

令和 5 年 4 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16154

研究課題名(和文)膵管内乳頭粘液性腫瘍から浸潤性膵癌に進展する規定因子の網羅的探索

研究課題名(英文)Comprehensive analyses about factors involved in the progression from IPMN to Pancreatic cancer

研究代表者

齋藤 圭 (Saito, Kei)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：20815617

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)：膵臓の嚢胞性疾患であるIPMNは膵癌の前癌病態であるが、GNAS変異を持つIPMN様病態から浸潤癌に至るまでの過程における必須の遺伝子を同定する目的で研究を行った。その結果、GNAS変異はGNAS蛋白は細胞核と細胞質をつなぐシャペロン蛋白であるRanと結合し、その結果MAPK経路以外の細胞内シグナル伝達に変化を与え、その結果ケモカイン発現が増加し、細胞がapoptosisに陥り、細胞回転が増加することが想定された。細胞回転の増加はそのまま遺伝子変異の蓄積につながることから、これがIPMNからの膵発癌機構のひとつと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

年率1-2%と言われるGNAS変異を持つIPMN様病態から浸潤癌に至る人がなぜ存在するのか、GNAS変異から浸潤癌に至るまでの過程における必須の遺伝子を同定することは重要である。今回IPMNからの膵発癌機構のひとつを同定したが、今後これらの機構を追求することで、IPMNからの膵発癌を抑制する手法を開発することに繋がるのが期待される。

研究成果の概要(英文)：IPMN, a cystic disease of the pancreas, is a precancerous pathology of pancreatic cancer. We investigated to identify essential genes in the process from IPMN-like pathology with GNAS mutation to invasive cancer.

As a result, the GNAS mutation caused the GNAS protein to bind to Ran, a chaperone protein that connects the cell nucleus and cytoplasm, resulting in changes in intracellular signaling other than the MAPK pathway, resulting in an increase in chemokine expression and the cell undergoing apoptosis. It was assumed that the cells would fall and increase cell turnover.

Since the increase in cell turnover directly leads to the accumulation of gene mutations, this was considered to be one of the mechanisms of pancreatic carcinogenesis from IPMN.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵がん

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第一位は悪性腫瘍である。悪性腫瘍による死亡者数を臓器別にみると第一位は肺がんであるが、第二位から第五位までの4つの臓器は いずれも消化器系の癌であり、大腸癌、胃癌、膵癌、肝癌が占めている。このうち、胃癌、肝癌による死亡者数は減少傾向にあるが、大腸癌、膵癌による死亡者数は増加傾向にある。この理由として、ヘリコバクターピロリ菌の除菌、あるいは、肝炎ウイルスの効率的な排除法の発展によって、胃癌・肝癌の罹患数自体が減少していることもあるが、なによりも、胃癌・肝癌はこれまでの先人がたの努力によってハイリスク群の囲い込み法が確立されており、早期発見・早期治療に持ち込みやすいことが挙げられると思われる。これら胃癌や肝癌と同じように、現在 罹患数・死亡者数が増え続けている膵癌についても、近い将来、「膵癌で死ぬ人を減らす」というパラダイムシフトを起こさなければならないと考える。そのためには、胃癌や肝癌と同様にハイリスク患者の囲い込み法を確立し、効率的に早期がんを見つけることが最重要課題である。

膵癌のハイリスク患者の囲い込みとして、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN: Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm) は、数少ない膵癌高危険群の設定法である。しかしそれとても年率1-2%しか癌化せず、あまりにも効率が悪いと言わざるを得ない。

IPMN からの膵発癌は、膵の他の部位に発生する通常型膵癌もありうるが、IPMN 由来浸潤癌がある。また、IPMN には GNAS 遺伝子の変異が多いことが特徴である。そこで、年率1-2%と言われる GNAS 変異を持つ IPMN 様病態から浸潤癌に至る人がなぜ存在するのか、GNAS 変異から浸潤癌に至るまでの過程における必須の遺伝子を同定することは重要であると考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究の主目的を「GNAS 変異を持つ膵管上皮細胞から浸潤癌への形質転換に必須の遺伝子異常の同定」とし、その結果に基づいて血液中から同定した遺伝子の変異検出を試みることで、早期の診断に臨床的に資することを二次的目的とした。

