

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17023

研究課題名（和文）膵がんによる肝臓の代謝変化を介した転移土壌形成の解明

研究課題名（英文）An elucidation of mechanisms of liver metastasis via metabolic changes in pancreatic adenocarcinoma

研究代表者

竹野 歩 (Takeno, Ayumu)

国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・講師

研究者番号：10812456

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）：膵癌は予後が非常に不良である。その一因として肝転移が多いことが知られ、肝転移の制御が喫緊の課題となっている。

申請者らは膵癌発症モデルKPCマウスの膵癌細胞株において、マウスへの移植・肝転移モデルを用いて肝臓高転移細胞株を作製した。この細胞株とコントロールにおいてRNA-seqなどの網羅的解析を行い、肝転移を起こす細胞の特徴を明らかにした。また、ヒト膵癌原発巣の病理組織におけるRNA-seqを行った検討で、術後肝転移が出現した患者で発現が多い遺伝子を抽出することができた。それらの遺伝子をKPCマウス膵癌細胞株で過剰発現およびノックアウトし、肝転移能に与える影響について、解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本助成期間において、肝転移指向性のある膵癌細胞の特徴やそのメカニズムは十分に明らかにはできなかった。しかしながら、本研究をさらに進展させ膵癌の肝転移メカニズムを明らかにすることができれば、肝転移を制御する新たな治療法の開発につながり、ひいては膵癌患者の予後改善につながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Prognosis of pancreatic adenocarcinoma (PDAC) is very poor because of high prevalence of liver metastasis. Thus, suppression of liver metastasis is important to improve prognosis of PDAC patients.

We made highly metastatic PDAC lines using splenic transplantation model. We analysed those cell lines and their control cell lines with RNA-seq and in vitro and in vivo experiments. There were several differences of gene expression signatures such as epithelial-mesenchymal transition and vascular regeneration. Moreover, we performed RNA-seq in human PDAC tissues and showed that expression of several genes were upregulated in patients with liver metastasis. We overexpressed and knocked out these genes in PDAC cells and are examining its effect on liver metastasis. By combining these results, it may be possible to elucidate the mechanisms of liver metastasis in PDACs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膵癌 肝転移 KPCマウス

1. 研究開始当初の背景

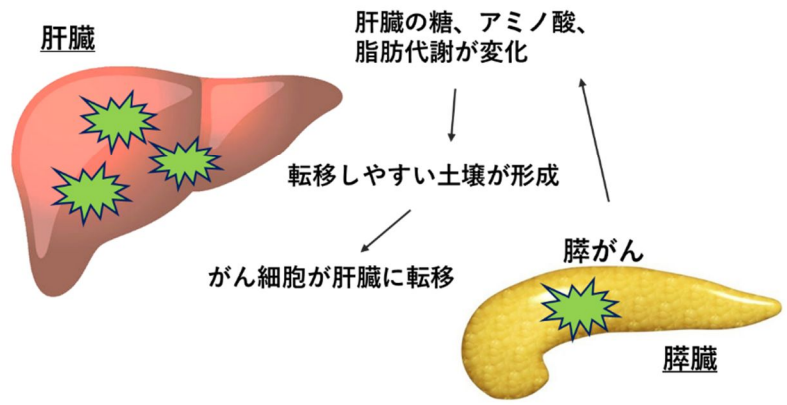
膵癌は最も予後不良な癌の一つであり、5年生存率は10%を下回る。その原因として、肝転移の頻度が非常に多いことが挙げられ、膵癌の肝転移機構の解明が膵がん患者の予後改善に重要である。

癌細胞は酸素が十分に存在してもATP産生を解糖系に依存することや、メチオニン要求性が高くグルタミン代謝を活発に行うといった特異な代謝を持つことが知られている。これら癌細胞の代謝特性は栄養供給が十分ではない環境で生存、増殖、浸潤するための適応機構であると考えられ、癌代謝をターゲットにした薬剤の開発も進んでいる。

癌細胞は転移に適した微小環境を持つ臓器に転移するという概念が古くから提唱されている。さらに、近年、癌自体が転移先の微小環境を転移しやすいもの(転移土壌)に変えることが明らかになりつつある。その機序として、原発巣から産生される液性因子が骨髄由来免疫細胞の浸潤、血管新生や血管透過性の亢進、活性化線維芽細胞の誘導を引き起こすことが報告されている。膵癌でも、原発巣から分泌されるTIMP-1、IL-6やエクソソームが肝臓での炎症細胞浸潤、細胞外基質の変化を誘導し転移土壌を形成することが分かっている(Grunwald et al. Gastroenterology 2016, Lee et al. Nature 2019 および Costa-Silva et al. Nat Cell Biol 2015)。

