

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16588

研究課題名（和文）膵星細胞はビタミンA欠乏で活性化し、膵がんで線維化を引き起こし悪性化にかかわる

研究課題名（英文）Pancreatic stellate cells are activated by vitamin A deficiency, causing fibrosis and malignant transformation in pancreatic cancer

研究代表者

小野 佑輔（Ono, Yusuke）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90812355

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）：膵癌手術材料を用いてCYP26A1の免疫組織化学的検討を行った。CYP26A1は間質の線維芽細胞ではなく、腺癌細胞に主に発現し、その発現は陰性から高度陽性まで様々であった。染色強度を膵癌の分化度毎に測定し、その発現態度と分化度に有意な関連が認められた。次に、CYP26A1発現欠損細胞株を樹立して解析を行った。CYP26A1の発現欠損でレチノイン酸投与により増殖能や遊走能が抑制された。これらの結果から、CYP26A1は一部の膵癌細胞で高発現し、レチノイン酸を不活化することで、悪性化に関与してい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

CYP26A1は今回の検討で主に癌細胞に発現しており、細胞株の検討で癌悪性化に関わることが示唆された。これは、癌細胞ではCYP26A1の発現によってレチノイン酸に対する感受性が低下しており、レチノイン酸の投与もしくはCYP26A1を標的とした治療につながる可能性のある結果である。また、癌組織中では、癌細胞に発現したCYP26A1が組織環境中のビタミンA欠乏を招き、星細胞を活性化して線維化の形成機序の一部を担っていることも考えられる。これらの新規の治療標的、戦略や病態理解は膵癌の極めて悪い予後を改善する可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：We performed an immunohistochemical study of CYP26A1 using pancreatic cancer surgical material. CYP26A1 was expressed predominantly in adenocarcinoma cells, but not in fibroblasts of the stroma. Its expression varied from negative to highly positive. We measured staining intensity at each differentiation level of pancreatic carcinoma. We found a significant association between expression status and differentiation level in adenocarcinoma. Next, we generated and analyzed CYP26A1 knockout cell lines using the CRISPR-Cas9 system. Defective expression of CYP26A1 suppressed proliferative and migratory ability upon retinoic acid treatment. These results suggest that CYP26A1 is highly expressed in some pancreatic cancer tissues and is involved in malignant transformation by inactivating retinoic acid.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵がん レチノイン酸 ビタミンA レチノイン酸代謝酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、病理医としてヒト膵癌手術材料の病理学的な解析をおこなう中で、膵癌では、他の癌腫とくらべて、極めて間質反応が強く、線維化が豊富におこなっていることに着目した。星細胞はビタミン A 貯蔵細胞であり、全身に分布する。星細胞の働きはビタミン A の活性体であるレチノイン酸の細胞内の量に依存している。レチノイン酸が欠乏する状態で星細胞は筋線維芽細胞様の形態に変化して活性化する。これまで、星細胞は医学研究において脇役であった。しかし、全身に分布する星細胞は、様々な病態を直接制御する主役となりうる。星細胞の動態から病態を理解する試みはこれまでない。膵星細胞は膵癌で線維化を引き起こし、悪性化へ関与することが断片的に報告されている。しかし、個々の現象を統合し、星細胞を起点とした膵癌の体系的な理解は得られていない。当研究室の成果から、いまだ不明である膵星細胞でレチノイン酸が欠乏し活性化する原因を、レチノイン酸代謝酵素である Cytochrome P450 26 (CYP26) の発現によりレチノイン酸が不活化されていることと推察した。ヒト膵癌組織を用いた予備検討で、CYP26 を発現する紡錘形細胞が一定数存在すること、また一部の癌細胞にも CYP26 が発現することを観察した。

2. 研究の目的

本研究では、膵星細胞で CYP26 の異常発現を原因としてレチノイン酸が欠乏し、活性化した膵星細胞が、間質の線維化や膵癌の悪性形質を促進するという、癌と間質を機能ユニットと捉えた疾患概念を確立することを目的とする。膵星細胞と膵癌に関連した報告は 500 件程度にとどまっており、本研究が達成されることで、これまで断片的な報告にとどまっている膵癌と膵星細胞、線維化そしてレチノイン酸が相互に関連する新たな疾患概念の確立につながる。さらに、膵癌の治療抵抗性のさらなる理解や新たな治療戦略の創出できる。

