

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17500

研究課題名(和文) 上皮-間葉転換を介した膵臓癌進展メカニズムと治療標的への可能性の検討

研究課題名(英文) Examination of the mechanism of pancreatic cancer progression through epithelial-mesenchymal transition and its potential as a therapeutic target .

研究代表者

佐藤 健 (SATO, Takeshi)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：50806106

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)：膵臓癌は5年生存率が10%に満たない予後不良な疾患である。膵臓癌細胞では上皮間葉転換(EMT)が起こりやすいとされ、局所浸潤・転移を起こしやすい一因とされている。その発現低下がEMTを介して腫瘍進展に関与する分子としてE-cadherin(CDH1)に着目し、細胞レベル・動物モデルでの検討を行った。膵臓癌細胞からCDH1を失わせることにより、膵臓癌細胞の浸潤能・移動能が増加することが示唆され、膵臓癌の悪性度が上がる要因となることが示された。CDH1を失うことで、発現亢進が示されたヒストン脱アセチル化酵素であるHDAC1を阻害することでCDH1を失った膵臓癌細胞の増殖が抑制されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討で、接着分子の1つであるE-cadherinが、膵臓癌細胞において浸潤能や移動能を亢進させ、腫瘍進展に促進的に働くことが示唆された。E-cadherinの発現が低下した膵臓癌においては、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の発現が亢進していることが示され、その一つであるHDAC1を阻害することで膵臓癌細胞の増殖が抑制された。このことは、E-cadherinの発現低下を伴う膵臓癌において、HDAC阻害剤が治療効果を認める可能性があることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is a disease with a poor prognosis with a 5-year survival rate of less than 10%. It is said that epithelial-mesenchymal transition (EMT) is likely to occur in pancreatic cancer cells, which is one of the causes of promote local infiltration and metastasis. We focused on E-cadherin (CDH1): a molecule whose expression is reduced through EMT and is involved in tumor progression. We investigated it in vivo and in vitro. It was suggested that the loss of CDH1 from pancreatic cancer cells increased the infiltration and migration ability of pancreatic cancer cells, which was thought to be a factor to promote malignancy of pancreatic cancer. Loss of CDH1 increased the expression of HDAC1, histone deacetylase. It was shown that inhibition of HDAC1 suppresses the growth of CDH1-depleted pancreatic cancer cells.

研究分野：膵臓癌

キーワード：膵臓癌 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌（膵癌）は悪性腫瘍の中でも近年増加傾向にある5年生存率10%に満たない予後不良な疾患である。膵癌には他の癌と比較して、いくつかの特徴があり、それらを理解することが膵癌治療を新たに展開できると考えられる。その中でも局所浸潤および転移を起こしやすいことが、予後不良の原因となっている。浸潤および転移のメカニズムの全貌は明らかになっていないが、想定されている重要な機序として膵癌では上皮間葉転換（Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT）が起こりやすいことが挙げられている。この変化は細胞の形態が線維芽細胞様に変化し、間葉系マーカーを発現し、腫瘍細胞は周囲の細胞との接着性が低下し、運動能が亢進することによって、浸潤・転移能が亢進するとされている。

また、EMTによる癌進展のさらに重要なメカニズムとして癌幹細胞との関連が明らかになりつつある。癌幹細胞は自己複製と多分化能を持つ細胞であり、治療抵抗性や転移、再発の原因である可能性が示唆されている。近年の報告ではEMTによって癌の幹細胞化を促す可能性が指摘されており(Mani SA et al. Cell 2008)、治療抵抗性の原因として注目されている。

以上からEMTは癌幹細胞化、浸潤・転移の促進によって、癌の進展および治療抵抗性において極めて重要な現象であり、特にその現象が起こりやすいと報告されている膵癌においては、そのメカニズムの解明と対策は個別化医療開発に大きく貢献すると考えられる。E-cadherin(CDH1)は上皮細胞の接着結合における重要な分子であり、細胞-細胞間接着や細胞-間質接着に寄与する。また、細胞内領域ではカテニンと結合しており、細胞内へシグナルを伝える分子としても機能している。臨床的にはさまざまな癌の悪性度とその発現が逆相関することが知られており、またEMT獲得に伴って、その発現が抑制されることから、EMTの代表的な指標とされている(Thiery JP. Nat Rev Cancer 2002)。EMT惹起のメカニズム解析についてもE-cadherinの発現を指標に行われてきており、例えば、Snail、Twist、ZebなどはE-cadherinの発現制御因子として報告されている。さらに、その上流のシグナル伝達系として、TGF β 経路、NF- κ B経路などの重要性が指摘されてきた。臨床的に膵癌では50%以上の症例でE-cadherinの発現低下が観察される(Jia-Hao J et al. Biochimica Biophysica Acta 2015)が、膵癌におけるE-cadherinの発現低下が生体内でEMTを惹起しているのか、そして悪性化、浸潤、転移そして治療抵抗性に直接的に関与しているのかは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