一方、癌から産生されるサイトカインがインスリン抵抗性を誘導し肝臓の代謝に影響を与えることが知られているが、この肝臓の代謝変化が膵癌の肝転移土壌形成に関与するかは明らかではない。

図1. 膵がん細胞が肝臓の代謝変化を介して肝転移土壌を形成するか？(仮説)



2. 研究の目的(図1)

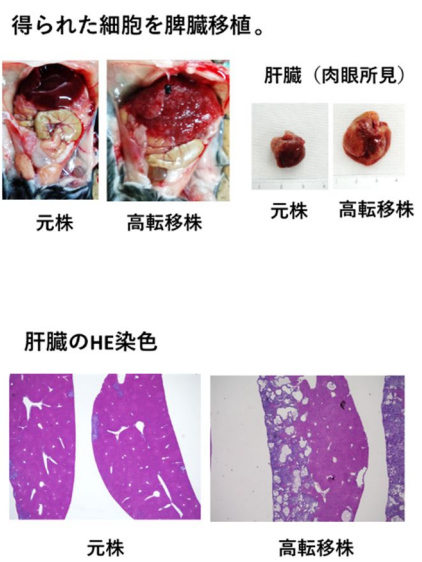
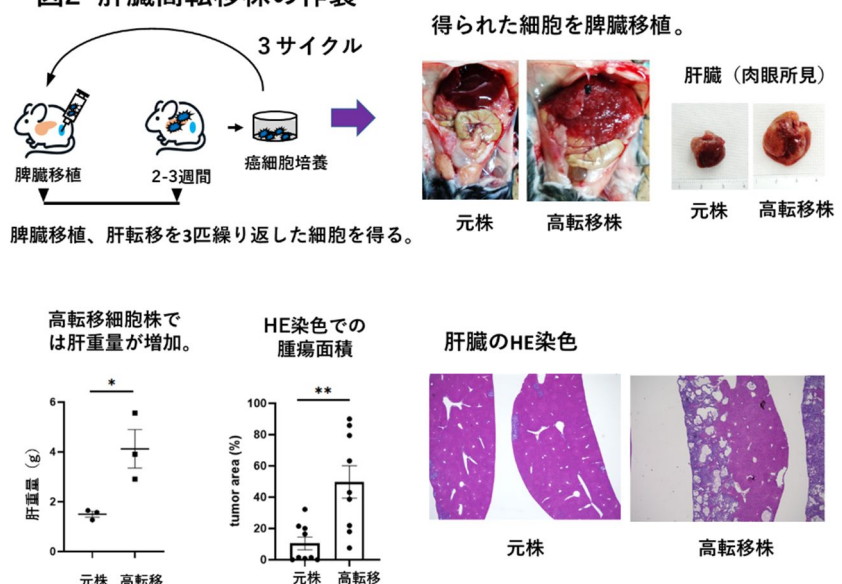
本研究の目的は、膵癌が肝臓の代謝変化を介して転移土壌形成をしているか明らかにすることである。これまでの転移土壌形成機序は炎症や細胞外基質の変化を介したものが中心であり、転移土壌自体の代謝に着目した点が独創的である。また、本検討では膵癌発症モデルKPCマウス、ヒト膵癌オルガノイドを用いた実験での検証を行うこととした。

3. 研究の方法

KPCマウスは、膵臓に発癌性K-rasとTrp53が発現する膵癌発症モデルである。プロモーター領域にLoxP-Stop-LoxP配列が挿入された変異型K-ras、Trp53のfloxマウスと膵臓特異的に発現したPdx1-Creマウスをかけ合わせることで作製する。生後4週頃には正常膵臓であるが、慢性膵炎、膵上皮異形成を生じ、生後10週頃に膵がんを発症する。さらに、週齢とともに肝転移、肺転移や腹膜播種が出現する。ヒトの進行膵癌では手術が行われることは少なく、膵癌転移巣の検体での研究は難しい。そのため、KPCマウスが膵癌研究に汎用されている。

