(以下、(P)RR)安定発現ヒト膵管上皮細胞を用いて、膵管癌の進化パターンを明らかにすることである。継代数6における(P)RR安定発現ヒト膵管上皮細胞で核形態を評価したところ、癌の悪性度が高くなるほど生じるとされる多核化を認めるとともに、染色体異常も確認した。この結果は、ヒト全ゲノム解析においても支持されたが、継代数6ではKRASやp16といった膵管癌のドライバー遺伝子の変異は認められなかった。一方で、継代数20における(P)RR安定発現ヒト膵管上皮細胞では、KRAS、P16遺伝子の変異が認められ、染色体構造変異の存在が膵管癌の悪性化に寄与する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：大規模な染色体構造変異および体細胞突然変異を包含する(P)RR安定発現ヒト膵管上皮細胞を用いて、ヒト膵管癌の進化パターンを前向きに検討した結果、膵管癌を代表するドライバー遺伝子KRASおよびp16の体細胞突然変異を生じるだけでなく、膵管癌の悪性化のスピードを促進する“断続的進化”の存在を示唆した。社会的意義：(P)RRは膵管癌を直接的に形成する因子であることが判明したことから、創薬において極めて重要な分子ターゲットになることが考えられた。

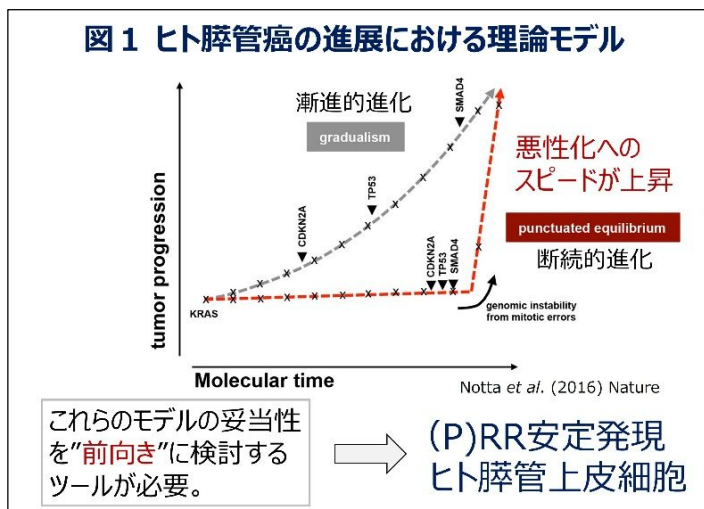
研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the evolutionary pattern of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) using prorenin receptor [(P)RR]-expressing human pancreatic ductal epithelial cells. The nuclear morphology of (P)RR-expressing human pancreatic ductal epithelial cells in passage 6 showed multinucleation, which is considered to occur as the malignancy of the cancer increases, and chromosomal aberrations were also identified. This result was supported by whole human genome analysis, which showed no mutations in driver genes of PDAC, such as KRAS and p16 in (P)RR-expressing human pancreatic ductal epithelial cells at passage 6. On the other hand, mutations in the KRAS and p16 genes were observed in (P)RR-expressing human pancreatic ductal epithelial cells at passage 20, suggesting that the presence of chromosomal aberrations may contribute to malignant transformation of PDAC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：(プロ)レニン受容体 膵管癌 ゲノム不安定性 ドライバー遺伝子

1. 研究開始当初の背景

膵管癌の進化メカニズムには、KRASやp53といったドライバー変異が段階的に挿入される漸進的進化 "gradualism" (Hruban *et al.* 2000:文献) および、昨今のゲノム解析技術の向上の結果、新たに見出されたクロモソリプシスと呼ばれる染色体破砕 (Stephens *et al.* 2011:文献) などの染色体構造変異が生じた結果、悪性化へのスピードが上昇する断続的進化 "punctuated" (Notta *et al.* 2016:文献) という2つのモデルが提唱されている(図1)。ヒトの癌組織を用いたゲノム解析は、後ろ向きな検討によって得られた結果であり、結果そのものは進化的帰結を意味する。膵管癌の進化モデルを検証するためには、染色体レベルから体細胞突然変異に至るまで前向きに検討するための細胞ツールが必要であり、国内外を見渡してもこれまでに報告がなされていない。