膵癌においてEMTを制御することによる治療法を開発するため、EMTの実効分子であると考えられているE-cadherinの働きを検討し、EMTを惹起する細胞、モデル動物の構築をし、EMTの惹起する癌悪性化メカニズムを解析し、EMTを制御する分子を同定することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

動物モデルとして、膵臓特異的creマウスであるPDX1-creマウス・Ptf1a-creマウスあるいは、タモキシフェン誘導性creリコンビナーゼシステムを用いたPtf1a-cre^{ERT}マウスを用いた。これらのマウスと、Cre依存的に膵癌のドライバー変異であるKras変異を発現するLSL-Kras^{G12D/+}マウス、Cre依存的にCDH1のノックアウトを行えるCdh1 floxedマウス(Cdh1^{f/f})を交配し、正常膵および膵腫瘍におけるE-cadherinの役割を検討した。細胞のトレーシングにはtdTomatoマウスおよびRosa26-LSL-黄色蛍光タンパク質(YFP)マウスと組み合わせ、標識を行った。膵癌の悪性度をより高めるため、がん抑制遺伝子であるTP53^{f/f}を交配した。動物モデルの解析を行うため、免疫組織学的検討、ウエスタンブロット法、qRT-PCRを行った。

細胞レベルでの検討として、野生型マウス、Cdh1^{f/f}マウス、LSL-Kras^{G12D/+}マウス、Cdh1^{f/f}/LSL-Kras^{G12D/+}マウスの膵臓からオルガノイド培養を行った(それぞれのオルガノイドをWT・PC・PK・PKCオルガノイドと呼称)。また、レンチウイルスを用いて、PKCオルガノイドにCDH1を再導入したオルガノイド(PKC+C)も作成した。これらを用いて、免疫組織学的検討、ウエスタンブロット法、qRT-PCR、同種皮下移植・肝転移モデル、マイクロアレイでの検討を行った。

PKCオルガノイドおよびPKC+Cオルガノイドから、通常のシャーレで2D培養が可能なcell lineを樹立し、これらを用いて、創傷治癒アッセイ、細胞浸潤アッセイを行った。また、マイクロアレイで同定された因子に対する阻害剤を使用し、細胞増殖が抑制されるか検討を行った。

臨床検体を用いた研究としては、超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診/組織診(EUS-FNA)の余剰検体を用いて、オルガノイド培養を行い、オルガノイド細胞株の樹立を行い、薬剤スクリーニングを行う体制の構築を目指した。

4. 研究成果

膵臓特異的E-cadherinをノックアウトしたPDX1/Cdh1^{f/f}マウスを作成した。これらのマウス

は出生直後の膵組織には異常を認めなかったが、その後は腺房導管化 (Acinar-to-ductal metaplasia: ADM)・炎症細胞浸潤・線維化を伴う膵炎を発症し、生後 28 日以内に死亡した。このことから、発生の段階では膵臓の発達には必須ではないが、出生後の段階では膵臓の成長と維持に必要であることを示唆された。

同様に膵特異的に E-cadherin をノックアウトし、Kras 変異を発現させた Ptf1a-cre/LSL-Kras^{G12D/+}/Cdh1^{f/f} (PKC) マウスを作成したところ、生後 0-2 日では明らかな変化は認めなかったが、生後 4-5 日で ADM および膵臓における前がん病変とされる PanIN (低グレード) が観察された。生後 8 日時点で PKC マウスの膵臓は、PanIN-2/3 と判断される異常な管腔構造を呈し、膵癌で観察される間質反応様の変化を示し、死亡した。PKC マウスに tdTomato を組み合わせ、赤色蛍光タンパク (RFP) で染色を行うと、PanIN の細胞のみならず、間質成分にも RFP 陽性細胞を認め、E-cadherin を欠失することで腫瘍細胞が間質にも浸潤し、EMT を引き起こしている可能性が示唆された。

マウス由来のオルガノイドでの検討では、PC オルガノイドでは、レンチウイルスによる cre リコンビナーゼ導入により、オルガノイドの崩壊が起こり、アポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3 が多くの細胞で陽性となっており、E-cadherin の欠失によって形態の破壊が引き起こされた。一方で、PKC オルガノイドに同様の処理を行ったところ、cleaved caspase-3 は部分的な陽性にとどまり、異形成の高い円柱上皮によってオルガノイドは維持された。これらの結果から、E-cadherin の欠失によるアポトーシスと形態の破壊が、Kras^{G12D/+}変異の付与によって打ち消されることが示され、細胞生存に有利に働くことが示された。

