

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19421

研究課題名（和文）膵癌の新たなoriginの同定～膵内分泌細胞を由来とする新仮説の提唱～

研究課題名（英文）Characterization of islet-derived pancreatic cancer

研究代表者

藤谷 与士夫（FUJITANI, Yoshio）

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30433783

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：膵がんは早期発見が困難ながん種であり、本邦における5年生存率は他のがんに比べて極端に低い。膵臓は腺房細胞、膵管細胞そして膵ランゲルハンス島（内分泌細部）の3つのコンパートメントから成るが、膵がんは腺房細胞をoriginとしてADM (acino-ductal metaplasia)を経て発生すると現在は考えられている。本研究では、我々が他の目的の実験の過程で偶然に開発した、膵ランゲルハンス島に存在する内分泌細胞の一つであるPP細胞を起源として悪性度の高い膵がんを発生するユニークな動物モデルを分子レベルで解析することにより、膵がんの新奇発症経路を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんの5年生存率は、胃がんなど他のがん種に比べて極端に低い。早期の診断が難しいのが原因で、診断されたときは病気が進んでいることが多く、早期診断技術と治療法の開発が喫緊の課題となっている。膵臓がんの起源は従来、主に消化酵素の生成を担う外分泌細胞と考えられてきた。本研究では膵島内の内分泌細胞の一つ、PP細胞に着目。遺伝子組み換えマウスを使い、この細胞において、がん遺伝子を活性化させると膵臓がんが極めて早期に発症する結果が得られた。今後、PP細胞から発症する膵臓がんの詳しい特徴が明らかにされることにより、治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The five-year survival rate for pancreatic cancer is extremely low compared to other types of cancer such as stomach cancer. This is due to the difficulty in diagnosing the disease at an early stage. When the disease is diagnosed, it is often in an advanced stage, making the development of early diagnosis techniques and treatment methods an urgent issue. The origin of pancreatic cancer has conventionally been thought to be exocrine cells, which are mainly responsible for the production of digestive enzymes. In this study, we focused on PP cells, one of the endocrine cells in the pancreatic islets. Using genetically-modified mice, the researchers found that activation of oncogenes in these cells resulted in the extremely early development of pancreatic cancer. It is expected that the detailed characteristics of pancreatic cancer that develops from PP cells will be clarified in the future, leading to the development of therapeutic methods.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：膵島 PP細胞 膵がん 内分泌細胞

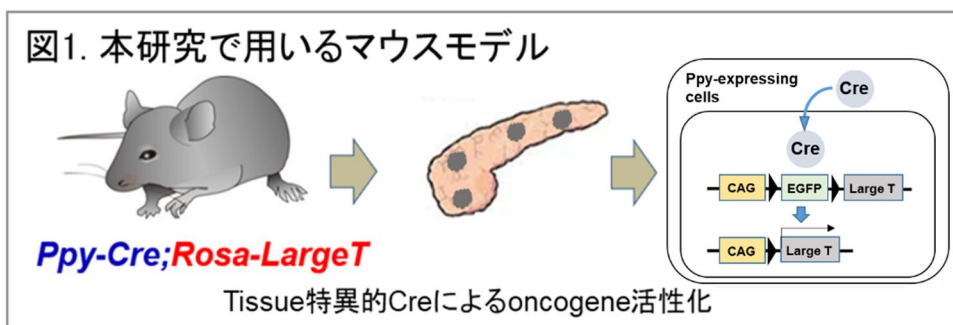
1. 研究開始当初の背景

膵ランゲルハンス氏島(膵島)には、4種類の異なる細胞腫が存在する。われわれのチームは、なかでももっとも解析の遅れている Pancreatic Polypeptide (PP)を産生する PP 細胞の病態生理学的意義を明らかにする試みに数年前より着手した。その目的で、PP を認識する特異的抗体や、PP 細胞の系譜追跡の手段などを確立した。その一環として、Cre-loxP を介する遺伝子組換え技術を用いて PP 細胞の細胞株を作製する方法を考案した(図1)。この方法を用いて PP 細胞株を作出する予定であったが、予想に反して膵臓がんを発症するモデルマウスが作成された。本研究では、PP 細胞が起原と成り得る膵臓がんの発症機構についての解析を行った。

