

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15368

研究課題名（和文）ヒト膵管上皮細胞におけるKRAS遺伝子変異による代謝変化が惹起する癌化機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of pancreatic carcinogenesis by metabolic changes in human pancreatic epithelial cells with mutated kRas gene

研究代表者

鈴木 辰典（Suzuki, Tatsunori）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40882890

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌ではKRAS遺伝子変異がほぼ必発であるが、その変異が起きた後、どのような生物学的変化が生じて他の遺伝子の変異が蓄積されて癌化するのかが、明確な分子機構は分かっていなかった。本研究では、KRAS遺伝子変異がアスパラギンを中心とした細胞内のアミノ酸代謝に変化をもたらし、その代償機構としてのオートファジーがKRAS遺伝子変異を持つ膵管上皮細胞の生存に必須であることを同定し、そこへの介入による発癌予防の可能性をみいだした。この結果は、KRAS遺伝子変異を導入したヒト正常膵管上皮細胞が膵発癌過程の初期現象において、KRAS遺伝子変異以降の変異蓄積の機序を明らかにしたものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、膵発癌の初期過程に関わる因子、遺伝子変異の蓄積機構を解明することができた。癌細胞が引き起こす代謝リプログラミングに関しては多くの知見が得られつつあるが、本研究はKRAS変異を導入したヒトの正常膵管上皮細胞を解析することで膵発癌の初期過程を解明する研究を進めることができた。特に「遺伝子変異がもたらす代謝変化が更なる遺伝子変異をもたらす発癌過程を促進する可能性」については十分に検討されておらず大きなブレイクスルーをもたらす可能性がある。本研究で、KRAS遺伝子変異以降の現象に対する介入による発癌予防、代謝変化を利用した膵癌の早期診断法の確立など新規開拓・創生につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Mutations in the KRAS gene almost always occur in pancreatic cancer, but the clear molecular mechanism by which biological changes occur after this mutation occurs and mutations in other genes accumulate and turn into cancer is not known. In this study, we identified that KRAS gene mutations cause changes in intracellular amino acid metabolism, mainly asparagine, and that autophagy as a compensatory mechanism is essential for the survival of pancreatic ductal epithelial cells with KRAS gene mutations. We discovered the possibility of preventing cancer through intervention. These results can be said to reveal the mechanism by which human normal pancreatic ductal epithelial cells into which KRAS gene mutations are introduced accumulate mutations after KRAS gene mutations during the early stages of pancreatic carcinogenesis.

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

膵癌は早期診断が困難であり、治療抵抗性も高いことから、5年生存率が8%と低い難治癌のひとつである。そのため、発癌過程の解明による発癌防止法、早期診断法、新規治療法の開発が望まれる。膵発癌初期において KRAS 遺伝子変異はほぼ必発であるが、最終的に発癌に至るまでは、そこにさらなる遺伝子変異が蓄積して癌化する、多段階発癌モデルが提唱されている。しかし、膵発癌の必要条件と考えられる KRAS 遺伝子変異が起きた後の多様な変化が、どのように生じて、どのように更なる遺伝子変異を惹起して発癌へと向かうのか、明確な分子機序は分かっていない。いっぽう、急速に増殖する癌細胞は代謝リプログラミングを行い、増加した代謝上の要求を満たすことが知られ、膵癌においてもグルコース代謝、グルタミン代謝が変化することが知られている。しかしながら、「KRAS 変異が導入された膵管細胞にさらなる遺伝子変異が蓄積して、最終的に発癌へ至る機序」は明確ではない。最近の重要な報告として、正常の膵管細胞において高血糖が O-GlcNAc 化を亢進させ、リボヌクレオチドレダクターゼの活性を低下させることによりヌクレオチドプールの不均衡が起こり、KRAS 変異が生じやすくなることが報告されている (Hu et al. Cell Metab 2019, 29)。この報告は「代謝変化が KRAS 変異をもたらす」というものであるが、それを踏まえると、「膵管細胞に生じた KRAS 変異がさらに代謝変化を引き起こし、その代謝変化によって膵癌の発癌過程で頻発する他の遺伝子 (例えば INK4A、TP53、SMAD4 など) の変異を惹起する可能性」も考える。そのような背景の中で、「KRAS 遺伝子変異が膵癌を惹起する分子機構」という問いを、代謝リプログラムの観点から解明することは、膵発癌防止をめざすという意味でも大きな意義があり、難治癌と言われる膵癌診療に革新をもたらすことができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集法を用いて KRAS 遺伝子変異を導入したヒト正常膵管上皮細胞を対象として、遺伝子発現変化や代謝変化をはじめとする表現型を検討し、膵発癌防止をめざした膵発癌の初期現象を明らかにすることを目的とする。この検討によって、膵発癌の初期過程に関わる因子、さらなる遺伝子変異の蓄積機構を解明することができれば、膵発癌抑制の標的として新たな研究に展開できる有用な基礎的知見が得られると考えられる。

