

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22813

研究課題名（和文）膵臓内細菌と膵管導管異形成に着目した膵癌発生メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of pancreatic cancer development focusing of acinar to ductal metaplasia and pancreatic microbiota

研究代表者

赤穂 宗一郎 (Ako, Soichiro)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：00882854

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト膵癌手術検体ではADM形成が癌細胞周辺で確認され、症例ごとに異なる量が観察された。膵癌内のDNAを用いた細菌叢解析ではADM量と細菌叢の種類や割合には差がなかった。一方、膵癌40症例でADMの多い群と少ない群に分類し2群間での差を評価すると、ADMの多い群では早期に再発を来していることが分かった。In vitroの実験にてADMがOsteopontinやGalectin-1を産生し、細胞外に分泌していることが明らかとなった。さらに、ADMが膵癌細胞内のAktリン酸化を促進していることが明らかになった。これらをより、ADMが癌細胞の増殖や生存への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により膵癌組織内で形成される膵腺管導管異形成(ADM)が膵癌の予後に寄与することが明らかとなり、手術時の再発予後指標の一つとして検討できる可能性を有している。さらに膵腺管導管異形成がサイトカインを産生・分泌し、さらに膵癌細胞内のAktリン酸化を促進することを明らかにした。これは、ADMが膵癌の前がん病変としてだけでなく、膵癌細胞の進展に直接影響を及ぼす重要な意義を有している可能性を意味している。将来的に膵癌内のADM形成を制御し、膵癌進展の抑制する治療への展望が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In human pancreatic cancer surgical specimens, the formation of acinar-to-ductal metaplasia (ADM) was observed around cancer cells, with varying amounts observed in each case. Bacterial analysis using DNA from pancreatic cancer tissue showed no differences in the types or proportions of bacteria based on ADM levels. However, when classifying 40 cases of pancreatic cancer into high ADM and low ADM groups and evaluating the differences between the two groups, it was found that the high ADM group occurred early recurrence. In vitro experiments demonstrated that ADM produced osteopontin and galectin-1 with secretion into the extracellular space. Furthermore, ADM was found to enhance Akt phosphorylation in pancreatic cancer cells. Taken together, these findings suggest that ADM may be involved in the proliferation and survival of cancer cells.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 膵腺管導管異形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本での膵臓癌新規患者は年間 40000 人に上り年々増加の一途をたどっている。腹部超音波・CT・超音波内視鏡などの診断技術は日々進歩しているが、未だにその多くは進行癌として発見されるため 5 年生存率は 8%にとどまっており、予防や治療に対して標的となり得るターゲットが早急に望まれている。また、原因についても K-ras・Smad4・TP53・p16 などの遺伝子変異を中心に報告はあるが、疾病予防につながる直接的な Key factor が必要である。一般的知見として膵癌発生は正常膵管細胞に K-ras、p16、Tp53、Smad4 といった遺伝子が段階的に変異を起こすことで PanIN1 から PanIN2、PanIN3、そして浸潤性膵管癌へと発展していくとされている。これに加え近年、Acinar to Ductal Metaplasia(ADM)が膵癌発生の一因として注目されている。ADM は Inflammation、TGF、EGFR が起因となり Acinar cell が Ductal like cell へと形質が転換する現象であり Vivo・Vitro の両者で証明されている (Sci Rep. Aug 3 2016;6:30904; Cell. Jun 15 1990;61:1121-1135)。ADM は通常生体内で reversible な反応であるが、ADM に K-ras 変異が加わった場合には irreversible となり Ductal like cell は Acinar cell に戻れず、PanIN1A・PanIN1B・PanIN2 が形成される。この状態に他の遺伝子変異が加わると PanIN3・PDAC へと進行すると報告があり、近年 ADM に起因する膵癌発生の研究が注目されている。

一方で、腸管内細菌叢や膵臓内細菌と膵癌発生との関係について新たな知見がでてきている。近年まで膵臓は無菌であると考えられていたが、Geller の報告以降膵臓内にも細菌が認められる報告がされている (Science. Sep 15 2017;357:1156-1160)。また、膵臓内細菌が腸内細菌叢や口腔内細菌叢に類似しており、膵癌発生や治療効果に寄与するとされている。現在までの報告では Gammaproteobacteria、Bifidobacterium pseudolongum、Fusobacterium、H.pylori と膵臓癌の可能性の報告がされており、作用機序として Macrophage を介した炎症の惹起もしくは細菌そのものの直接作用が考えられている。