2. 研究の目的

膵臓がんは早期発見が困難ながん種であり、本邦における5年生存率は7%と他のがん種に比べて極端に低い。膵臓は腺房細胞、膵管細胞そして膵ランゲルハンス島(内分泌細胞)の3つのコンパートメントから成るが、膵がんは腺房細胞を origin として ADM (acino-ductal metaplasia) を経て発生すると現在は考えられている。本研究では、我々が PP 細胞株作出実験の過程で偶然に開発した、膵ランゲルハンス島に存在する内分泌細胞の一つの細胞腫である PP 細胞を起源として悪性度の高い膵がんを発生するユニークな動物モデルを分子レベルで解析することで、これまでの膵がんの腺房由来仮説に一石を投じることを目的とした。

3. 研究の方法



膵ランゲルハンス島(膵島)にはインスリンを産生する細胞、グルカゴンを分泌する細胞、ソマトスタチンを産生

する細胞に加えて pancreatic polypeptide (PP) を産生する PP 細胞が存在する。PP 細胞の機能解析を施行すべく、PP 細胞の細胞株作成を試みた。図1に示す *Ppy-Cre; Rosa26-LargeT* マウス、すなわち PP 細胞の特徴的遺伝子 *Ppy* が活性化された細胞に細胞不死化に頻用される oncogene の SV40 LargeT を発現させることにより、PPoma を誘導しようと試みた。予想に反して、マウスには膵内分泌腫瘍ではなく、膵腺がん (pancreatic ductal adenocarcinoma: PDAC) と考えられる病変が3週令以降に出現した。本モデルに発症する膵がん病変の特徴づけに関して各種分子マーカーを用いて行うとともに、PP 細胞から膵がん(PDAC:duct 系列)への運命転換が生じることを組織学的解析、移植実験、RNA sequencing により検証した。

4. 研究成果

(1) *Ppy-Cre; Rosa26^{LargeT}/tdTomato* マウスの病理組織学的解析

Ppy-Cre; Rosa26^{LargeT} マウスの平均生存日数は4.7週であり、解析したマウスで7週令以上生存した個体は認められなかった。体重、血糖値が対照群マウスよりも有意に低値を示し、4週令では膵臓の多くは異常な導管構造と、腫瘍および間質組織によって占有されており、分化した膵島や腺房細胞量が著明に低下していることから、内分泌機能・外分泌機能の低下による消化不良による低栄養が死因として最も可能性が高いと考えられた。