癌細胞が引き起こす代謝リプログラミングに関しては多くの知見が得られつつあるが、多くの他の研究が既に癌化した膵癌細胞株やマウスモデルを対象として解析を行っている。それに対して、本研究は KRAS 変異を導入した、ヒトの正常膵管上皮細胞を解析することで膵発癌の初期過程を解明する研究を進めることが第一の特色である。特に「遺伝子変異をもたらす代謝変化が更なる遺伝子変異をもたらす発癌過程を促進する可能性」については十分に検討されており、オリジナリティが高く、また膵癌研究分野にも大きなブレイクスルーをもたらす可能性がある。

本研究で代謝変化に伴う新しい膵発癌機序を同定できれば、KRAS 遺伝子変異以降の現象に対する介入による発癌予防、また代謝変化を利用した膵癌の早期診断法の確立など、その分野の新規開拓・創生につながる可能性もあり幅広い展開が期待できると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、KRAS 変異を導入したヒト正常膵管上皮細胞を用いて「KRAS 遺伝子変異が起きた後の、さらなる遺伝子変異が蓄積されて発癌へと向かう機序」を、特に代謝リプログラミングの観点から明らかにするために、代謝変化が細胞の生存/増殖を促すのみならず「変異蓄積の原因」となりうるかを検証する。すなわち、膵癌発生の初期の変化に及ぼす KRAS 遺伝子変異に続く分子生物学的な変化を明らかにするために、不死化したヒト正常膵管上皮細胞に CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて KRAS 遺伝子に変異を導入し、遺伝子発現変化や代謝変化をはじめとする KRAS 変異が惹起する表現型を検討し、膵発癌防止をめざした膵発癌の初期現象を明らかにする。

また、その結果に基づいて、特定の栄養素を添加あるいは欠失させる、あるいは、特定の遺伝子のノックインあるいはノックアウトによる表現型のレスキューも検討する。さらに KRAS 遺伝子変異をもたらすそれ以降の病態に関連する生物学的変化への介入法へと検討を進める。KRAS 遺伝子変異が引き起こす表現型をこのように検討することで癌化の初期変化を捉えることができると考えられる。

具体的には、下記項目を検討する。

1) KRAS 変異細胞の樹立

膵癌で頻度の高い KRAS (G12V) 変異をヒト膵管上皮細胞にノックインするために CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行う。

2) KRAS 変異細胞での代謝性変化の網羅的解析

KRAS 遺伝子変異をノックインした細胞での代謝性変化を網羅的なメタボロミクスで解析する。具体的には、 1.0×10^6 個の細胞を 5% マンニトール水溶液で 2 回洗浄し、メタノールを添加した。Human Metabolome Technologies (HMT) から提供された内部標準を添加し、遠心ののち、限外ろ過し、除タンパクを行った。試料を HMT に送付し、代謝物質の測定および解析を C-SCOPE サービスタとして依頼した。