研究代表者は以前から、膵癌患者の早期発見のための囲い込み、膵癌患者の予後改善のための化学療法工夫について主に臨床的な見地から検討を加えてきた。膵癌の前癌病態とみなされる IPMN で GNAS 変異が多いことは既に報告されているが、GNAS 変異を伴う IPMN のなかで なぜある特定のケースだけ浸潤癌に進展するのか、GNAS 変異から浸潤癌に進展する過程で要する遺伝子異常については、まだ明らかになっていない。したがって、膵上皮細胞の形質転換に必須な GNAS 変異に付加的に要する遺伝子異常について同定することは、膵癌囲い込みを目指す臨床的な見地からも、癌化機構の解明という基礎的な見地からも、極めて重要性が高く、かつ、その点に着目できるのは臨床的なバックグラウンドによる動機付けと基礎研究能力の両者を兼ね備えていて初めてできるものであり、独自性が高いと考えた。

さらに、同定した遺伝子異常を血中から高感度に測定する liquid biopsy 法を確立できれば、早期膵癌のスクリーニング法にイノベーションをもたらすことができ、膵癌診療にとどまらず他の癌診療にも大きなインパクトを与えることができる。学術的な発展性のみならず社会的にも大きな意義があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) GNAS 変異細胞の癌化に関わる遺伝子の探索：

hTERT を発現させて長期培養を可能にしたヒト正常膵管上皮細胞に、遺伝子編集手法を用いて IPMN で臨床的にみられる GNAS 変異 (602 C<A, 201 番アミノ酸の R H への変異) を導入する。遺伝子変異が導入された細胞は迅速に単離するために希釈系列を作製しつつ digital PCR (研究室に既に備わっている) による変異検出を行ったうえで濃縮し、最終的に変異が導入された細胞のみを isolation し GNAS 変異導入ヒト正常膵管上皮細胞を単離する。

この細胞に Cas9 蛋白を発現するレンチウイルスを感染させて Cas9 発現細胞を樹立し、commercial に available なゲノムワイドのノックアウト用 guide RNA library を発現するレンチウイルスを感染させたうえで soft agar assay を行い transform 能を獲得して増殖し得た細胞だけを選択することを想定していた。この際、コントロールとして、GNAS 変異を導入していない細胞についても並行して同様の検討を行う。選択された細胞からゲノム DNA を回収しライブラリーを調整のうえ、次世代シーケンサー (共用機器) で guide RNA の標的となっている配列を同定し、GNAS 変異細胞での標的遺伝子と GNAS 変異が入っていない細胞での標的遺伝子との差分をとることで、GNAS 遺伝子変異と共同してトランスフォームに働く遺伝子を同定する。

(2) GNAS と結合する蛋白の同定と機能解明

GNAS によるシグナル伝達を解明するために、GNAS 蛋白を免疫沈降して共沈する蛋白を質量分析で同定した。そこから得られた情報をもとに GNAS による細胞内情報伝達の詳細を解明することを試みた。

4. 研究成果

1) GNAS 変異細胞の癌化に関わる遺伝子の探索:

不死化したヒト正常膀胱上皮細胞の GNAS 遺伝子に変異を導入するためにガイド RNA とドナーオリゴヌクレオチドを入れて Cas9 蛋白による遺伝子編集を試みたが、どのように工夫しても樹立が出来なかった。この原因はいくつか考えられるが、GNAS 遺伝子座が Cas9 蛋白による切断が起きにくいゲノム領域であることが想定された。このため GNAS 変異と野生型 GNAS の機能的比較や癌化機構をそのまま解析することは困難と考えられた。そこで、下記に示す GNAS 蛋白との結合する蛋白の同定からの機能解析を優先して進めることとした。

2) GNAS 蛋白との結合する蛋白の同定と機能解析

GNAS 発現細胞の樹立

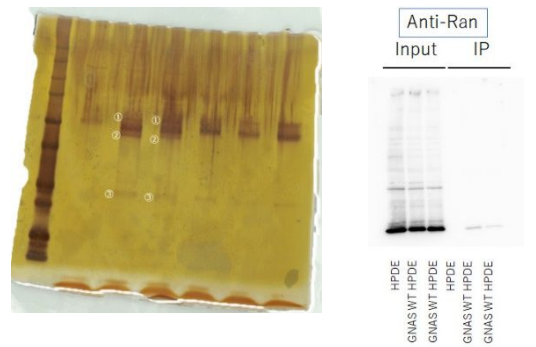
GNAS 蛋白と結合する蛋白の同定のために、Flag-tag をつけた GNAS 蛋白を発現するコンストラクトを作成した。その細胞を用いて anti-Flag 抗体で免疫沈降し、実際に目的蛋白が単離できることを確認した(右図)。