2. 研究の目的

膵管癌の発生母地であるヒト膵管上皮細胞に(プロ)レニン受容体[以下、(P)RR]を安定発現させて、ヒトの膵管癌組織の全ゲノム解析から提唱された2つの進化メカニズムを検証することを目的にした。

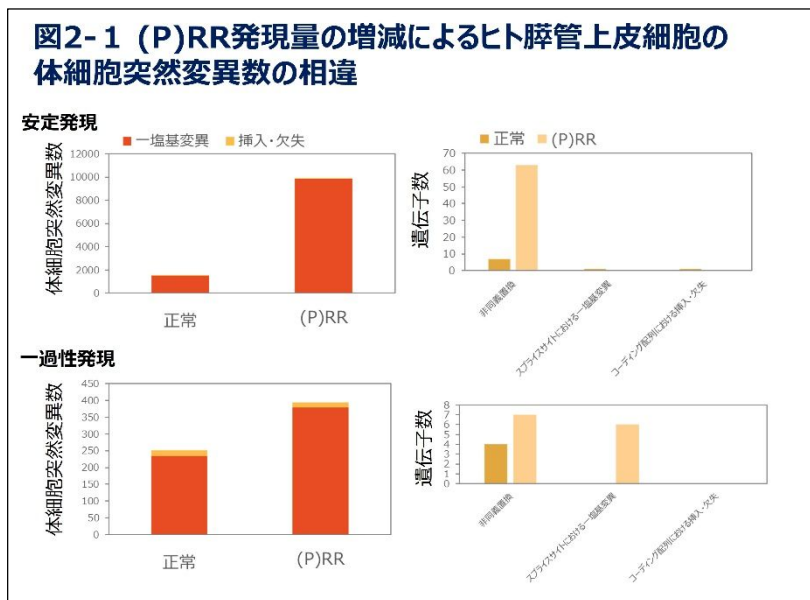
3. 研究の方法

- (1) (P)RR 安定発現ヒト膵管上皮細胞 (HPDE-1/E6E7) および (P)RR 一過性発現ヒト膵管上皮細胞 (HPDE-1/E6E7) のヒト全ゲノム解析を実施した。
  - (2) パパニコウ染色によって継代数\*6の由来の異なる (P)RR 安定発現ヒト膵管上皮細胞 (HPDE-1/E6E7, HPDE-6/E6E7) を用いて染色体異常を含む核形態を定量的に評価した。
  - (3) 継代数6および継代数20の (P)RR 安定発現ヒト膵管上皮細胞 (HPDE-1/E6E7) を用いてサンガーDNAシーケンスによって、ヒト膵管癌のドライバー遺伝子である KRAS, p53, p16, SMAD4 の体細胞突然変異の有無について評価した。
- \*細胞の植え継ぎ数。