3) KRAS 変異とオートファジーの検討

メタボロミクスの結果から、KRAS 変異細胞の細胞生存にオートファジーが重要な役割を果たしていることが示唆されたため、オートファジー阻害薬であるクロロキンを投与することで細胞生存がどう変化するかを検討した。

4. 研究成果

1) KRAS 変異細胞の樹立

まず CRISPR/Cas9 により HPNE 細胞に KRAS (G12V) 変異の導入を試みた。上記方法の如く、トランスフェクション後、限界希釈 nested PCR ddPCR の手順で KRAS (G12V) 変異細胞の割合が高い集団を抽出し、KRAS 変異を有するモノクローナルな細胞の抽出を行った。4 回の選択過程を経て、#152622、#152623 の 2 クローンが抽出された(図 1a-d)。4 回の選択過程の段階では残存する ssODN による影響を除外するため nested PCR 後に ddPCR で確認を行った。最終的に抽出された #152622、#152623 の 2 クローンについてはゲノム DNA を ddPCR で測定すると、変異率が 50% ということが確認され、KRAS 変異がヘテロに導入されたことが分かった(図 1e)。#152622 クローンを HPNE-cKRAS とし、以下の実験に使用した。

続いてレンチウイルスベクターを用いて HPNE 細胞に変異型 KRAS (G12V) を強制発現させた。こちらは hygromycin でセレクションを行った。これを HPNE-vKRAS とし以下の実験に使用した。

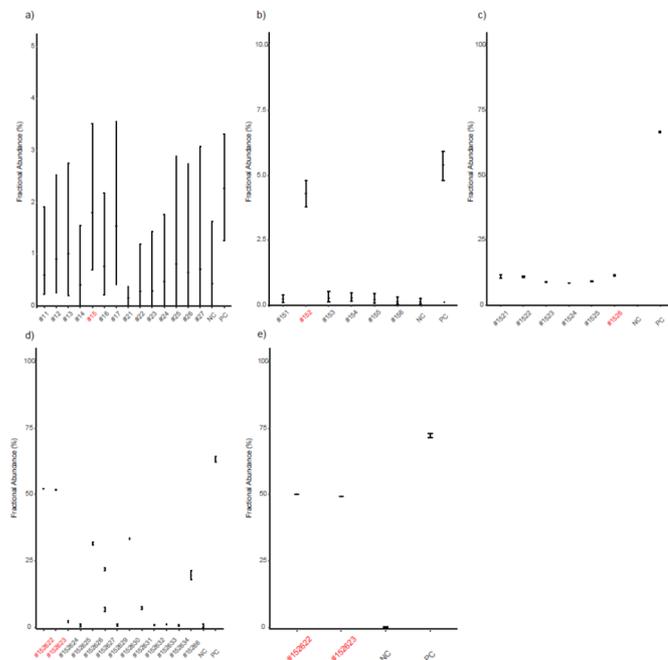


図 1(左図) 限界希釈および ddPCR を用いたモノクローナルクローンの抽出

a) ssODN (kras#1) でトランスフェクションを行った細胞集団を 96well に播種し、そのうちの 7well をランダムに抽出し、#11- #17 とした。同様に ssODN (kras#2) 由来のものを #21- #27 とした。Nested PCR 後に ddPCR を施行し、変異率の高い #15 の細胞集団を採用し、b) に用いた。b-d) a) と同様の手順で行った。b) で #152、c) で #1526、d) で #152622、#152623 を採用した。e) d) で抽出した #152622、#152623 のゲノム DNA を抽出し、ddPCR を行った。変異率が 50% ということが確認され、KRAS 変異がヘテロに導入されたことが確認された。エラーバーはポアソン分布算出の 95% 信頼区間を表す。

