

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08791

研究課題名(和文) 膵癌発癌と浸潤転移能獲得機構における低分子G蛋白Ralの機能解析

研究課題名(英文) al analysis of small G protein Ral in pancreatic carcinogenesis and acquisition of invasive potential

研究代表者

大塚 英郎 (Ohtsuka, Hideo)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50451563

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)：Ral(Ras like) GTPase(以下、Ral)は、Ras familyに属する遺伝子であり、Rasの下流で活性化し機能する。RasがDriver遺伝子とされる膵癌では、その下流のRalが悪性化に重要である。Ralは、放射線などによるDNA障害時の修復機構(DDR)に深く関与する。我々は、DNA損傷時のDDR機構、特にAtaxia telangiectasia mutated(ATM)分子に着目し、その膵癌での役割、Ralとの関与について研究を行った。本研究により、ATMの発現低下が浸潤・転移能の獲得に関与すること、抗がん剤感受性が低下し術後生存期間が短くなる、との知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATMは、膵癌で変異頻度の高いDDR遺伝子の1つとされており、2-18%に体細胞変異が、1-34%に生殖細胞変異が報告されている。本研究では、膵癌臨床検体におけるATMおよび活性化体リン酸化ATMの発現を検討し、リン酸化ATMの発現が低い症例で生存期間が有意に短く、治療成績が不良であることを明らかにした。また、培養膵癌細胞を用いて、RNA Sequencing法によりATM下流域の遺伝子の発現変化を検討、抗がん剤感受性に深く関与することを明らかにした。ATMとその下流域での分子生物学的メカニズムの解析は、特にその変異陽性症例での新たな治療ターゲットの開発を可能にすると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ral (Ras like) GTPase (Ral) is a member of the Ras family and is activated downstream of Ras. Since Ras is regarded as a driver gene in pancreatic cancer, Ral, downstream of Ras, is important for its malignancy.

Ral is deeply involved in the repair mechanism (DDR) of DNA damage caused by radiation. We focused on the DDR mechanism of DNA damage, especially the Ataxia telangiectasia mutated (ATM) molecule, and investigated its role in pancreatic cancer and its relationship with Ral. We found that ATM knockdown is involved in the acquisition of invasive and metastatic potential, and that ATM is associated with decreased sensitivity to anticancer drugs and shorter postoperative survival.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 ATM Ral

1. 研究開始当初の背景

Ral(Ras like) GTPase(以下, Ral)は, Ras family に属する低分子量 GTP 結合蛋白であるが, その活性化因子 RalGEF は Ras の標的分子であり, Ral は Ras の下流で活性化し機能する. Ras が高頻度に変異し, Driver 遺伝子とされる膵癌では, その下流で機能する Ral が悪性化に重要であると示唆される. 我々は, 免疫不全マウスへの移植実験で, RalGAP 発現を抑制した膵癌細胞の腫瘍増殖, 浸潤・転移が著明に亢進することを明らかにした. 本研究では, 当初, これまでの成果を発展させ, RalGAP cKO マウス等を駆使して膵癌の悪性化, 浸潤・転移能の獲得機序を分子レベルで解明するとともに, ヒト検体の解析より Ral-RalGAP の臨床的意義を明らかにし, 膵癌治療における新たな標的分子としての可能性を検証することを目的とした.

他方, Ral の活性は, 放射線などによる DNA 障害時の修復機構 (DDR)において重要であるとの報告が散見される. すなわち, 膵癌などの放射線治療抵抗性の癌腫では, 放射線照射後の修復機構, 癌細胞の生存に Ral の活性化が深く関与するとされる. 我々は, DNA 損傷時の DDR 機構, 特に, Ataxia telangiectasia mutated(ATM)分子に着目し, その膵癌での役割, Ral との関与について興味深い知見が得られた. これまでに, ATM の発現低下が, 膵癌の悪性化, 浸潤・転移能の獲得に関与すること, 抗がん剤感受性が低下し, 術後生存期間が短くなることが示された. ATM は, 毛細血管拡張性小脳失調症 (ataxia telangiectasia) の原因遺伝子として, クローニングされた遺伝子であり, DNA 損傷応答経路における key molecule である. 放射線, 化学物質による DNA の二重鎖切断により活性化され, p53, Chk2, BRCA1 などの細胞内基質をリン酸化することで DNA 損傷時の細胞周期の停止や, アポトーシス誘導などに中心的な役割を果たす. 近年, 家族性膵癌患者における関連遺伝子の解析で, ATM は BRCA に次いで 2 番目に変異頻度の高い遺伝子であることが明らかとなり, その膵癌発癌, 悪性化メカニズムへの関与が注目されている. また, ATM や BRCA に変異を有する膵癌では, 予後不良であることが知られているが, その原因として, 標準治療として行われるゲムシタピン, 5FU 系, タキサン系などの抗がん剤の奏功率が低いことが示唆されている. 本研究では, 放射線感受性, 抗がん剤感受性における, ATM および Ral の機能解析について, より詳細な検討を行うことで, Ral-RalGAP の臨床的意義を明らかにすることとした.