本研究では、KPCマウスやKPCマウス由来膵癌細胞株の移植・肝転移モデルを用いて実験を行

図2 肝臓高転移株の作製



った。

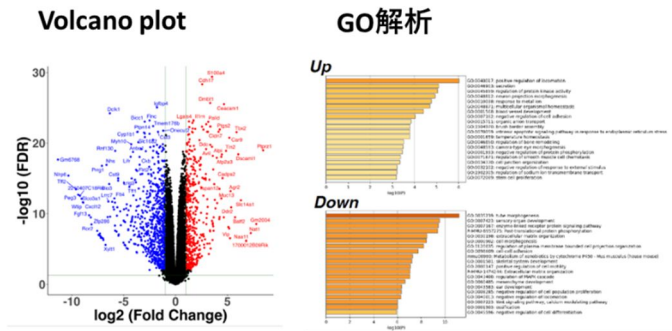
#### 4. 研究成果

##### (1) KPC マウス肝臓の代謝変化の解析

KPC マウスとコントロールマウス(KP マウス)を用いて肝臓の非癌部の遺伝子発現を解析した。KPC マウスの腹部に腫瘤を触れ担癌状態となった際に、安楽死させて肝臓を採取し、RNA 発現を qPCR で解析した。解糖系やペントースリン酸経路、脂質代謝などの酵素発現を比較したが、有意差は認めなかった。

また、KPC マウスは個体によって発癌時期が大きく異なっており(15 - 30 週齢) 週齢が異なることによる代謝への影響なども懸念され、KPC マウス自体の肝臓を用いた非癌部の代謝に関する解析は困難と考えられた。

図3 KPCマウス肝臓高転移腫瘍細胞株におけるRNA-seq



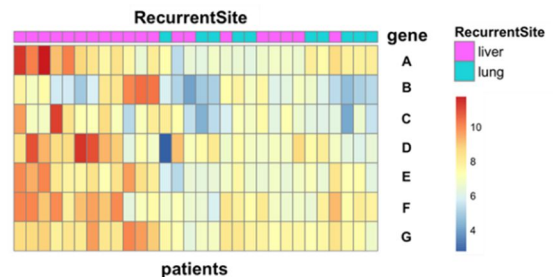
##### (2) KPC マウス腫瘍細胞の移植モデルを用いた肝臓の代謝変化の解析

続いて、KPC マウス腫瘍細胞の移植・肝転移モデルを用いて、肝臓の非癌部の代謝変化を解析した。腫瘍細胞を野生型マウスの脾臓に移植し肝転移が生じるモデルを用いた。コントロールとして vehicle を脾臓に注入したマウスを用いた。KPC マウスの実験と同様にコントロールマウスの肝臓と肝転移マウスの肝臓非癌部を採取し、RNA 発現を qPCR で解析したところ、解糖系酵素や脂質代謝、ペントースリン酸経路に関する酵素の発現に有意差を認めなかった。

##### (3) KPC マウス腫瘍高転移細胞株を用いた検討

KPC マウス自体の肝臓、移植・肝転移モデルを用いた肝臓非癌部の解析において、明らかな代謝関連酵素に変化を認めなかったため、肝転移を生じやすい癌細胞の特性について解析を行うこととした。実験で行った KPC マウス腫瘍細胞を脾臓に移植し肝転移を生じさせるモデルにおいて、肝転移巣の癌細胞を培養して再度脾臓に移植することを3回繰り返した(図2)。それにより得られた腫瘍細胞は元の細胞株(元株)と比較し有意に肝重量が重く、HE染色でも肝転移巣が増加していた。この肝臓高転移細胞と元株を比較したところ、in vitro の検討において増殖能、遊走能など癌細胞特性のいくつかに有意差が認められた。また、上皮間葉転換やさまざまな代謝酵素において発現が異なっていた。現在 RNA-seq を行っており(図3)、発現変動遺伝子や変化の認められたシグナル経路に着目して解析しており、肝臓高転移腫瘍細胞の特徴や高転移性との因果関係について、遺伝子への介入(発現、ノックアウトなど)を行うことで説明を試みている。