HPNE-cKRAS、HPNE-vKRAS に KRAS 変異が導入されたことを Western Blotting でも確認した(図 2)。KRAS 下流の Erk、Akt のリン酸化が亢進することも確認された。

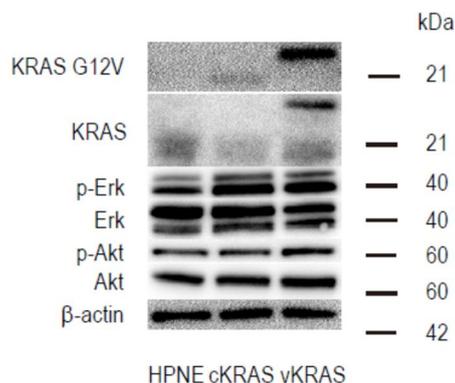


図 2 KRAS 変異細胞の導入

KRAS 変異が導入されたことを確認するために HPNE、HPNE-cKRAS、HPNE-vKRAS から蛋白溶解液を抽出し、Western blotting を行い、想定通り KRAS 変異が導入されていることを確認した。

2) KRAS 変異細胞での代謝性変化の網羅的解析

メタボローム解析では KRAS 変異細胞ではアミノ酸が全体的に減少しており、特にアスパラギン、プロリン

などの非必須アミノ酸の減少が目立った(下図 3)。KRAS 変異細胞では各種アミノ酸トランスポーターの発現が上昇しており、アミノ酸を細胞外から取り込み、積極的に消費していることが予想された。アスパラギン合成酵素の発現は KRAS 変異の有無に関わらず大きな変化は認めず、アミノ酸合成自体は変化しないものと考えられた。

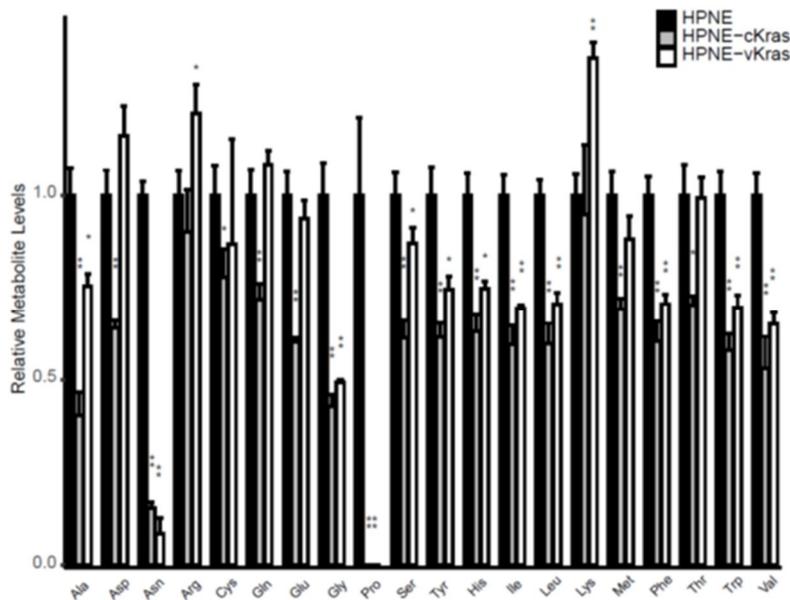


図3 KRAS 変異によるアミノ酸の減少

KRAS 変異に伴う代謝変化を包括的に調べるためにメタボローム解析を行った。HPNE 細胞との相対値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

ここで、チロシル tRNA 模倣薬であるピューロマイシンの取り込みによって蛋白翻訳の程度を評価すると KRAS 変異細胞で蛋白合成が亢進していることが確認された(下図 4)。なお、グルタミン欠乏培地で同様の検討をすると KRAS 変異の有無に関わらず、蛋白合成が停止し、グルタミンが蛋白合成に必須であることも確認された。