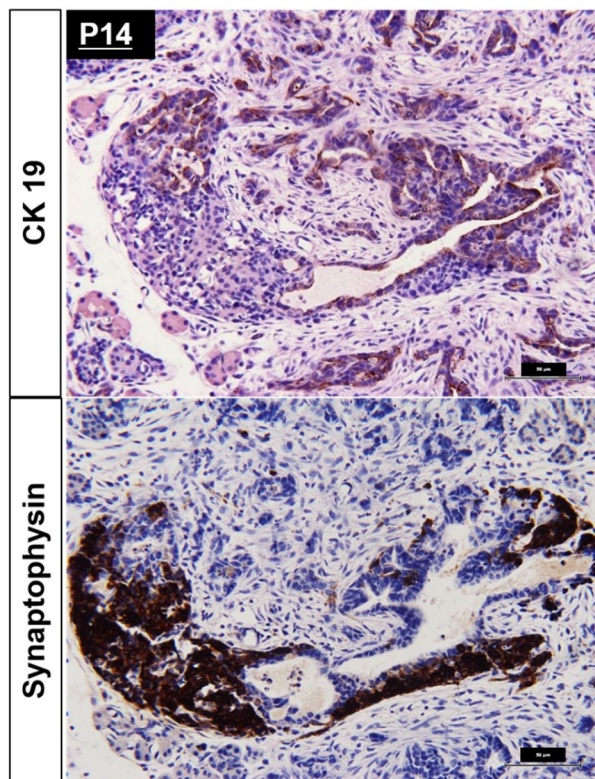


図2 膵島から異常な導管構造が直接進展する

な PDAC を発症することが示された。また、この PDAC は Tomato 陽性であったことから *Ppy* 発現細胞から由来するものと考えられた。

この点に関しては生化学的検査によって今後明らかにしたい。病理学的所見として最も特徴的な点は、2 週令位から異常な導管様構造が膵島から直接伸展するように見えることである。SV40Large T 抗原は本来 PP 細胞が位置する膵島周辺部に発現し、この Large T 発現細胞が増殖しながら膵島から突出・進展して異常な膵管構造を形成したものと考えられた (図 2)。

(2) *Ppy-Cre;Rosa26^{LargeT/tdTomato}* マウス膵島の athymic mice への移植実験
 病理学的検討から、*Ppy-Cre;Rosa26^{LargeT/tdTomato}* マウスは 3 週令以内に膵腺がんを発症することが示唆されたが、癌であることの検証法の一つとして、免疫不全マウスへの移植実験を行った。生後 7 日目の膵島を単離したのち、athymic mice の皮下に移植したところ、一か月で tumor が発生した。図 3 に示すように *Ppy-Cre;Rosa26^{LargeT/tdTomato}* マウス膵島は腺管構造を有する CK-19 陽性の典型的

