

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20819

研究課題名（和文）膵癌分子サブタイプの可塑性の解明とその作用機序に基づく新規診断治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the plasticity of pancreatic cancer molecular subtypes and development of novel diagnostic and therapeutic approaches

研究代表者

馬場 泰輔（BABA, TAISUKE）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：30962782

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膵癌分子サブタイプの可塑性の制御因子としてTFFs(TFF1/TFF2/TFF3)に着目し、これらの遺伝子のClassical programに与える影響を検証した。一般に膵癌細胞株は2次元培養下でBasal-like subtypeに強固に固定されているため、従来の2次元培養下の実験系ではClassical programに関する検証を行うことが難しい。我々は鶏卵漿尿膜法(CAMモデル)を確立し、短期間で腫瘍形成させることで、これらの遺伝子の機能を解析した。その結果、TFF1は膵癌分子サブタイプの制御因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌のトランスクリプトーム解析から膵癌はClassicalとBasal-likeの二つの主要な分子サブタイプに分類されることが明らかとなった。一般的にClassicalサブタイプは予後がよく化学療法感受性良好、一方のBasal-likeは増殖・転移傾向があり、化学療法感受性が悪いことが知られている。Classical/Basal-like programの制御因子が同定されれば、化学療法の効きにくいBasal-likeサブタイプをClassicalサブタイプへと誘導し、化学療法感受性を飛躍的に向上させる新しい治療戦略が実現する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on TFFs (TFF1/TFF2/TFF3) as regulators of pancreatic cancer molecular subtype plasticity (Basal-like-to-classical shift) and examined the effects of these genes on the Classical program. In general, pancreatic cancer cell lines are strongly anchored to Basal-like subtype in 2D culture, so it is difficult to verify the Classical program in the conventional 2D culture. We established the Chicken Egg Chorioallantoic Membrane (CAM) Model and analyzed the function of these genes by inducing tumorigenesis in a short period of time. Our results suggest that TFF1 is a regulator of pancreatic cancer molecular subtypes.

研究分野：膵癌、胆道癌、エピジェネティクス、メタボロミクス、AI

キーワード：膵癌 分子サブタイプ エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌のトランスクリプトーム解析から膵癌は Classical と Basal-like の二つの主要な分子サブタイプに分類されることが明らかとなった。一般的に膵癌症例の 2/3 から 3/4 が Classical サブタイプに分類され、Classical サブタイプは予後がよく化学療法感受性良好、一方の Basal-like は増殖・転移傾向があり、化学療法感受性が悪いことが知られている。ところが、膵癌細胞株のトランスクリプトーム解析を行うと、ほぼ全ての細胞株が Basal-like サブタイプに分類される。この細胞株の Basal-like への異常なまでの偏重は、増殖転移能力の高い Basal-like サブタイプのみが 2 次元培養という生体環境とは全く異なる環境でも増殖可能だった結果、Basal-like ばかりが残ってしまった、という Selection pressure で説明されてきた。我々は、Basal-like の PDX 由来低継代細胞株をマウスに移植したところ、形成された腫瘍の一部は Classical に戻ることを発見し報告した。つまり、Selection pressure だけでなく、実際には細胞株はその遺伝子発現を柔軟に変化させ、Classical と Basal-like をある程度自由に行ったり来たりすることができることが示唆された (Baba T et al. Gastroenterology. 2022 Nov;163(5):1450-1453.)。このような遺伝子発現のダイナミックな変化を可能にする制御因子を同定できれば、化学療法が効きにくい Basal-like を Classical に shift させられる可能性がある。

2. 研究の目的

膵癌分子サブタイプの可塑性 (Basal-like-to-Classical shift) の制御因子の同定およびシグナル伝達経路などの分子サブタイプの制御メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

膵癌患者腫瘍組織移植モデル (PDX モデル) と PDX 由来細胞株の遺伝子発現プロファイルの比較

43 種類の PDX と 23 種類の PDX 由来細胞株を用いた RNA-seq の差異発現遺伝子 (DEG) 解析から、膵癌の分子サブタイプ可塑性 (Basal-like-to-Classical shift) の制御に関連する候補遺伝子を同定する。

シングルセル RNA-seq の Trajectory 解析

公開されている膵癌シングルセル RNA-seq データを利用し、Basal-like から Classical への変化の特に初期に発現増加する遺伝子を同定する。

合成 TFF2 の影響

2 次元培養下でターゲット分子を投与し、Classical への誘導が可能か検証する

Basal-like-to-Classical shift を誘発する in vivo 系の確立

in vivo モデルである鶏卵漿尿膜法 (CAM モデル) を確立し、in vitro <-> in vivo 間で期待されるダイナミックな遺伝子発現変化が得られるか検証する。