GNAS 蛋白と結合する蛋白の新規同定

GNAS 蛋白と結合する蛋白を新規に同定するために、免疫沈降を行った検体を泳動し、バンドを切り出して質量分析に供与した。その結果、新たな結合蛋白候補として、Ran 蛋白を同定した(右図)。

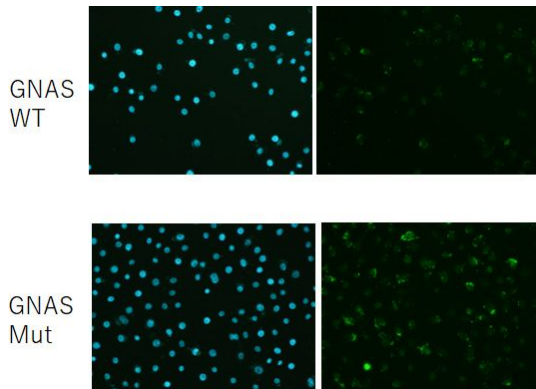
右図の左から3レーンにある additional band を切り出して、新たな結合蛋白を同定した。この結果を確認するために、免疫沈降で GNAS 蛋白を単離した lysate を用いて抗 Ran 抗体で blotting したところ、確かに Ran 蛋白が結合していることが確認できた(下図)。



GNAS 変異による機能変化

GNAS と結合する蛋白として Ran が同定できたが、臨床的な興味としては、GNAS に IPMN で見られる変異が入ったときの機能変化として何があるか、という点である。

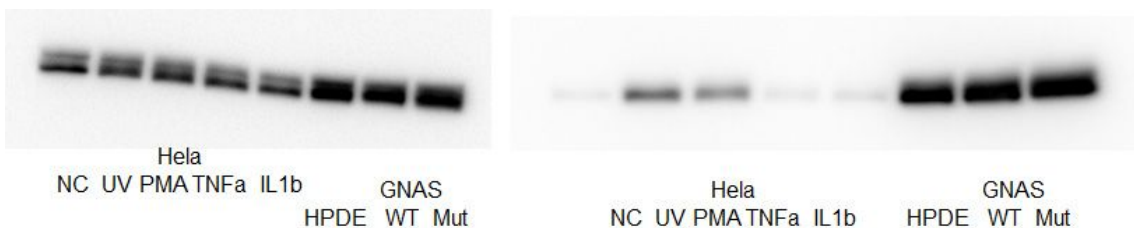
そこで、GNAS 野生型と変異挿入型で機能的な変化が見られないかを独立して検討した。その結果、GNAS 変異があると、細胞の apoptosis が顕著に見られることが TUNEL assay で確認された。この結果は、GNAS 変異が起きることで、細胞回転が速くなることを示唆しているものと考えられた(右図)。



MAPK 経路には影響しない

次に、GNAS 変異で影響を受ける細胞内シグナル伝達系を検討するために、MAPK 経路の活性化に必要な ERK の活性化状態を検討した。

その結果、様々な positive control 刺激では ERK の活性化が見られるものの、GNAS 変異および野生型では ERK の活性化状態に変化はなく、この結果から、MAPK 経路は GNAS の下流には位置していないことが示唆された(下図)。



GNAS 変異がもたらす遺伝子発現変化

次に、GNAS 変異がもたらす細胞内環境の変化を網羅的に検討するために、GNAS 変異と野生型をもつ細胞株を用いた RNA sequencing を行った。その結果、さまざまな遺伝子発現が変化していたが、なかでもケモカイン系の遺伝子の発現が GNAS 変異で強く誘導されていることが判明した。この結果(次ページ)は、GNAS 遺伝子変異が入ると、その下流でケモカインの発現が誘導され、その結果、細胞が apoptosis に陥る系が考えられた。