3. 研究の方法

札幌医科大学附属病院で手術が行われた膵癌症例 81 例と、anti CYP26A1 rabbit monoclonal antibody (Abcam) を用いて、CYP26A1 について免疫組織化学を施行した。染色強度を 0(陰性)-5(強陽性)の 6 段階で評価した。これらの染色強度を腺癌の分化度を低分化、中分化、高分化の 3 段階に分け、それぞれの分化度の領域毎に算出した。

膵癌細胞株 AsPC-1 と CRISPR-Cas9 システムを用いて、CYP26A1 ノックアウト細胞株を樹立した。作製したノックアウト細胞株を用いて、WST-8 assay, colony formation assay, migration assay を行った。

4. 研究成果

(1) 手術材料を用いた免疫組織化学的検討

膵癌組織では CYP26A1 は腺癌細胞に陰性から高度陽性まで様々な染色強度を示した。これらの染色スコアは腺癌の分化度と優位に関連していることが示された(図 1)。

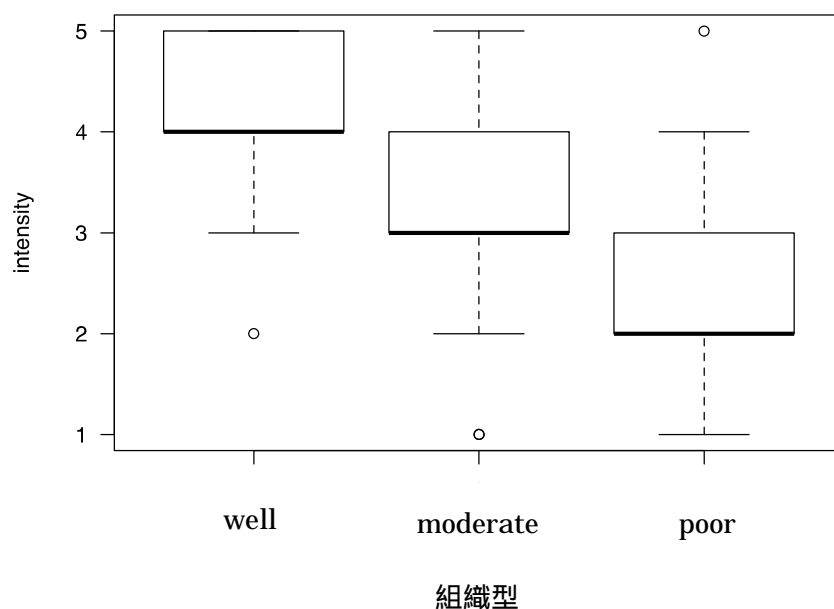


図 1 膵癌の分化度と CYP26A1 染色強度との関連

(2) 膵癌細胞株を用いた CYP26A1 発現の機能解析

膵癌細胞株 AsPC-1 で CRISPR-Cas9 システムを用いて CYP26A1 ノックアウト細胞株を作製した (図 2)。

ノックアウト細胞株では 10nM の濃度のレチノイン酸投与により, コントロールと比較して増殖能, コロニー形成能が有意に抑制された (図 3)。

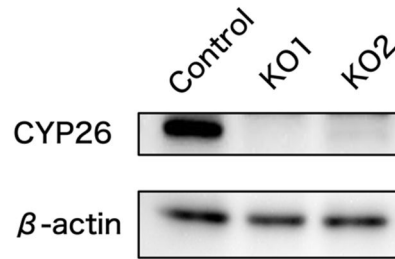


図 2 AsPC-1 での CYP26A1 ノックアウト細胞株の作製

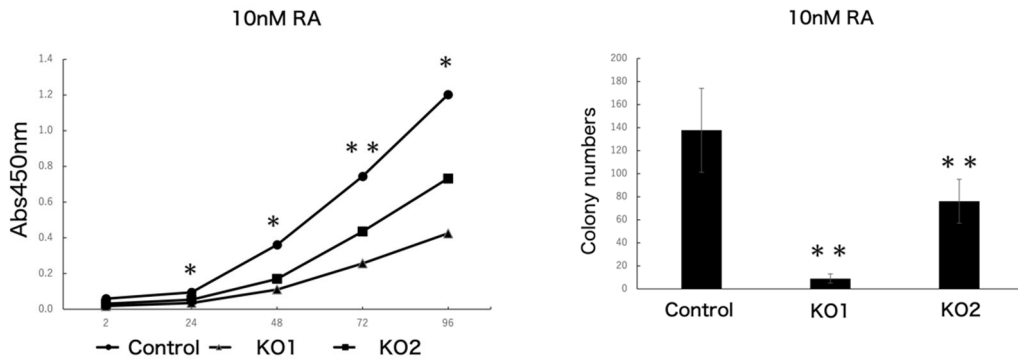
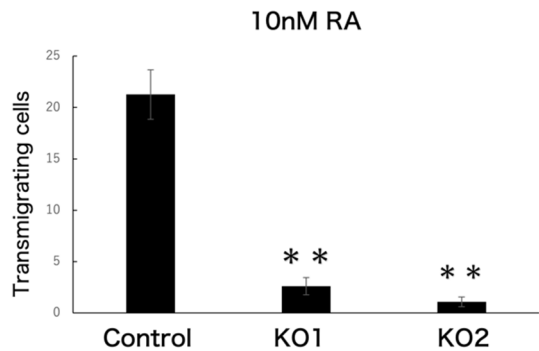


図 3 ノックアウト細胞株はレチノイン酸投与で有意な増殖能, コロニー形成能の低下を示した

また, transwell を用いた migration assay でノックアウト細胞株はコントロールと比較して有意に遊走能の低下を示した (図 4)。

これらの結果からは, CYP26A1 が発現することは癌細胞の悪性能獲得に関連している。ノックアウトした細胞株では, レチノイン酸投与で各種悪性能が抑制されることから, CYP26A が癌細胞において, レチノイン酸を代謝し不活化することで悪性能化に関与することが示唆された。



今後はトランスクリプトーム解析の結果を用いて, CYP26A1 とレチノイン酸の標的となる分子を探索し, 膵癌とレチノイン酸の関連を詳細に検討する。ノックアウト細胞株はレチノイン酸投与で有意な遊走能の低下を示した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Aoyama T, Takasawa A, Takasawa K, Ono Y, Emori M, Murata M, Hayasaka T, Fujitani N, Osanai M, Yamashita T, Hasegawa T, Sawada N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of Coiled-Coil Domain-Containing Protein 180 and Leucine-Rich Repeat-Containing Protein 4 as Potential Immunohistochemical Markers for Liposarcoma Based on Proteomic Analysis Using Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2019.01.013.	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 Kyuno D, Takasawa A, Takasawa K, Ono Y, Aoyama T, Magara K, Nakamori Y, Takemasa I, Osanai M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Claudin-18.2 as a therapeutic target in cancers: cumulative findings from basic research and clinical trials.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tissue Barriers.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21688370.2021.1967080.	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 Takasawa K, Takasawa A, Akimoto T, Magara K, Aoyama T, Kitajima H, Murakami T, Ono Y, Kyuno D, Suzuki H, Osanai M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Regulatory roles of claudin-1 in cell adhesion and microvilli formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.05.070	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 Murakami T, Takasawa A, Moriki A, Igaki Y, Ikeda H, Murase K, Takada K, Magara K, Aoyama T, Ono Y, Kyuno D, Takasawa K, Murata M, Osanai M.	4. 巻 -
2. 論文標題 A systemic apolipoprotein A-IV-associated amyloidosis confirmed by proteome analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Arch.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-021-03073-x.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野佑輔、小山内誠、青山智志、高澤久美、高澤啓、村田雅樹
2. 発表標題 タイト結合関連分子claudin-18は、レチノイン酸欠乏を原因とする乳がん悪性化に関与する
3. 学会等名 108回日本病理学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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