2. 研究の目的

膵癌臨床検体における ATM およびその活性化体であるリン酸化 ATM の発現を検討しその治療成績との相関を検討すること, ATM 発現低下による癌悪性化メカニズムを, 培養膵癌細胞を用いて検討し, 抗がん剤感受性への影響について検証することを目的とした.

3. 研究の方法

(1)膵癌手術症例での癌組織内 ATM/リン酸化 ATM(p-ATM)発現と, 術後治療成績の解析

対象: 東北大学病院で外科的切除を受けた 144 名の PC 患者: 男性(n=82), 女性(n=62), 年齢 39-88 歳: 年齢: 39-88 歳.

免疫組織化学染色 (IHC): ATM および p-ATM の発現は, それぞれ特異的抗体を用いた免疫組織化学により解析した.

(2)ATM 発現を Knockdown した膵癌培養細胞増殖能と遊走能の解析

細胞増殖アッセイ (Cell proliferation assay): ATM 発現を siRNA の手法で knockdown し, MTT assay により癌細胞の増殖能を評価した.

創傷治癒アッセイ (Wound healing assay): 癌細胞の遊走能を創傷治癒アッセイで検証した.

(3)膵癌細胞における ATM 下流遺伝子の探索

RNA シークエンシング (RNA-seq): ATM knockdown 膵細胞から mRNA を抽出し, RNA シークエンシングを行うことで, 膵癌細胞における ATM 下流遺伝子の探索を行なった.

リアルタイム定量 PCR (RT-qPCR): RNA-seq で明らかになった候補遺伝子をリアルタイム定量 PCR の手法で検証した.

ウェスタンブロッティング (Western blotting): さらに, Western blotting によりタンパク質レベルでの発現について検証した.

(4)アポトーシス関連シグナルの解析

HIF-1 とアポトーシス関連タンパク質の発現量: HIF-1 α およびアポトーシス関連タンパク質 (Bad および Bcl-2) の発現をウェスタンブロットで調べた.

(5)Gemcitabine 感受性アッセイ

抗がん剤ゲムシタピンの感受性を MTT アッセイで調べた.

4. 研究成果

膵癌外科切除症例 144 例で, ATM とリン酸化 ATM の発現を免疫組織化学により検討し, ATM 低発現を 15.3%の症例に, リン酸化 ATM 低発現を 27.5%の症例に認めた. 対象症例で治療成績について検討し, リン酸化 ATM の発現が低い症例で生存期間が有意に短く, 治療成績が不良であること

を明らかにした。次に、培養腺癌細胞 MIA-PaCa2 と SUI1-2 で、SiRNA より ATM 発現を特異的に抑制し、悪性化メカニズムを検討した。ATM 発現抑制細胞では、細胞増殖能と移動能の上昇が認められた。RNA Sequencing 法により変動する遺伝子を網羅的に解析し、癌関連遺伝子 MET、Netrin-1(NTN1)を候補遺伝子として同定した。Western blot 法および RT-PCR 法により、MET と NTN1 の発現が ATM 発現抑制細胞で有意に増加していることを明らかにした。ATM 発現抑制細胞では ROS の蓄積と HIF-1 の発現上昇が認められ、これらを介した MET と NTN1 の発現誘導が示唆された。さらに、細胞毒性試験により ATM 発現抑制細胞でゲムシタピン感受性が低下していること、抗アポトーシス蛋白 BCL-2 / BAD の発現が上昇していることを明らかにした。以上の結果より、ATM の発現低下が ROS 蓄積、HIF-1 を介して MET、NTN1 を誘導、腫瘍細胞増殖、薬剤耐性を促し、予後不良となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Xun Jingyu, Ohtsuka Hideo, Hirose Katsuya, Douchi Daisuke, Nakayama Shun, Ishida Masaharu, Miura Takayuki, Ariake Kyohei, Mizuma Masamichi, Nakagawa Kei, Morikawa Takanori, Furukawa Toru, Unno Michiaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Reduced expression of phosphorylated ataxia-telangiectasia mutated gene is related to poor prognosis and gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-023-11294-3	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 -

1. 著者名 Cao Mingxin, Li Xinming, Trinh Duc-Anh, Yoshimachi Shingo, Goto Kota, Sakata Natsumi, Ishida Masaharu, Ohtsuka Hideo, Unno Michiaki, Wang Yuxia, Shirakawa Ryutaro, Horiuchi Hisanori	4. 巻 299
2. 論文標題 Ral GTPase promotes metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma via elevation of TGF- β 1 production	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104754 ~ 104754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.104754	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 大塚英郎、有明恭平、海野倫明
2. 発表標題 膵癌の進展機構におけるLRRFIP1の機能解析と治療標的としての可能性
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大塚英郎、荀 静宇、宮崎健人
2. 発表標題 膵癌細胞におけるAtaxia-telangiectasia Mutated (ATM)の発現とその機能解析
3. 学会等名 第123回日本外科学会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	堀内 久徳 (Horiuchi Hisanori) (90291426)	東北大学・加齢医学研究所・教授 (11301)	
研究 分担者	石田 晶玄 (Ishida Masaharu) (90619660)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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