	F	G	K	L	M	N	O	P	Q
1			global normalization			比較NO (D: 1 vs 2)			
2	Symbol	Description	1	2	3	ratio	LOG2(rsi)	+	+
3	LCN2	lipocalin 2	2	130	162	54.51	5.77	***	
4	CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	59	1543	1399	25.97	4.70	***	
5	SAAG2	serum amyloid A2	28	561	472	20.18	4.33	***	
6	CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	11	207	212	18.13	4.18	***	
7	CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 6	1	18	18	17.61	4.14	***	
8	PDZK1IP1	PDZK1 interacting protein 1	2	27	28	15.65	4.05	***	
9	BCL2L1	BCL2 related protein A1	1	21	26	15.80	3.94	***	
10	DEFB4A	defensin beta 4A	1	14	12	12.93	3.89	***	
11	LTB	lymphotoxin beta	10	117	113	11.73	3.55	***	
12	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2	19	2	11.11	3.47	***	
13	CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	256	2663	2921	10.41	3.36	***	
14	IL1B	interleukin 1, beta	145	1450	1370	10.22	3.35	***	
15	IL24	interleukin 24	5	51	60	9.43	3.21	***	
16	MMP1	matrix metalloproteinase 1	7	58	80	8.94	3.16	***	
17	DEFB4B	defensin beta 4B	1	8	6	8.72	3.12	***	
18	IL36G	interleukin 36, gamma	5	41	48	8.47	3.05	***	
19	GJBE2	gap junction protein beta 2	24	196	223	8.15	3.03	***	
20	INHBA	inhibin beta A	38	267	296	6.99	2.81	**	
21	C3	complement component 3	75	516	491	5.92	2.79	**	
22	CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	30	204	238	5.87	2.75	**	
23	MRGPRX3	MAS related GPCR family member X3	3	18	20	5.45	2.69	**	

RNA sequencingの結果、CXCL8 や CXCL6などのケモカイン系の発現がGNAS 変異で強く誘導されてくることが判明した。

GNAS 変異による細胞内情報伝達変化の推定

以上の結果から、GNAS 蛋白は細胞核と細胞質をつなぐシャペロン蛋白である Ran と結合し、その結果 MAPK 経路以外の細胞内シグナル伝達に変化を与え、その結果ケモカイン発現が増加し、細胞が apoptosis に陥り、細胞回転が増加することが想定された。

細胞回転の増加はそのまま遺伝子変異の蓄積につながることから、IPMN からの膵発癌機構のひとつと考えられた。

今後これらの機構を追求することで、IPMN からの膵発癌を抑制する手法を開発することに繋がることが期待される。

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 2件）

1. 著者名 Kato H, Tateishi K, Fujiwara H, Nakatsuka T, Yamamoto K, Kudo Y, Hayakawa Y, Nakagawa H, Tanaka Y, Ijichi H, Otsuka M, Iwadata D, Oyama H, Kanai S, Noguchi K, Suzuki T, Sato T, Hakuta R, Ishigaki K, Saito K, et al.	4. 巻 162
2. 論文標題 MNX1-HNF1B Axis Is Indispensable for Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm Lineages.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology.	6. 最初と最後の頁 1272-1287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2021.12.254	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 Hamada T, Oyama H, Nakai Y, Tada M, Koh H, Tateishi K, Arita J, Hakuta R, Ijichi H, Ishigaki K, Kawaguchi Y, Kogure H, Mizuno S, Morikawa T, Saito K, Saito T, Sato T, Takagi K, Takahara N, Takahashi R, Tanaka A, Tanaka M, Ushiku T, Hasegawa K, Koike K.	4. 巻 30
2. 論文標題 ABO Blood Group and Risk of Pancreatic Carcinogenesis in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Epidemiol Biomarkers Prev .	6. 最初と最後の頁 1020-1028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1055-9965	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 Saito Kei, Nakai Yousuke, Takahara Naminatsu, Ishigaki Kazunaga, Suzuki Yukari, Inokuma Akiyuki, Noguchi Kensaku, Kanai Sachiko, Sato Tatsuya, Hakuta Ryunosuke, Saito Tomotaka, Hamada Tsuyoshi, Mizuno Suguru, Kogure Hirofumi, Ijichi Hideaki, Tateishi Keisuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 39
2. 論文標題 A retrospective comparative study of S-IROX and modified FOLFIRINOX for patients with advanced pancreatic cancer refractory to gemcitabine plus nab-paclitaxel	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigational New Drugs	6. 最初と最後の頁 605 ~ 613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10637-020-01022-0	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 -

〔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
---------	---------