

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16043

研究課題名（和文）悪液質における膵癌と脂肪の相互作用の解明

研究課題名（英文）Relations between pancreatic cancer and adipose tissue under cachexia

研究代表者

佐藤 克彦（Sato, Katsuhiko）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：40838843

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）：膵尾部癌のモデルマウスの性腺周囲脂肪が担癌状態で減少することを確認した。性腺周囲脂肪から分泌されるPTX3が癌を植え込んだマウスの脂肪でsham群と比してmRNA発現が増強し、血中PTX3濃度が上昇することをELISAで確認した。担癌マウスでPTX3が高く、癌植え込み時と3週間後の体重変化量と血清PTX3が相関した。転移を伴う膵癌患者での検討を行うと、PTX3高値は予後不良因子であり、炎症性マーカーである好中球リンパ球比やアルブミン、腫瘍マーカーであるCA19-9と相関することが判明した。またPTX3高値は化学療法導入前後の筋肉量、内臓脂肪の変化量のマーカーであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪液質は膵癌を含む多くの癌腫で予後不良因子であることが知られている。膵癌同所移植モデルマウスで担癌状態となることで内臓脂肪が減少することを確認し、内臓脂肪から分泌される悪液質マーカーをRNA sequenceで検討した。同定された血清マーカーPTX3は、遠隔転移を伴う膵癌患者において、炎症と関連する予後因子であり、内臓脂肪、筋肉量減少のマーカーであった。PTX3は膵癌患者の悪液質進行のマーカーとして期待される。

研究成果の概要（英文）：Perigonadal fat weight decreased in mice with orthotopic tumors compared to those without tumors. By RNA sequencing and real-time PCR validation, pentraxin 3 (PTX3) was identified as a secreted protein-encoded gene whose expression was significantly higher in the perigonadal fat of mice with orthotopic tumors than in that of mice without orthotopic tumors. Serum PTX3 levels correlated with body weight change and were higher in mice with orthotopic tumors than in those without tumors. In 84 patients diagnosed with metastatic pancreatic cancer, patients with high serum PTX3 levels showed a greater visceral fat loss/month and skeletal muscle mass index (SMI) decrease/month than those with low serum PTX3 levels. High serum PTX3 was an independent risk factor for visceral fat loss, decreased SMI, and poor prognosis.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 悪液質

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は5年生存率が10%未満の予後不良癌である。膵癌は閉塞性黄疸や十二指腸浸潤など様々な合併症を引き起こすことが知られる。多くの癌種で近年悪液質が予後因子として注目されている。悪液質は進行性かつ不可逆な脂肪量や筋肉量の減少として定義されている。悪液質は、癌による全身炎症が主体となった病態に、食事摂取不良などが合わさった病態として知られている。悪液質は予後だけでなく、化学療法の認容性にも影響を与えるものであることが近年報告されており、悪液質の状態を把握することは膵癌治療において重要となる。既報においては、悪液質の指標の一つである筋肉量減少は予後と死亡率の独立したリスクファクターであり (Fearon et al. Lancet Oncology 2011)、筋肉量の少ない患者は肥満であっても化学療法の有害事象が起こりやすく、FOLFIRINOX 投与患者において、筋肉量だけではなく脂肪量の減少も予後に関連する因子であると報告されている (Kays et al. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2018)。またマウスの検討では、膵癌マウスモデルにおいて Fibroblast Growth Factor 21 投与による治療介入は内臓脂肪量の減少を抑制し、膵前癌病変である Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) を抑制したと報告されており (Luo et al. Gastroenterology 2019)、悪液質と膵癌進展にも一定の関連性がある可能性が示唆された。申請者は、悪液質における脂肪および筋肉の減少を抑制することが膵癌の制御、ひいては化学療法中の全身状態の保持および予後延長につながるのではないかという仮説を立てた。体内最大の内分泌臓器である脂肪が膵癌の担癌状態で減少することに注目し、担癌状態における癌と脂肪の相互作用を解明すべく、本研究課題を立案した。