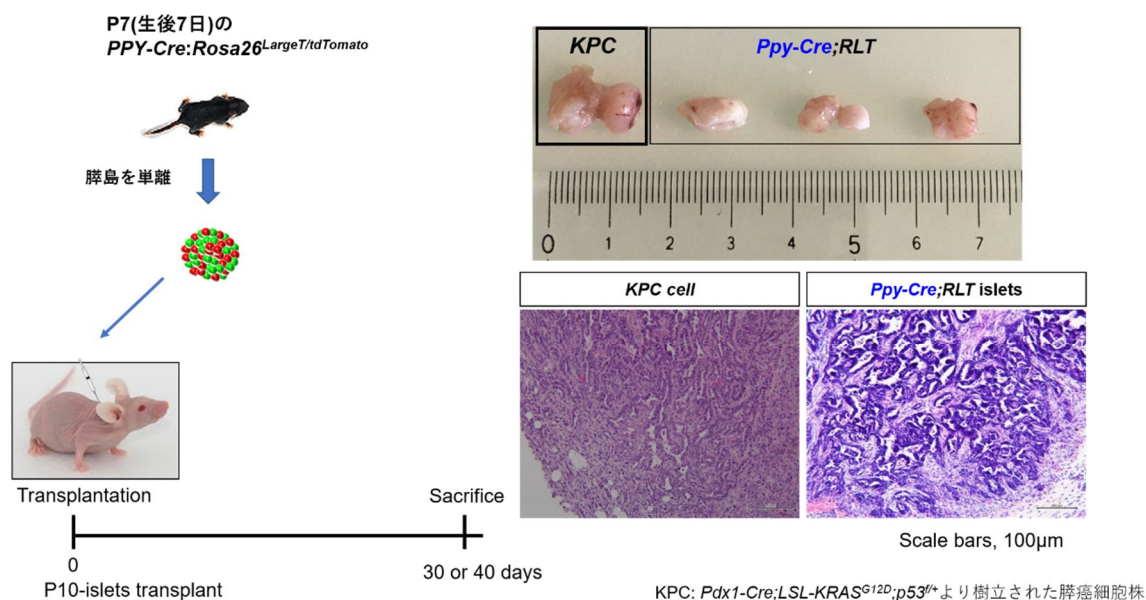


図3 *Ppy-Cre;Rosa26^{LargeT/tdTomato}* マウス の athymic mice への移植は膵腺癌を発症させる

(3) Large T 応答性に *Ppy* 発現細胞から膵腺がん発症にいたる遺伝子発現変化の解析

Ppy 発現細胞において Large T を活性化することにより、どのような遺伝子発現プロファイルの変化を誘導することにより膵腺がんを誘導したのかを分子レベルで明らかにするため、*Ppy-Cre;Rosa26^{tdTomato}* マウスおよび *Ppy-Cre;Rosa26^{LargeT/tdTomato}* マウスそれぞれより tomato 陽性細胞を FACS を用いて sorting した。続いて RNA から cDNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq を行ない、発現変動遺伝子の同定を試みた(図 4)。その結果、発現変動遺伝子として 1362 個の遺伝子が発現変動することが観察された。その中には *Ppy*, *Gcg*, *Pyy*, 等の膵内分泌細胞の発現の低下, *Krt19*(CK-19)等の導管細胞マーカーの上昇, がん抑制遺伝子プロモーターの hypermethylation を誘導することが知られる *DNMT1* の上昇, reprogramming

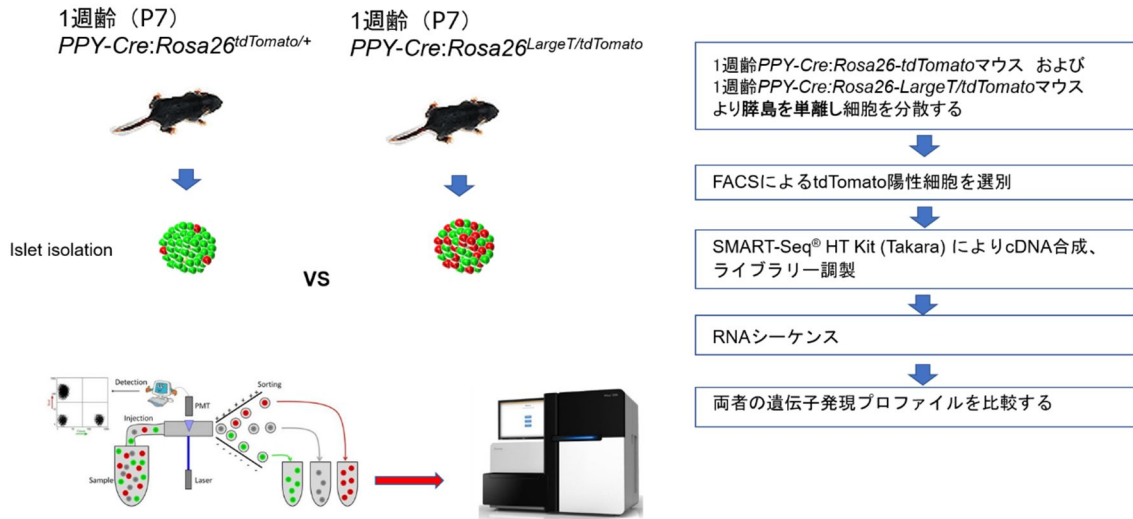
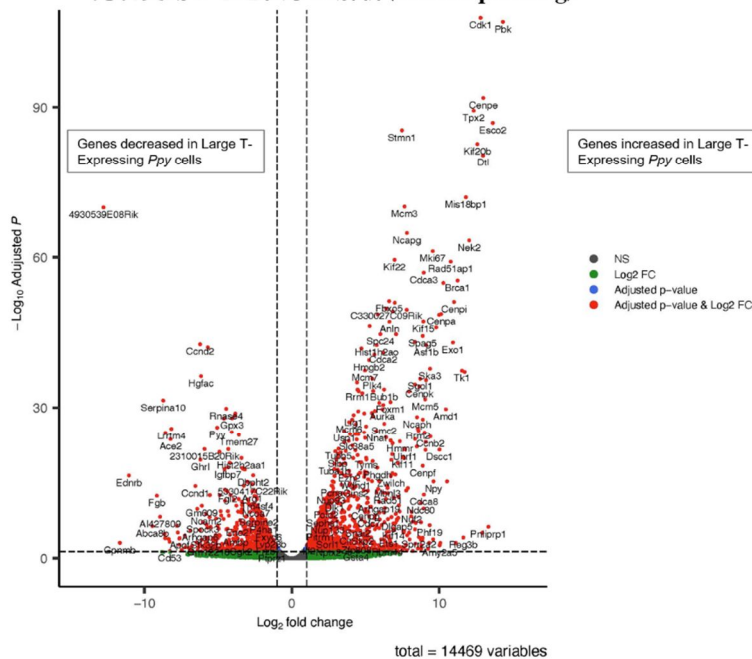


