

研究報告書
平成29年度：A課題

平成31年4月26日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 国立研究開発法人
国立がん研究センター

住 所 東京都中央区築地 5-1-1

研究者氏名 高橋 真美



(研究課題)

臍臓がんPDXの同所移植モデルを用いたがん-間質相互作用・脂肪浸潤に関する解析

平成30年 3月 9日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しました
のでご報告いたします。

<目的>

脾臓がんは近年日本において罹患が増えている難治がんであり、予後が非常に悪いことから、早期診断や予防法の開発が重要である。我々は、脾臓がんのリスク要因である肥満・糖尿病・加齢が脾臓における脂肪細胞の浸潤を起こすことに注目し、動物発がんモデルを用いた検討や脾臓がん患者手術標本における解析により、脾臓発がんにおける脂肪浸潤の関与について明らかにしてきた。脾臓がんは間質を多く有し、腫瘍組織中にも脂肪細胞の浸潤が観察される。患者由来ゼノグラフト (PDX) は、ヒトの腫瘍組織を免疫不全マウスに移植することで増殖・継代でき、間質を有し、*in vivo* の状態を反映しており、本来の組織像に近い形態を維持していることから、がんの微小環境の解析に適していると考えられる。そこで本研究課題では、脾臓がん手術検体より樹立した脾臓がん PDX の同所移植モデルを用い、高脂肪食によって内臓脂肪を増加させて脂肪浸潤を誘導し、脾臓がん PDX の増殖・進展に及ぼす影響を解析することによってがん微小環境における脂肪浸潤の役割について明らかにすることを当初の目的とした。

<方法>

免疫不全 Scid-bg マウスに高脂肪食 Quick fat diet (日本クレア) を投与して肥満させ、脾がん PDX 株を脾臓に同所または皮下移植し、さらに高脂肪食で飼育した。一定期間経過後、もしくはマウスに衰弱が見られたり腫瘍容積が体重の 10 % に達した時点で腫瘍を摘出し、腫瘍の大きさと重量、腹膜播種や他臓器への転移の有無を調べ、通常食 CE-2 (日本クレア) で飼育した対照群マウスに移植した場合と比較した。また、ホルマリン固定組織標本を作製して、脾臓の正常部及び腫瘍組織内の脂肪浸潤の度合いを調べた。各々の PDX 腫瘍組織や脂肪組織から RNA を抽出し、我々がこれまで実験動物モデルを用いて行なってきた基礎研究から抽出してきた肥満／糖尿病／脂肪浸潤関連の脾発がん促進候補因子 (Adipogenesis 関連遺伝子 X 等) をはじめ、炎症性サイトカインや増殖・浸潤・転移に関わる遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 解析によって比較し、高脂肪食の影響を調べた。

<結果>

脾がん手術検体をマウスに同所移植することによって樹立した PDX 株 PXE03-PD5 を、高脂肪食を 5 週間投与して肥満させた Scid-bg マウスに同所移植してさらに高脂肪食投与を続け、4 週間後の腫瘍増殖への影響を検討したところ、腫瘍容積は通常食群の 1.28 倍、腫瘍重量は通常食群 1.18 倍で、いずれも有意差は認められなかった。組織型は、腫瘍の辺縁部が低分化型、中心部が中分化型である傾向がみられた。脂肪浸潤は主に脾臓の血管周りに少し見られたが、高脂肪食での増加は明らかではなかった。腫瘍内の脂肪浸潤も両群で一部に少しだけ見られたが、顕著ではなかった。肺や肝臓の一部に炎症細胞浸潤が見られ、両群で一部のマウスで腎臓や腹腔内脂肪へのがん細胞浸潤が認められたが、有意差はなかった。