2. 研究の目的

膵癌の担癌状態では、膵癌患者は悪液質を呈し内臓脂肪が減少する。本研究ではヒト検体では解析することが困難な、担癌状態での内臓脂肪 (性腺周囲脂肪) を膵癌モデルマウスで解析することで、担癌状態で分泌が変化する内臓脂肪由来の分泌タンパクを同定し、その機能を解析することで、癌と脂肪の相互連関および悪液質の病態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

膵同所移植モデルにおける候補タンパクの性腺周囲脂肪内 mRNA 発現および血中分泌の確認

我々が独自に樹立したマウス由来の膵癌細胞株 mPKC1 を用い、15 週齢のマウスの膵尾部に同細胞を植え込むことで同所移植モデルを作成する。続いて、性腺周囲脂肪が 15 から 18 週齢の期間で同所移植群にて sham operation 群と比して体重や性腺周囲脂肪重量が減少することを確認する。続いて、性腺周囲脂肪からの分泌が sham 群と比べて同所移植群で増加および減少する候補タンパクの性腺周囲脂肪における mRNA 発現を RT-PCR 法にて確認する。同候補タンパクを性腺周囲脂肪の RT-PCR および血清の ELISA を行うことで、膵尾部癌同所移植で同タンパクの発現が増強し、かつ血清中に分泌されていることを確認する。

癌細胞および脂肪細胞の共培養

癌細胞と脂肪細胞の非接触共培養をマウス膵癌細胞株 mPKC1 細胞と脂肪に分化誘導した 3t3 細胞で行う。単培養および共培養下の細胞増殖を WST Assay で、アポトーシスを Caspase 3/7 Assay, Annexin V Assay などによって評価する。同所移植モデルの性腺周囲脂肪の transcriptome 解析で抽出した各候補タンパクの mRNA 発現を単培養および共培養下の癌細胞および脂肪細胞で RT-PCR 法を用いて評価し、培養上清中の分泌量を ELISA 法で確認する。

各候補タンパクが癌細胞および脂肪細胞に与える影響の解析

上記実験系でマウス実験で癌を植え込むことで発現が増強し血清中の濃度が上昇する、かつ細胞実験で癌細胞と共培養をすることで脂肪細胞内での発現が増強し上清中の濃度が上昇する候補タンパクを同定する。続いて、各候補タンパクの recombinant を膵癌細胞株 mPKC1 および脂肪細胞株 3t3 に添加し、同タンパクが癌細胞および脂肪細胞に与える影響を WST Assay, Caspase 3/7 Assay, Annexin V Assay などによって評価する。その結果を受けて、細胞増殖やアポトーシスに変化があれば、増殖シグナル (ERK, AKT etc) やアポトーシス関連蛋白 (mcl-1, bcl-x1) などの発現を評価する。

ヒト検体を用いた検討

化学療法目的に入院された転移性膵癌患者の血清を用い、診断時の候補タンパクの経時変化を評価する。体重や血清アルブミン値に加えて、CT 画像から内臓脂肪の面積を測定し、悪液質や予後と候補タンパクと関係性を評価する。

4. 研究成果

腭同所移植モデルにおける候補タンパクの性腺周囲脂肪内 mRNA 発現および血中分泌の確認
通常免疫を持つ 15 週齢の B16J マウスにマウス由来腭癌細胞株 mPKC1 を腭尾部に同所移植することで、腭尾部癌同所移植モデルを作成した。18 週齢において体重および性腺周囲脂肪が sham 群と比して同所移植群で減少していることを確認した。性腺周囲脂肪減少が高脂肪食負荷をおこなった肥満マウスでより顕著であったため、高脂肪食負荷マウスを使用している以下の解析を行った。同所移植群および sham operation 群の 18 週齢の性腺周囲脂肪を採取し、RNA Sequence を施行した。結果、多くの癌遺伝子が抽出され、RNA 抽出の際に腹膜播種した成分が混入していることを考慮し、腫瘍部の RNA Sequence を追加し、性腺周囲脂肪の RNA Sequence 結果と比較することで、脂肪細胞由来の分泌蛋白で癌を植え込むことで増加する因子を抽出した。結果、Sfrp2, SrpX, PTX3 が抽出された。マウスの性腺周囲脂肪の RT-PCR および血清 ELISA で同所移植群でともに発現および濃度上昇を認めた PTX3 を悪液質マーカーの候補分子と考え解析を継続する方針とした。