この二つの事象には膵臓内の炎症が共通しており発癌には非常に重要なファクターであるが、膵臓内細菌の ADM への関与については研究がなされていない状況である。本研究ではその点に着目し、膵臓内細菌が ADM を介した膵癌発生に寄与するか研究を行った。

2. 研究の目的

膵臓内細菌を起点とし、ADM を介した膵癌発生のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究課題では当初(1)ヒト膵臓組織での ADM に関連する膵臓内細菌叢の検索、(2)マウスに抗生剤を投与後の ADM 発生・PanIN 発生の探索、(3)細胞毒素を用いた Vitro 実験の研究計画を予定していた。しかし、下記研究成果の如く、膵臓内細菌叢の検出は既報にあるものの、細菌量自体が極微量のため想定とは異なる結果となった。そこで、ADM が膵癌細胞に及ぼす影響をまず調べることにした。

実験方法として下記の研究による評価を行った

・ヒト膵癌術後標本による ADM 評価と予後評価

術前化学療法を行わず、手術による治療を行った症例において最大断面での HE 染色・免疫組織化学染色(CK19・Amylase)を行い、ADM の個数により ADM High 症例と ADM Low 症例に分類し、背景・予後との比較を行った。それにより ADM が膵癌進展への影響を評価した。

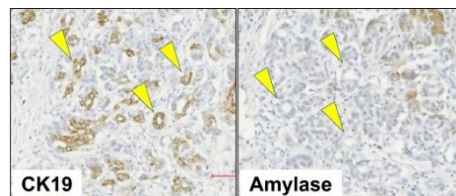
・ADM が膵癌細胞に及ぼす影響の評価(In Vitro)

野生型マウスより膵腺房細胞に TGF を添加し培養することで、ADM が起こり膵管類似細胞へと形質が変わることが分かっている。本研究ではこの細胞を用いて、どのようなタンパクを産生・分泌しているのか、また膵癌細胞に影響を及ぼすかを評価した。

4. 研究成果

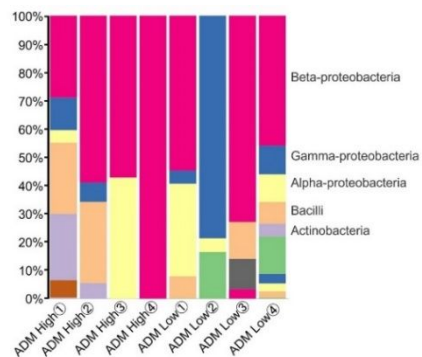
(1) ヒト膵臓組織での ADM に関連する膵臓内細菌叢の検索

ヒト膵癌手術検体において ADM の存在を CK19(膵管上皮マーカー)、Amylase(膵腺房細胞マーカー)を用いて確認した。右図のごとく、CK19 で染色される部位が ADM を認めた。全症例において腫瘍辺縁部位もしくは癌細胞近傍に ADM の形成が確認され、さらに個々の症例により ADM 量が異なっていた。ADM の形成が細菌叢の変化により起こることを仮説とあり、ADM 量を腫瘍最大断面にて



評価し、ADM の多い症例(ADM High)、ADM の少ない症例(ADM Low)に分類した。そのうち、各 4 症例ずつの膵癌組織のパラフィン包埋切片から DNA を抽出し、16s rRNA 細菌叢解析を行った。1 症例の ADM Low 症例を除き、7 症例で Beta-proteobacteria を認めた。また、5 症例で Gamma-

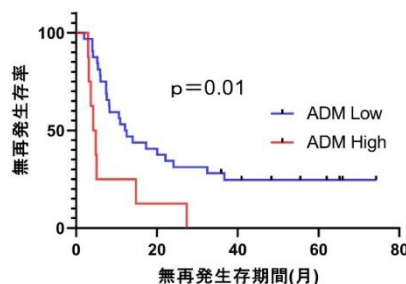
proteobacteria、Alpha-proteobacteria など既報と同様の菌種を検出した。しかし、ADM High と ADM Low の症例において検出する菌種やその割合に差を認めなかった。本研究で腫瘍を含めた DNA 全体量は十分に抽出できたが、細菌 DNA 量は非常に少なかった。膵腫瘍内の細菌 DNA を FFPE から抽出し解析する報告はあるものの、細菌量自体が非常に少なくパラフィン包埋からの期間や FFPE の状態により影響を大きく受けると考えられる。膵頭十二指腸症例において十二指腸の FFPE から DNA を抽出し同様の解析を行ったが、細菌 DNA 量は極微量のため細菌叢解析は困難であると判断した。