図4 *Ppy*遺伝子発現細胞に*LargeT*を活性化することにより発現変動する遺伝子を同定する試み (RNAseq) 遺伝子として知られる *mycL1*, *sox2* の発現上昇が観察された。図5の右上には、文献上PDACとの関連性が報告されている遺伝子が多数リストアップされた。また、pathway解析からは、peptide secretion, peptide transport等の分泌に関するpathwayが低下し、DNA replication, DNA repairなど細胞増殖に関するものが上昇するpathwayとして上位にenrichされていた。

以上の結果から膵内分泌細胞から癌細胞(PDAC)への分化転換が誘導されていることが gene signature の観点からも強く示唆された。

図5 *Ppy*発現細胞に*Large T*を活性化することにより発現変動する遺伝子の解析(RNA sequencing)



[成果の結論]

Ppy-Cre:Rosa26^{LargeT/tdTomato} マウスにおいて、*LargeT*を活性化することにより、*Ppy*発現細胞という内分泌細胞から、確かにPDACが発症することが、病理形態学的解析、遺伝子発現プロファイルの両面から検証された。内分泌細胞(膵島細胞)から由来する膵腺がんモデルはこれまで報告が無く、膵がんの新奇発症経路の存在を提示すると共に、膵がんのoriginの相違によるオーダーメイド治療の開発に今後寄与するものと考えられる。

[今後の展望]

(1)今回解析した *Ppy* 発現細胞からの膵がんの発生は *Large T* の発現が胎生期から始まっているため、adult で活性化した場合には結果が異なる可能性がある。そこで *Ppy-CreERT2* マウスを用いて 10 週令において *LargeT* を誘導性に活性化したところ、膵がんではなく neuroendocrine tumor (NET) が発生した。このことから、*Ppy* 発現細胞からの膵がんの発生は時期特異的に起こる現象であることが判明した。今後、どの時期の *Ppy* 発現細胞が *LargeT* に感受性があり、膵がんを発症する *susceptibility* を有するのかを *Ppy-CreERT2* マウスを用いて明確にしてゆきたい。

(2)今回行った RNA sequencing から、*Ppy* 発現細胞からの膵がんの発生に伴い変動する遺伝子群が多数明らかになった。これまで deposit されている膵がんのマウスモデル(*Ptf1a-Cre;LSL-KRAS^{G12D};p53^{+/+}*)やヒト膵がんの RNA sequencing 解析結果と比較することにより、われわれの *Ppy* 発現内分泌細胞から発症する膵がんの特異的マーカー遺伝子セットを複数同定したい。それを用いてヒトの膵がんにおいても、同様の発症経路が存在するのかどうかの検証を行いたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Pereye OB, Nakagawa Y, Sato T, Fukunaka A, Aoyama S, Nishida Y, Morishita Y, Oyama T, Mizutani W, Kobayashi, N, Kawabata-Iwakawa R, Watada H, Mizukami H, Fukuda A, Fujitani Y	4. 巻 in press
2. 論文標題 Identification of Ppy-lineage cells as a novel origin of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Pathology	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） 10.1002/path.6295	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 Himuro M, Wakabayashi Y, Taguchi T, Katahira T, Suzuki L, Iida H, Ogihara T, Nishida Y, Sasaki S, Lynn FC, Hiraoka Y, Oshima S, Okamoto R, Fujitani Y, Watada H, Miyatsuka T	4. 巻 67
2. 論文標題 Novel-time resolved reporter mouse reveals spatial and transcriptional heterogeneity during alpha cell differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 156-169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00125-023-06028-w.	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 該当する