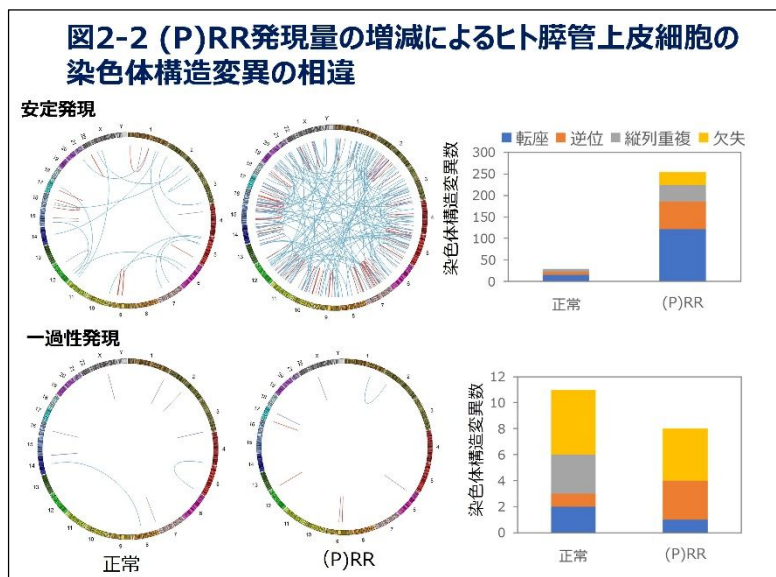
4. 研究成果

(1) (P)RR 発現量の増減によるヒト膵管上皮細胞のゲノム不安定性の相違 (図2)

(P)RR 発現量によるゲノム不安定性の相違を調べるために、(P)RR を安定発現および一過性発現させたヒト膵管上皮細胞 (HPDE-1/E6E7) を用いて、ヒト全ゲノム解析を実施した。(P)RR 安定発現細胞は、(P)RR 一過性発現細胞と比較して体細胞突然変異数および染色体構造変異数の顕著な増大を認めた(図2)。このことは、ヒト膵管上皮細胞における (P)RR 発現レベルがゲノム不安定性の増減に影響を与えることを意

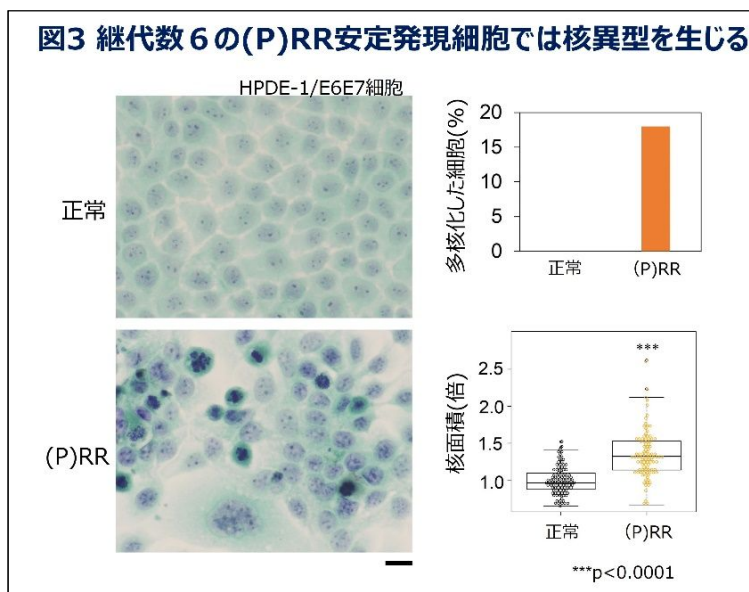


味する。また、(P)RR 安定発現細胞では、非同義置換を生じた遺伝子が 63 個同定され (図 2-1)、また染色体構造変異では、トータルで 254 個 (転座: 122, 逆位: 63, 縦列重複: 39, 欠失: 30) 同定された (図 2-2)。(P)RR 安定発現によって、癌のドライバー遺伝子を格納したデータベース COSMIC に記載されている 4 つの体細胞突然変異 (*FGFR3*, *MLL3*, *BRIP6*, *MSH6*) および 5 つの染色体構造変異 (*PDE4DIP*, *THRAP3*, *FANCD2*, *MDS1*, *CBL*) を認めた。これらの研究成果は、Shibayama *et al.* (2020) *Commun. Biol.* (文献) に掲載されている。