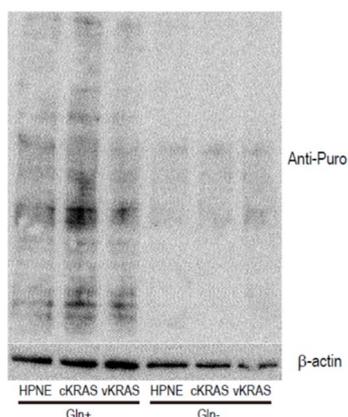


図4. KRAS 変異による蛋白合成の亢進

グルタミン含有培地およびグルタミン欠乏培地で 24 時間培養し、蛋白溶解液採取の 10 分前に Puromycin (90 μM) を添加した。Western blotting を行い、Puromycin を取り込んだ蛋白を検出することで蛋白翻訳の程度を評価した。

3) KRAS 変異とオートファジーの検討

KRAS 変異細胞は mTOR 経路を活性化させ、Biomass の合成を進める結果、原料となるアミノ酸が著減することが確認された。アスパラギン、グルタミンなどのアミノ酸は細胞増殖に必須であり、消費の速さを考慮するとすぐに栄養欠乏状態に至ってしまうと考えられ、代償機構として、アミノ酸のリサイクル機構としてオートファジーの関与も推察された。

そこでオートファジー阻害薬であるクロロキンを投与すると KRAS 変異細胞での増殖が抑制されることが確認された(下図 5)。

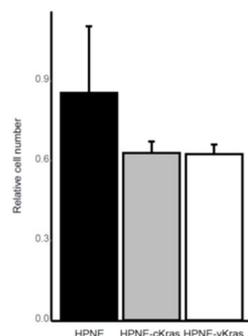


図5 オートファジー阻害による KRAS 変異細胞の増殖抑制

クロロキン(5 μM) を投与し、48 時間後に細胞数を評価した。エラーバーは標準誤差を示す。

本研究においては KRAS 変異による代謝リプログラミングによって細胞内のアミノ酸組成が大きく変化することが示された。前向きコホート試験において血中分岐鎖アミノ酸と将来の膵発癌リスクの相関が報告されているが、これも膵発癌過程における代謝リプログラミングを反映しているものと考えられる。今後、膵癌早期の代謝変化をより詳細

に解明することで代謝物に着目した膵癌早期診断法の確立も期待されると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Seimiya Takahiro, Suzuki Tatsunori, Iwata Takuma, Kishikawa Takahiro, Sekiba Kazuma, Shibata Chikako, Ishigaki Kazunaga, Fujiwara Hiroaki, Oyama Hiroki, Kanai Sachiko, Sato Tatsuya, Nakai Yousuke, Ishibashi Rei, Moriyama Masaru, Nakagawa Ryo, Ijichi Hideaki, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Combination of serum human satellite RNA and miR-21-5p levels as a biomarker for pancreatic cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106021 ~ 106021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106021	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 Suzuki Tatsunori, Kishikawa Takahiro, Sato Tatsuyuki, Takeda Norihiko, Sugiura Yuki, Seimiya Takahiro, Sekiba Kazuma, Ohno Motoko, Iwata Takuma, Ishibashi Rei, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Mutant KRAS drives metabolic reprogramming and autophagic flux in premalignant pancreatic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 505 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-021-00326-4	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 Kato H, Tateishi K, Fujiwara H, Nakatsuka T, Yamamoto K, Kudo Y, Hayakawa Y, Nakagawa H, Tanaka Y, Ijichi H, Otsuka M, Iwadate D, Oyama H, Kanai S, Noguchi K, Suzuki T, 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 Suzuki T, Kishikawa T, Sato T, Takeda N, Sugiura Y, Seimiya T, Sekiba K, Ohno M, Iwata T, Ishibashi R, Otsuka M, Koike K	4. 巻 -
2. 論文標題 Mutant KRAS drives metabolic reprogramming and autophagic flux in premalignant pancreatic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Gene Ther.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-021-00326-4	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
---------	---------