(2) 膵癌組織内の ADM の役割

膵癌組織内の細菌叢解析での評価が困難であったため、まず膵癌内での ADM が膵癌にどのような影響を及ぼすのかを評価した。

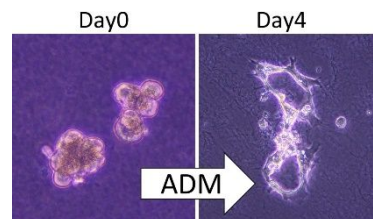
膵癌症例を合計 40 症例集積し、上記と同様に最大断面での ADM 個数により評価し、ADM High と ADM Low に 2 群に分類した。8 症例が ADM High に、32 症例が ADM Low に分類された。両群は UICC Stage ($p=0.31$)、CEA ($p=0.33$)、CA19-9 ($p=0.59$) と予後に起因する因子の差は認めなかった。しかしながら、無再発生存期間はそれぞれ 8.3 カ月 vs 18.2 カ月 ($p=0.01$) と有意な差を認められた。また、両者ともに再発様式の多くは遠隔転移再発であり、両群間で差は認めなかった ($p=1.00$)。



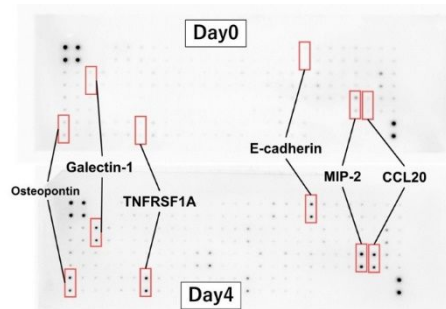
(3) ADM が膵癌細胞に及ぼす影響

1) ADM が分泌するタンパク因子

ADM が癌細胞へ及ぼす影響を確認するために、ADM が分泌するサイトカインを網羅的に検索した。右図のごとく、野生型マウスより膵腺房細胞を単離し、TGF α を添加し培養することで 3-5 日目には膵管類似細胞を形成し ADM を確認可能となる。この膵管類似細胞は膵管マーカーである CK19 が RNA 発現及び免疫蛍光染色にて増強していることで確認している。



ADM を形成した膵管類似細胞でのタンパク産生を評価するためにマウス膵臓から単離した Day 0 の細胞と ADM を形成した Day 4 の細胞からタンパクを抽出し Cytokine array (Ray Biotech) を行った。結果として、Osteopontin や Galectin-1 などの細胞増殖や転移の促進に関連するタンパクを産生していることが明らかとなった (Figure 提示なし)。

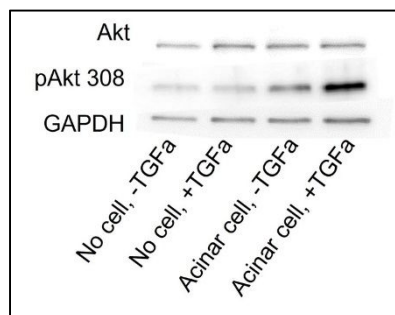


次に実際に ADM を形成した細胞がそれらの因子を分泌しているかを確認するために Day 0 と Day 4 の培養上清を採取し Cytokine array (Ray Biotech) を行った。右図の如く Osteopontin、Galectin-1、CCL20 などのサイトカインが ADM を形成した上清内に有意に分泌されていることが分かった。特に Osteopontin・Galectin-1 は ADM を形成した細胞で産生され細胞外に分泌されていることが分かり、ADM が癌細胞の増殖や転移を促している可能性が示唆された。

2) 膵癌細胞での変化

ADM が膵癌に及ぼす影響を Vitro の変化で確認した。

まず、野生型マウスより膵腺房細胞を単離し上記と同様に TGF を添加し ADM を起こした上清、またコントロールとして TGF を添加せずに培養した細胞の上清を採取した。上清をマウス膵癌細胞株 Pan02 に添加し 48 時間後にタンパクを抽出しタンパク発現の変化を Western blotting で評価した。右図の如く、ADM の起こった細胞からの上清 (Acinar cell, +TGF) では Akt のリン酸化が促されている。Galectin-1 や Osteopontin が関わる Signal pathway には Akt リン酸化が分かっており、ADM が癌細胞の増殖や生存に寄与していることが考えられた。



今後はこれらと膵臓内細菌との関連を生検標本等のサンプルを用いて検討することにより、細菌と ADM 形成の関連性について研究を引き続き進める予定としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------