**(2) 継代数 6 の(P)RR 安定発現細胞では核異型を生じる(図 3)**

2 種類の (P)RR 安定発現ヒト膀胱上皮細胞 (HPDE-1/E6E7, HPDE-6/E6E7) の継代数 6 の細胞集団において、癌の病理診断に扱われるパピニコウ染色によって核形態を定量的に評価した。(P)RR 発現が増大することによって、癌の悪性度が高くなるほど生じるとされる多核化や核の巨大化といった形態が顕著に見受けられた (図 3)。さらに核面積が (P)RR を過剰発現させていない正常細胞集団と比較して有意に多様化することが



判明した。また、テロメア長の短小化に伴う染色体の融合や切断といった染色体異常も認められた。このデータは、ヒト全ゲノム解析のデータによっても支持されている (図 2)。これらの研究成果は、Shibayama *et al.* (2020) *Commun. Biol.* (文献) に掲載されている。

**(3) 継代数 20 の(P)RR 安定発現細胞では KRAS および p16 に体細胞突然変異が生じる(図 4)**

継代数 6 および継代数 20 における (P)RR 安定発現ヒト膀胱上皮細胞 (HPDE-1/E6E7) を用いて、サンガー DNA シーケンス法によって、ヒト膀胱癌のドライバー遺伝子 *KRAS*, *p53*, *p16*, *SMAD4* の体細胞突然変異の有無について調べた。継代数 6 では、4 つのドライバー遺伝子全てにおいて体細胞突然変異の存在を認めなかった一方で、継代数 20 では *KRAS* や *p16* において体細胞突然変異の存在が認められた。また、継代数 6 と同様に *p53*, *SMAD4* においては体細胞突然変異の存在は認められなかった。以下、*KRAS* および *p16* の変異の詳細について記述する。

(3)- **KRAS** (図 4-1)  
 膵管癌患者の 90% 以上で確認されている *KRAS* codon 12 (G12D) の体細胞突然変異は認められなかった一方で(図 4-1- ), *KRAS* exon1 領域で複数の塩基置換の存在を認めた。そのなかには、アミノ酸の置換を伴う 9 個の非同義置換も含まれた(図 4-1- )。また、ヒトの膵管癌組織の体細胞突然変異および染色体構造変異を解析した Notta *et al.* (2016) においても *KRAS* の非同義置換の変異の存在を認めており、(P)RR 安定発現によって生じた *KRAS* の変異パターンとヒトの膵管癌組織で得られたパターンが一致した。

図4-1-① 継代数20の(P)RR安定発現細胞では*KRAS*に体細胞突然変異が生じる

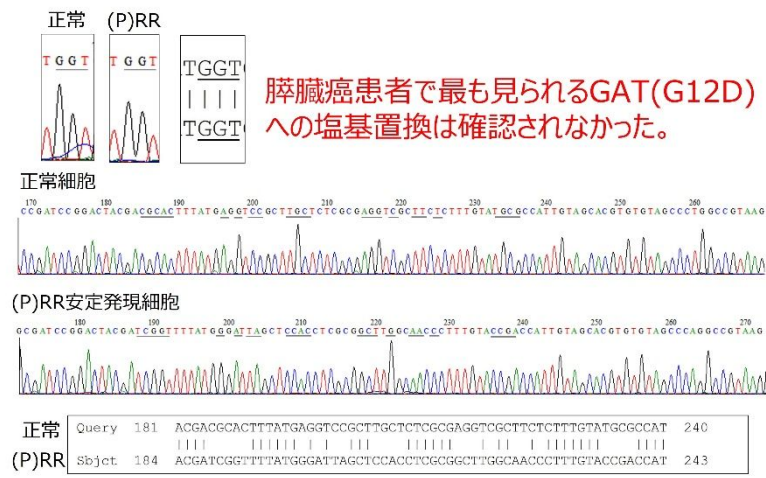
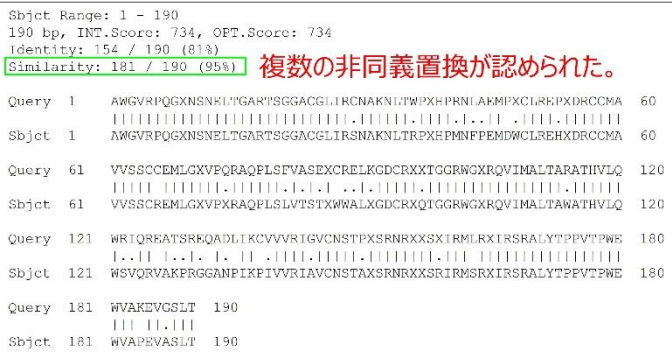