癌細胞および脂肪細胞の共培養

癌細胞と脂肪細胞の非接触共培養をマウス腭癌細胞株 mPKC1 細胞と脂肪に分化誘導した 3t3 細胞で行った。共培養で癌細胞の増殖に影響はなかった。PTX3 が癌細胞と共培養した際に脂肪細胞での発現が増強し、培養上清中の ELISA で分泌が増加することが確認された。

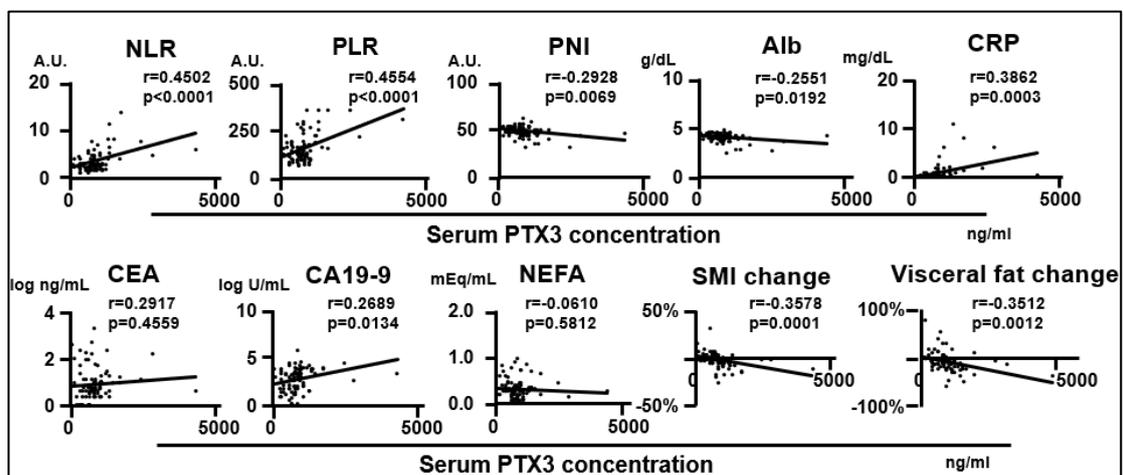
各候補タンパクが癌細胞および脂肪細胞に与える影響の解析

PTX3 の recombinant を腭癌細胞株 mPKC1 および脂肪細胞株 3t3 に添加し、同タンパクが癌細胞および脂肪細胞に与える影響を incuycyte® ライブセル解析システム (ザルトリウス) を用いて評価した。結果、PTX3 は癌細胞の細胞増殖に影響を与えなかった。

ヒト検体を用いた検討

現在の標準治療であるゲムシタビン+アブラキサン療法が保険収載された 2014 年 9 月以降 2020 年 12 月までに当院を受診された切除不能腭癌患者 170 人のうち化学療法導入前の血清保存があり、遠隔転移があり、化学療法導入前後の CT 検査が施行されていた 82 例を対象とし、解析を行った。血清中 PTX3 濃度は control の大腸ポリープ患者群と比して腭癌患者で高値であった。血清中 PTX3 は neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), platelet to lymphocyte ratio (PLR), prognostic nutrition index (PNI)、Albumin といった炎症性マーカーおよび CA19-9 と関連した (下記図)。PTX3 を中央値で高値群および低値群に分けると PTX3 高値群は予後不良であった。続いて、PTX3 と第 4 腰椎レベルにおける内臓脂肪および systemic muscle index について評価を行った。内臓脂肪 5%/month 減少に寄与する因子は単変量解析で mGPS、CRP、PTX3 であった。多変量解析では、PTX3 (HR 5.19, p=0.002) が唯一の因子であった。SM 減少に寄与する因子は単変量解析で PTX3 と治療前 SMI 高値であった。多変量解析では、PTX3 (HR 9.43, p<0.001) が唯一の因子であった。PTX3 は性腺周囲脂肪減少および SMI 減少とともに影響を与えた。

上記より、腭癌同所移植モデルマウスの性腺周囲脂肪より同定した PTX3 は、炎症と関連した予後因子であり、筋肉量および内臓脂肪量減少の血清マーカーであることが示された。



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