図4 腫瘍術後再発患者の癌組織におけるRNA-seq

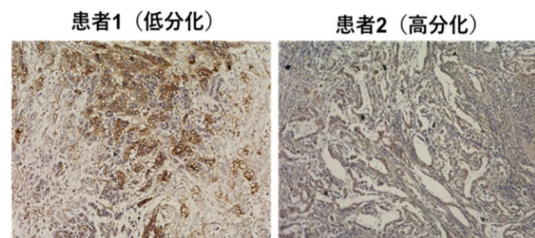


術後肺転移と比べ肝転移した腫瘍で発現の多い6つの遺伝子A-Gを同定した。

##### (4) ヒト腫瘍組織の RNA-seq 解析

ヒト腫瘍において、肝転移が出現したものは予後が著しく不良であるが、肺転移のみの症例では比較的予後がよいことが知られている。申請者らはヒト腫瘍手術サンプルについて RNA-seq を行い、その後肝転移や肺転移の出現についてフォローアップした。術後肺転移出現群と肝転移出現群を比較することで、転移指向性や悪性度に関する遺伝子を抽出できると考え解析した。術後肝転移出現群で発現の高い6つの遺伝子 A-G を抽出した(図4)。さらに、ヒト腫瘍組織の免疫染色において遺伝子 G は低分化癌で強く染色され、遺伝子 G が悪性度や転移指向性に関連する可能性が示唆された(図5)。これらの遺伝子を発現、ノックアウトなどすることで転移に影響しうるか、腫瘍細胞モデルを用いて検証している。

図5 ヒト腫瘍組織の免疫組織染色(遺伝子G)



遺伝子Gは転移と関連する低分化癌で強く染色される。

これらの研究をさらに進めることで、肝転移に関するメカニズムを明らかにできれば、腫瘍患者の予後改善につながることを期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Teramatsu K, Oono T, Oyama K, Fujimori N, Murakami M, Yasumori S, Ohno A, Matsumoto K, Takeno A, Nakata K, Nakamura M, Ogawa Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Circulating CD8+CD122+ T cells as a prognostic indicator of pancreatic cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-10207-0.	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 -
1. 著者名 Takamatsu Y, Fujimori N, Miyagahara T, Suehiro Y, Kaku T, Kawabe K, Ohno A, Matsumoto K, Murakami M, Teramatsu K, Takeno A, Oono T, Ogawa Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Glasgow Prognostic Score and stricture site can predict prognosis after endoscopic duodenal stent placement for malignant gastric outlet obstruction.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-13209-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 -
1. 著者名 Murakami M, Fujimori N, Matsumoto K, Ohno A, Teramatsu K, Takamatsu Y, Takeno A, Ueda K, Oono T, Ito T, Ogawa Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 A clinical analysis on functioning pancreatic neuroendocrine tumors (focusing on VIPomas): a single-center experience	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocr J	6. 最初と最後の頁 1201-1209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ22-0111. Epub 2022 May 27.	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 Matsumoto K, Fujimori N, Hata Y, Minoda Y, Murakami M, Teramatsu K, Takamatsu Y, Takeno A, Oono T, Ihara E, Nakata K, Nakamura M, Yamamoto T, Koga Y, Oda Y, Ito T, Ogawa Y.	4. 巻 41
2. 論文標題 Ampullary Neuroendocrine Neoplasm: Clinicopathological Characteristics and Novel Endoscopic Entity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dig Dis	6. 最初と最後の頁 316-324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000525013	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 M, Fujimori N, Ohno A, Matsumoto K, Teramatsu K, Takamatsu Y, Takeno A, Oono T, Abe T, Ideno N, Ikenaga N, Nakata K, Nakamura M, Ishigami K, Ogawa Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Predictive factors of operability after neoadjuvant chemotherapy in resectable or borderline resectable pancreatic cancer: a single-center retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Discov Oncol	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12672-021-00462-1.	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 Masatoshi, Fujimori Nao, Ohno Akihisa, Matsumoto Kazuhide, Teramatsu Katsuhito, Takamatsu Yu, Takeno Ayumu, Oono Takamasa, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Nakamura Masafumi, Ishigami Kousei, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Predictive factors of operability after neoadjuvant chemotherapy in resectable or borderline resectable pancreatic cancer: a single-center retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Discover Oncology	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12672-021-00462-1	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹野 歩
2. 発表標題 KPC マウス膵癌細胞における CD133 と 癌細胞特性の関連についての検討
3. 学会等名 第30回 若手膵臓研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹野歩、大野彰久、村上正俊、松本一秀、寺松克人、高松悠、藤森尚、大野隆真
2. 発表標題 マウス膵癌細胞における癌幹細胞マーカーCD133 の意義
3. 学会等名 第29回 若手膵臓研究会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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