図4-1-② 継代数20の(P)RR安定発現細胞では*KRAS*に体細胞突然変異が生じる

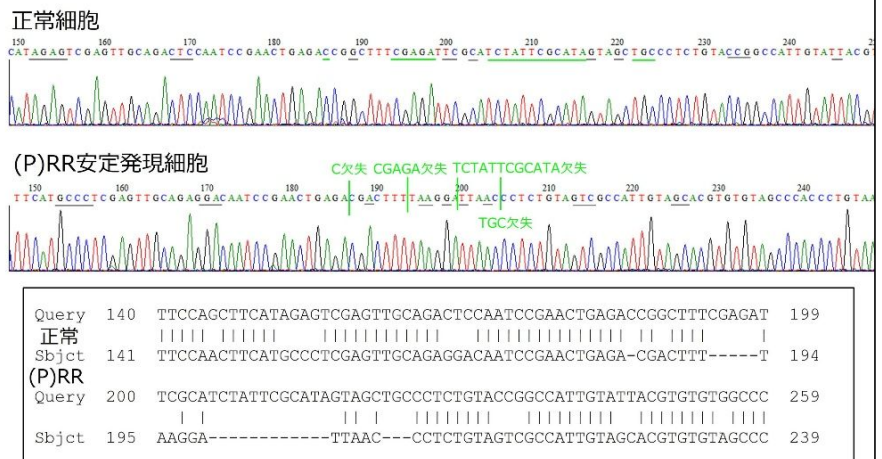


ドライバー遺伝子	ヒト膵管癌組織における変異パターン Notta <i>et al.</i> (2016)
<i>KRAS</i> exon1	nonsynonymous-SNV

ヒトの膵管癌組織と*ATP6ap2*/(P)RR過剰発現ヒト膵管上皮細胞(P20)における *KRAS* の変異パターンが一致した。

(3)- **p16** (図 4-2)  
 がん抑制遺伝子と知られている *p16* exon1 領域の複数箇所において塩基置換および欠失を確認した(図 4-2- )。アミノ酸配列でのアノテーションの結果、非同義置換のほか欠失が生じた結果、三つ組みの読み枠がずれて起こるフレームシフト変異が検出された(図 4-2- )。これらの変異パターンは、ヒトの膵管癌組織においても検出されており、*KRAS* と同様に *p16* についてもヒト膵管癌組織と変異パターンが一致した。