候補遺伝子のノックダウン実験

ターゲット遺伝子をノックダウンした細胞株を CAM に移植し、腫瘍を形成させ Basal-like-to-Classical shift を誘導する。RT-PCR を行い、ターゲット遺伝子のノックダウンによる Basal-like-to-Classical shift への影響を調べる。

4. 研究成果

膵癌患者腫瘍組織移植モデル (PDX モデル) と PDX 由来細胞株の遺伝子発現プロファイルの比較

膵癌 PDX 腫瘍-PDX 由来細胞株間の DEG 解析を行い、Subtype Program の可塑性を制御している可能性のある遺伝子を探索した。この解析では、膵癌 PDX 腫瘍では発現量に幅があり多様性を示すものの、細胞株では一律に発現が失われ、ほぼ発現量がゼロになる遺伝子を選択した。このような候補遺伝子として TFFs (TFF1/TFF2/TFF3) を同定し、我々のデータだけでなく、公開データセットでも同様の傾向にあることが確認された (図 1)。

DepMap から得た細胞株の Co-dependency network 解析を行うと、これらの候補遺伝子は GATA6 や HNF4A をはじめとする Classical regulator と強い Co-dependency 関係にあることが示唆された。

シングルセル RNA-seq の Trajectory 解析

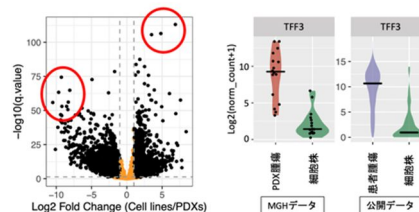


図1 細胞株・PDX腫瘍の遺伝子発現の比較からSubtype programの制御因子を抽出

公開されている膵癌 single cell RNA-seq (CRA001160)をダウンロードし、Trajectory解析を行なった。Un-spliced な mRNA プロファイルの類似度から計算した Pseudo-time は、Basal-like から Classical へと向かうことが明らかとなった(図2)。TFFs の未熟な Un-spliced mRNA と成熟 mRNA の分布には大きな乖離があり、TFFs が Basal-like Classical の流れと共に成熟していく様子が観察され、subtype program の柔軟性に関与している可能性が示唆された(図3)。

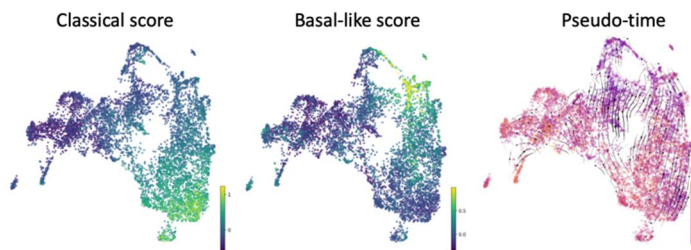


図2 Single cell RNA-seqによるTrajectory analysis。 Pseudo-timeはBasal-likeからClassicalへと向かう。

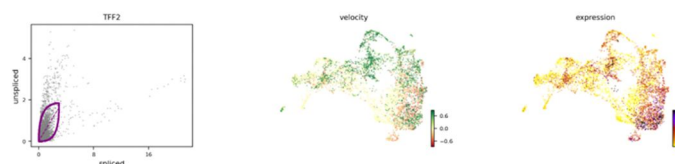


図3 TFFsのUn-spliced mRNAと成熟mRNAの発現分布に大きな差が認められた

合成 TFF2 の影響

TFFs は分泌蛋白で、消化管内に分泌され胃粘膜保護などの働きがある。TFF2 を生合成し、2次元培養の細胞株に投与した。メEDIUM中に TFF2 1ug/mL 投与を2日ごとに繰り返し、7日後に細胞株を回収したが、試験した4種の細胞株のいずれにも遺伝子発現にほとんど変化が見られなかった。2次元培養環境は遺伝子発現プロファイルを強力に制御し細胞株を一様に Basal-like に維持していることから、Classical program に関する研究を in vitro 環境で検証するのは困難と考えられた。このため、Basal-like-to-Classical shift を誘導可能な in vivo 実験系の確立が必要となった。

Basal-like-to-Classical shift を誘発する in vivo 系の確立

CAM モデルは患者由来腫瘍移植モデルとして古くは 100 年前から報告がある手法だが、安い(卵1個 100 円前後)かつ早い(10日以内に解析が終わる)ことから、近年大きな注目を集めている。CAM モデルでは細胞移植後 2~3日 で血管新生を伴う腫瘍形成に至り、siRNA による短期間のノックダウンでも十分に in vivo モデルでの検証が可能である(図4)。