そこで、別の脾がん症例をマウスに皮下移植することによって樹立した PDX 株 PXE 02-SD1 を皮下移植して増殖への影響を検討した結果、腫瘍の増殖が促進され、移植 3 ヶ月後の腫瘍容積は通常食群の 2.1 倍、腫瘍重量は 1.74 倍と有意に增加了。腫瘍の組織型は高分化型で、腫瘍内への脂肪浸潤については腫瘍の全体ではなく部分的に見られる程度でばらつきが大きいが、通常食より多い傾向が見られた。また、高脂肪食では腫瘍内の粘液産生が顕著に増加していた。内臓脂肪や皮下脂肪量は高脂肪食によって増加する傾向が見られたが、腫瘍移植によってその増加はキャンセルされ、腫瘍増殖のために脂肪が消費された可能性が示唆された。皮下腫瘍及び皮下脂肪組織より RNA を抽出して、マウス脾発がんモデルにおいて抽出してきた肥満／糖尿病／脂肪浸潤関連の脾発がん促進候補因子等の発現を調べた結果、Adipogenesis 関連遺伝子 X の発現は高脂肪食群の脂肪組織では通常食群の 3.3 倍と增加が見られたが、腫瘍組織では通常食群でも発現が脂肪組織に比べて高いレベルにあり、高脂肪食では有

意差はなく却ってやや減少気味であった。高脂肪食群の脂肪組織では、F4/80、CD163等のマクロファージマーカーやMMP9, CXCL12, SAA3, VEGFc, Bcl-2の発現上昇が見られたが、腫瘍組織ではこれらの発現に有意差は認められなかつた。腫瘍組織でのムチンの発現を調べたところ、MUC1の発現レベルが両群で高く、有意差は見られなかつた。一方、MUC2とMUC4は低いレベルでやはり有意差は見られなかつたものの、高脂肪群でやや高い傾向にあつた。また、初期の大腸腫瘍や胰管内乳頭粘液性腫瘍、浸潤性胰管がんで発現していることが報告されているケラチノサイトの分化制御関連因子Yの発現が高脂肪食群の腫瘍組織で上昇していることを見出した。

<考察>

高脂肪食や肥満によって増殖が促進される腫瘍とあまり変化がない腫瘍があることは、これまで我々が調べたマウス膵がん細胞の移植モデルでも同様であり、脂肪浸潤が起きやすい何らかの内的要因を持った腫瘍に高脂肪食や肥満が加わると、腫瘍内への脂肪浸潤が増えて増殖が促進される可能性が考えられた。高脂肪食により腫瘍周辺の脂肪組織における炎症・増殖関連因子の遺伝子発現の増加が見られ、これらが腫瘍の増殖に寄与している可能性がある。一方、腫瘍組織で発現が有意に変化する遺伝子はケラチノサイト分化制御関連因子Y以外には見つけられておらず、今後、cDNAアレイやプロテオーム等のオミックス解析により腫瘍内で変化している因子を明らかにしていきたいと考えている。さらに現在、今回高脂肪食により増殖促進が認められた症例の同所移植PDX樹立株PXE02-PE1を肥満させたマウスの膵臓に同所移植して、皮下移植で見られたのと同様な腫瘍増殖や脂肪浸潤、粘液産生の増加等が見られるかどうかを検証中である。PXE02-PE1株は同所移植モデルにおいて膵臓への浸潤を起こすことから、高脂肪食が膵がんの浸潤・転移に及ぼす影響についても調べる予定であり、ケラチノサイト分化制御関連因子Yの関与についても明らかにしていきたいと考えている。

本研究関連の学会発表

- 1) 高橋真美、石ヶ守里加子、平岡伸介、今井俊夫。膵臓がんゼノグラフトの同所及び皮下移植モデルにおける組織形態及び間質割合の比較検討。第77回日本癌学会（大阪）、P-3350（示説）。2018年9月29日。
- 2) 高橋真美、石ヶ守里加子、平岡伸介、今井俊夫。マウス膵がん同種移植モデル及び膵がん患者由来ゼノグラフトモデルにおける高脂肪食の腫瘍増殖への影響。第29回日本消化器癌発生学会（東京）、P5-3（示説）。2018年11月16日。

本研究関連の論文発表

Takahashi, M.*¹, Hori, M., Ishigamori, R., Mutoh, M., Imai, T., Nakagama, H. Fatty pancreas, a possible risk factor for pancreatic cancer in animals and humans. Cancer Sci., 109 (10): 3013-3023, 2018.