1. 著者名 Fukunaka A, Shimura M, Ichinose T, Pereye OB, Nakagawa Y, Tamura Y, Mizutani W, Inoue R, Inoue T, Tanaka Y, Sato T, Saito T, Fukada T, Nishida Y, Miyatsuka T, Shirakawa J, Watada H, Matsuyama T, Fujitani Y	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Zinc and iron dynamics in human islet amyloid polypeptide induced diabetes mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3484
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-30498-y.	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13件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 Ppy遺伝子の活性化が膵 細胞の機能的多様性を規定する
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 PP細胞研究から解き明かす膵 細胞の多様性
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 膵 細胞の機能的多様性
3. 学会等名 第57回糖尿病学の進歩 (オンデマンド配信) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ofejiro B. Pereye, 佐藤隆史, 中川祐子, 福中彩子, 藤谷与士夫
2. 発表標題 A novel Islet-derived mouse pancreatic ductal adenocarcinoma model
3. 学会等名 第35回日本糖尿病肥満動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ofejiro B. Pereye, 佐藤隆史, 中川祐子, 福中彩子, 藤谷与士夫
2. 発表標題 Genetically induced immortalization of Ppy-expressing cells results in malignant transformation
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Ofejiro B. Pereye, 佐藤隆史, 中川祐子, 福中彩子, 青山周平, 西田友哉, 綿田裕孝, 福田晃久, 水上浩哉, 藤谷与士夫
2. 発表標題	Genetically induced immortalization of Ppy-expressing cells results in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
3. 学会等名	25th Diabetes Research Forum
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Ofejiro B. Pereye, Takashi Sato, Yuko Nakagawa, Ayako Fukunaka, Shuhei Aoyama, Yuya Nishida, Hiroataka Watada, Akihisa Fukuda, Hiroki Mizukami and Yoshio Fujitani
2. 発表標題	Genetically induced immortalization of Ppy-expressing cells result in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
3. 学会等名	The 8th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Ofejiro B. Pereye, Takashi Sato, Yuko Nakagawa, Ayako Fukunaka, Akihisa Fukuda, Hiroki Mizukami and Yoshio Fujitani
2. 発表標題	Genetically induced immortalization of Ppy-expressing cells results in pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名	第36回日本糖尿病肥満動物学会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Ofejiro B. Pereye, 佐藤隆史, 中川祐子, 福中彩子, 青山周平, 西田友哉, 綿田裕孝, 福田晃久, 水上浩哉, 藤谷与士夫
2. 発表標題	Genetically induced immortalization of Ppy-expressing cells results in pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名	日本生理学会 第100回記念大会 (招待講演)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 Yoshio Fujitani
2. 発表標題 New islet research pioneered through PP cells
3. 学会等名 国際糖尿病連合西太平洋地区会議2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 内分泌細胞である膵PP細胞から膵腺癌を発症する新たな発癌モデルマウスの開発とその意義
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 PPY発現細胞は膵癌の新たな起源細胞となりうる
3. 学会等名 第37回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川祐子, Ofejiro B. Pereye, 佐藤隆史, 福中彩子, 青山周平, 西田友哉, 森下揚平, 川端麗香, 綿田裕孝, 水上浩哉, 福田晃久, 藤谷与士夫
2. 発表標題 膵内分泌細胞に由来する膵管腺癌モデルの発症機構の解析
3. 学会等名 第37回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生体調節研究所 分子糖代謝制御分野 藤谷研究室
<https://tou-taisha.imcr.gunma-u.ac.jp/>

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