これらのオルガノイドを用いて行った同種皮下移植モデルでは、PC オルガノイドは腫瘍形成能を認めなかったが、PK オルガノイドおよび PCK オルガノイドは腫瘍形成能を有していた。組織学的には、PK オルガノイドの皮下腫瘍では腺管構造が保たれた高分化腺癌の組織像であったが PKC オルガノイドの皮下腫瘍では、腺管構造に乏しく、低分化腺癌に類似した組織像を示した。オルガノイドの膵臓への注入による肝転移モデルにおいては、PK・PKC オルガノイドいずれも肝転移を形成し、組織学的な特徴も皮下移植モデルと同様であった。

PK・PKC オルガノイドから 2D 培養が可能となった細胞株を用いて、創傷治癒アッセイ・細胞浸潤アッセイを行ったところ、PKC オルガノイドから樹立した細胞株では、より早期に閉鎖が起き、浸潤傾向が強いことが示され、E-cadherin の欠失により、腫瘍の遊走能が亢進することが示された。

PDX-1/Ptf1a-cre マウスとの組み合わせは、長期生存が得られない動物モデルであり、膵腫瘍の検討には不向きであったため、タモキシフェン誘導性 cre リコンビナーゼシステム (cre-ERT) を用いて動物モデルでの検討を追加した。Ptf1a-cre^{ERT} マウスと LSL-Kras^{G12D/+} マウス、Cdh1^{f/f} マウスを交配し、Ptf1a-cre^{ERT}/LSL-Kras^{G12D/+} (iPK) マウスおよび Ptf1a-cre^{ERT}/LSL-Kras^{G12D/+}/Cdh1^{f/f} (iPKC) マウスを作成した。タモキシフェンを投与後、6 週時点での検討では iPK マウスは少量の PanIN が形成されているのみであったが、iPKC マウスでは、大部分が強い間質反応を伴う PanIN に置き換わっており、腫瘍進展が促進することが示された。また、Rosa26-LSL-YFP マウスと組み合わせ、抗 GFP 抗体で染色を行うと、iPKC マウスの間質にも紡錘形の陽性細胞が観察され、EMT が引き起こされ、間質への腫瘍細胞浸潤が引き起こされたものと考えられた。

PKC オルガノイドおよび PKC+C オルガノイドに対して相補的 DNA マイクロアレイ分析を行った。遺伝子セット分析によるデータ分析では、DNA 損傷や染色体構成に關与する遺伝子セットに有意差があることが示された。PKC+C と比較し、上昇している PKC の上位 20 遺伝子を抽出し検討し、この中から膵癌細胞で有効であることが報告されているヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 に着目し、HDAC 阻害剤を用いた検討を行った。PKC 細胞は PKC+C よりも高い増殖能を有していたが、PKC 細胞では HDAC 阻害剤の有意な増殖阻害効果が観察された。この結果は、Hdac1 が E-カドヘリンの欠失を伴う細胞の治療標的になりうる可能性があることを示唆していると考えられた。

膵癌における E-cadherin の影響をさらに検討するため、PKC マウスにがん抑制遺伝子である TP53^{f/f} を掛け合わせ、Ptf1a-cre^{ERT}/LSL-Kras^{G12D/+}/TP53^{f/f}/Cdh1^{f/f} マウスを作成した。Ptf1a-cre^{ERT}/LSL-Kras^{G12D/+}/TP53^{f/f} マウスに生じる膵癌は低分化であり、転移を来しやすく、悪性度が高かったためか、CDH1^{f/f} を追加することによって、生存期間や組織学的に有意な差異は見いだせず、有用な知見を得ることはできなかった。

EUS-FNA による臨床検体を用いた膵癌オルガノイド培養に関しては、18 症例に対して FNA 検体を用いて培養を行い、14 例で培養に成功。6 例で株の樹立に成功した。樹立細胞株が想定より少なく、薬剤スクリーニングを行う体制を構築することは出来なかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Kaneta Yoshihiro, Sato Takeshi, Hikiba Yohko, Sugimori Makoto, Sue Soichiro, Kaneko Hiroaki, Irie Kuniyasu, Sasaki Tomohiko, Kondo Masaaki, Chuma Makoto, Shibata Wataru, Maeda Shin	4. 巻 9
2. 論文標題 Loss of Pancreatic E-Cadherin Causes Pancreatitis-Like Changes and?Contributes to Carcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 105 ~ 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2019.09.001	査読の有無 無
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0件

〔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
---------	---------