図4 CAMモデルのタイムライン。早い・安い・正着率が高い。

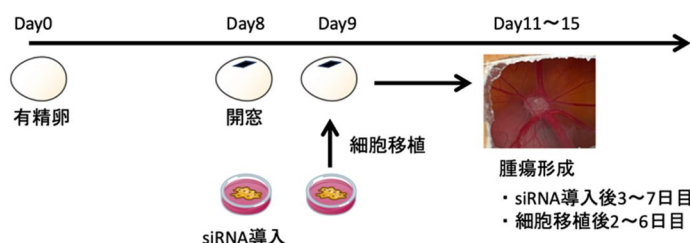
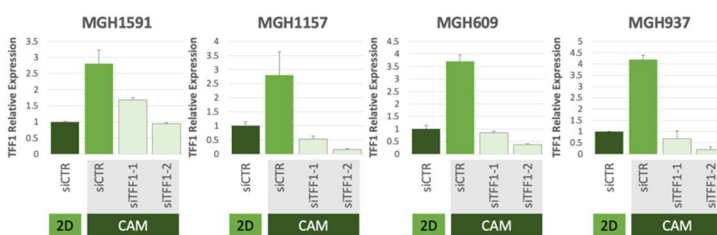


図5 CAMモデルによってTFF1の発現が上昇。2D: 二次元培養、CAM: 鶏卵CAMモデル。

Basal-like-to-Classical shift を検討するため、マサチューセッツ総合病院外科から低継代の膵 PDX 由来細胞株を譲り受け、CAM 腫瘍形成を試みた。当初、これらの細胞株の CAM 腫瘍形成は、ほとんど成功しなかったが、いくつかの工夫を経て、最終的には 9 種類の細胞株全てで安定して腫瘍形成させることが可能となった。これらの細胞株の 2次元->CAM モデル間の遺伝子発現プロファイルと比較すると、Classical/Basal-like 関連のマーカー遺伝子は大きく変動していることが明らかとなった。特に、TFF1 は二次元培養ではほとんど発現がないが、CAM モデルでは発現が顕著に上昇していた(図5)。



最終的には 9 種類の細胞株全てで安定して腫瘍形成させることが可能となった。これらの細胞株の 2次元->CAM モデル間の遺伝子発現プロファイルと比較すると、Classical/Basal-like 関連のマーカー遺伝子は大きく変動していることが明らかとなった。特に、TFF1 は二次元培養ではほとんど発現がないが、CAM モデルでは発現が顕著に上昇していた(図5)。

TFF1 のノックダウン実験

TFF1・TFF2 に対し、複数の siRNA を設計し、Lipofectamine を用いて PDX 由来細胞株に導入した。RT-PCR の結果から 8 種の細胞株で良好なノックダウンを確認した。これらの細胞のうち、4 種の細胞について、siRNA ノックダウンをした上で CAM 上に移植し、腫瘍を形成させた。代表的な各種 Classical・Basal-like マーカーについて、RT-PCR でその発現量の変化を評価した。MGH609 株では、TFF1 ノックダウンに並行して各種 Classical マーカーの抑制が認められたが、このような Classical マーカーへの影響は細胞株間の差があった。一方、Basal-like マーカーは、TFF1 ノックダウンによって一律に低下傾向を示し、TFFs が Basal-like-to-Classical shift を促進するという予想に反して、TFF1 のノックダウンは Classical・Basal-like いずれの遺伝子発現にも抑制的に働くことが示唆された。

本研究では、TFF1 がサブタイプ関連の遺伝子発現を制御している示唆を得た。まだ解明されていない部分も多く、今後も TFF2・TFF3 の影響を検証しつつ、TFFs がサブタイプをどのように制

御しているのか、そのメカニズムを明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Baba Taisuke, Finetti Pascal, Lillemoe Keith D., Warshaw Andrew L., Fernandez-Del Castillo Carlos, Liss Andrew S., Birnbaum David, Bertucci Francois	4. 巻 163
2. 論文標題 A Lesson in Transcriptional Plasticity: Classical Identity Is Silenced, but Not Lost, in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1450 ~ 1453.e3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2022.07.005	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Taisuke Baba, Andrew L. Warshaw, Carlos Fernandez-del Castillo, Andrew S Liss
2. 発表標題 The dramatic plasticity of Classical subtype programs in pancreatic adenocarcinoma
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taisuke Baba, Andrew L. Warshaw, Carlos Fernandez-del Castillo, Andrew S Liss
2. 発表標題 Remarkable plasticity of classical identity between pancreatic cancer cell lines and tumors.
3. 学会等名 International Association of Pancreatology (IAP) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taisuke Baba, Masaki Sunagawa, Junpei Yamaguchi, Toshio Kokuryo, Tomoki Ebata
2. 発表標題 A single sample classifier of Bailey's molecular subtype of PDAC.
3. 学会等名 American Association of Cancer Research, Pancreatic Cancer Meeting (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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