図4-2-① 継代数20の(P)RR安定発現細胞では*p16*に体細胞突然変異が生じる

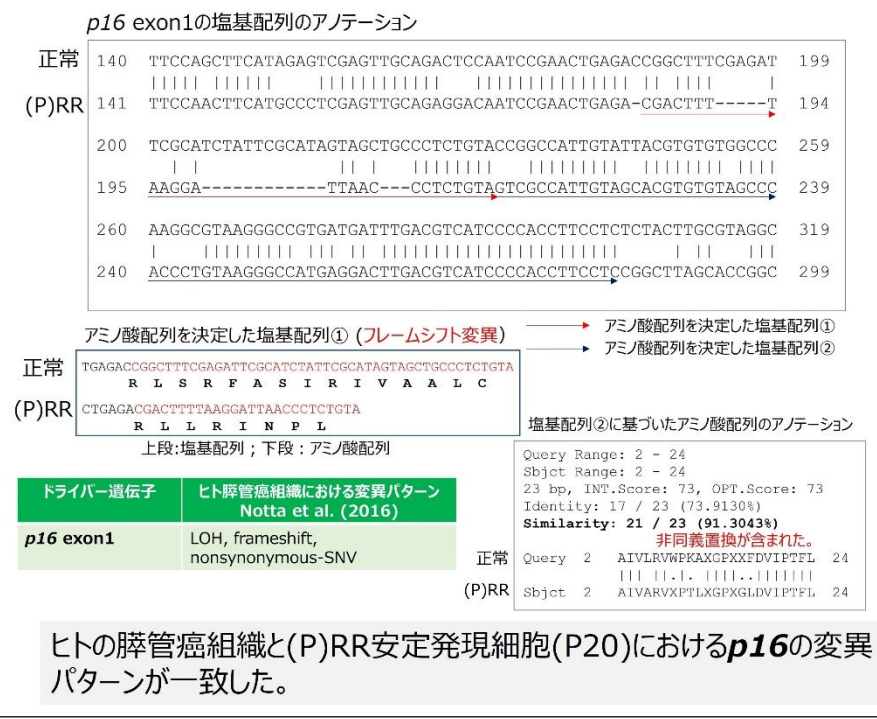


塩基置換および欠失が確認された。

これらの研究成果は、第44回日本分子生物学会”ATP6ap2/(P)RR過剰発現ヒト膵管上皮細胞を用いた膵管癌の進化モデルの検討“というタイトルでポスター発表を実施した(オンライン)。

以上の結果より、(P)RR安定発現ヒト膵管上皮細胞において膵管癌の代表的な体細胞突然変異(*KRAS*, *p53*, *p16*, *SMAD4*)が生じる以前に大規模な染色体構造変異が存在することが判明した。今後、体細胞突然変異が認められた *KRAS*, *p16* が位置する染色体構造を明らかにする必要があるが、これらのデータに基づけば、ヒト膵管癌の進化において“断続的進化”の存在を大きく示唆する。さらに、(P)RRは膵管癌を直接的に形成する因子であることから、創薬において極めて重要な分子ターゲットになることがいえよう。

### 図4-2-② 継代数20の(P)RR安定発現細胞では*p16*に体細胞突然変異が生じる



#### <引用文献>

Hruban *et al.* (2000) Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol.* 156(6):1821-5.

Stephens *et al.* (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144(1):27-40.

Notta *et al.* (2016) A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature* 538(7625):378-382.

Shibayama *et al.* (2020) Aberrant (pro)renin receptor expression induces genomic instability in pancreatic ductal adenocarcinoma through upregulation of SMARCA5/SNF2H. *Commun Biol.* 3(1):724.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shibayama, Y., Takahashi, K., Yamaguchi, H., Yasuda, J., Yamazaki, D., Rahman, A., Fujimori, T., Fujisawa, Y., Takai, S., Furukawa, T., Nakagawa, T., Ohsaki, H., Kobara, H., Wong, J.H., Masaki, T., Yuzawa, Y., Kiyomoto, H., Yachida, S., Fujimoto, A., Nishiyama, A.	4. 巻 3
2. 論文標題 Aberrant (pro)renin receptor expression induces genomic instability in pancreatic ductal adenocarcinoma through upregulation of SMARCA5/SNF2H	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01434-x.	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 Asadur Rahman, Makoto Matsuyama, Akio Ebihara, Yuki Shibayama, Arif Ul Hasan, Hironori Nakagami, Fumiaki Suzuki, Jiao Sun, Tomoe Kobayashi, Hiroki Hayashi, Daisuke Nakano, Hideki Kobara, Tsutomu Masaki, Akira Nishiyama	4. 巻 19
2. 論文標題 Antiproliferative effects of monoclonal antibodies against (pro)renin receptor in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1844-1845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.mct-19-0228	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 Wang, J, Shibayama, Y, Zhang, A, Ohsaki, H, Asano, E, Suzuki, Y, Kushida, Y, Kobara, H, Kato, K, Wang, Z, Nishiyama, A	4. 巻 120
2. 論文標題 (Pro)renin receptor promotes colorectal cancer through the Wnt/beta-catenin signaling pathway despite constitutive pathway component mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br. J. Cancer	6. 最初と最後の頁 229 - 237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-018-0350-0	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11件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akira Nishiyama, Yuki Shibayama
2. 発表標題 Aberrant (pro)renin receptor expression induces genomic instability in pancreatic ductal adenocarcinoma through upregulation of SMARCA5/SNFH
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishiyama, A , Shibayama, Y
2. 発表標題 Aberrant (pro)renin receptor expression induces genomic instability by SMARCA5 disruption during the development of pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 Hypertension 2020 Scientific Sessions ( 国際学会 )
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 Molecular targeted therapy against (pro)renin receptor for glioblastoma
2. 発表標題 藤森健司, 小川大輔, 鈴木健太, 河内雅章, 柴山弓季, 岡田真樹, 三宅啓介, 西山 成, 田宮 隆
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rahman Asadur, 松山 誠, 海老原章郎, 柴山弓季, 鈴木文昭, 西山 成
2. 発表標題 Effects of monoclonal antibodies against (pro)renin receptor in pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Nishiyama, Makoto Matsuyama, Yuki Shibayama, Akio Ebihara, Asadur Rahman
2. 発表標題 Antiproliferative effects of monoclonal antibodies against (pro)renin receptor in pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 Hypertension 2019 Scientific Sessions ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤森健司, 小川大輔, 河内雅章, 柴山弓季, 岡田真樹, 三宅啓介, 西山 成, 田宮 隆
2. 発表標題 膠芽腫およびグリオーマ幹細胞に対する (Pro)renin receptorを標的とした分子治療の基礎的研究
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山 成, 柴山弓季
2. 発表標題 プロレニン受容体をターゲットとした膵癌治療法の開発
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴山弓季, 西山 成
2. 発表標題 (プロ)レニン受容体の発現亢進によって生じるゲノム不安定性
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴山弓季, 西山 成
2. 発表標題 ヒト膵管上皮細胞における(プロ)レニン受容体発現の亢進は、クロマチンリモデラー発現の増大を介してゲノム不安定性を生じる
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 鈴木健太, 藤森健司, 小川大輔, 菅田峻光, 柴山弓季, 西山成, 三宅啓介
2. 発表標題 膠芽腫に対する(Pro)renin receptorを標的とした分子治療の基礎的研究
3. 学会等名 第21回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴山弓季, 西山成
2. 発表標題 ATP6ap2/(P)RR過剰発現ヒト膵管上皮細胞を用いた膵管癌の進化モデルの検討
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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	高橋 和男  (Takahashi Kazuo)		
研究協力者	山口 央輝  (Yamaguchi Hisateru)		
研究協力者	安田 純  (Yasuda Jun)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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	山崎 大輔  (Yamazaki Daisuke)		
研究協力者	ラフマン アサダ  (Rahman Asadur)		
研究協力者	藤森 崇行  (Fujimori Takayuki)		
研究協力者	藤沢 良秀  (Fujisawa Yoshihide)		
研究協力者	高井 真司  (Takai Shinji)		
研究協力者	古川 徹  (Furukawa Toru)		
研究協力者	中川 寅  (Nakagawa Tsutomu)		
研究協力者	大崎 博之  (Ohsaki Hiroyuki)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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	小原 英幹  (Kobara Hideki)		
研究協力者	ワン ジン  (Wong Jing)		
研究協力者	正木 勉  (Masaki Tsutomu)		
研究協力者	湯澤 由紀夫  (Yuzawa Yukio)		
研究協力者	清元 秀泰  (Kiyomoto Hideyasu)		
研究協力者	谷内田 真一  (Yachida Shinichi)		
研究協力者	藤本 明洋  (Fujimoto Akihiro)		
研究協力者	西山 成  (Nishiyama Akira)		

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