

# Sarcopenia prevention for improving pancreatic cancer outcome

Research Project

All



## Project/Area Number

19K17480

## Research Category

[Grant-in-Aid for Early-Career Scientists](#)

## Allocation Type

Multi-year Fund

## Review Section

[Basic Section 53010:Gastroenterology-related](#)

## Research Institution

[Asahikawa Medical College](#)

## Principal Investigator

[佐藤 裕基](#) 旭川医科大学, 大学病院, 客員助教 (20747373)

## Project Period (FY)

2019-04-01 – 2023-03-31

## Project Status

Granted (Fiscal Year 2019)

## Budget Amount [\\*help](#)

**¥4,290,000 (Direct Cost: ¥3,300,000、Indirect Cost: ¥990,000)**

Fiscal Year 2022: ¥130,000 (Direct Cost: ¥100,000、Indirect Cost: ¥30,000)

Fiscal Year 2021: ¥1,040,000 (Direct Cost: ¥800,000、Indirect Cost: ¥240,000)

Fiscal Year 2020: ¥650,000 (Direct Cost: ¥500,000、Indirect Cost: ¥150,000)

Fiscal Year 2019: ¥2,470,000 (Direct Cost: ¥1,900,000、Indirect Cost: ¥570,000)

## Keywords

サルコペニア / 膵癌 / 腫瘍進展抑制 / フレイル / エピジェネティック制御 / 筋肉 / 同所移植マウスモデル

## Outline of Research at the Start

骨格筋量の低下を特徴とするサルコペニアが膵癌において予後不良因子であることが明らかとなりつつある。膵癌の発症に伴うサルコペニアの形成についてはその全体像が明らかになっていない。膵癌が発生すると生体内でどのような変化が起こり、サルコペニアに至るのかを明らかにするのが本研究の目的である。

そこで我々はマウスモデルを用いることでサルコペニアの類似状態を再現し、担癌状態における骨格筋量と脂肪量の低下の程度を検討する。またマウスモデルから得られた膵癌細胞と筋芽細胞を共培養し、筋代謝マーカーの変化を確認する。この過程で変化のある液性因子を定量し、サルコペニアの形成に寄与する候補因子を同定する。

## Outline of Annual Research Achievements

本年度は、当科で保管しているマウス膵癌初代培養細胞株2株を用いた。この細胞は、①LSL-KrasG12D;Trp53fl/flPdx1cre、②LSL-KrasG12D;Trp53R172H/+Pdx1creマウスより樹立した膵癌初代培養株である。本年度、この膵癌初代培養細胞株とマウス筋芽細胞との共培養実験を行った。まず、PCR法を用いて、共培養条件下での筋分化マーカー（MyoDやMyogeninなど）の測定を行った。いずれの膵癌初代培養細胞株でも、筋芽細胞との共培養により筋分化マーカーの有意な発現低下を認めた。また、膵癌初代培養細胞の培養上清を筋芽細胞に供給したところ、同様に筋分化マーカーが低下する現象が起こった。これらの結果より、培養上清中の液性因子が筋分化に抑制的に働いている可能性が示唆された。続いて、共培養条件下で筋芽細胞のミオシン重鎖免疫蛍光染色を行った。各視野における全核数に対するミオシン重鎖の核数の割合を測定して分化の指標（Fusion index）としたところ、いずれの細胞株でもFusion indexの低下が認められ、筋分化の抑制が定量的に証明された。メカニズムを解析する上で注目しているmiR（マイクロRNA）についても解析を行った。これまで膵癌、ならびに筋分化との関連が報告されているmiRについて、共培養条件下で筋芽細胞中のmiRを測定した。miR-133cでは膵癌初代培養細胞株との共培養により筋芽細胞での有意な発現の低下が認められた。In vivoの実験では、同系マウスに上記と同じ膵癌初代培養細胞株を同所移植した。経過中、餌の摂取量に大きな変化がないにもかかわらず、同所移植マウスでは早期から体重増加率の低下が認められた。移植6週間後のマウス下腿・下肢筋肉量と脂肪量は有意に低下しており、膵癌に伴うサルコペニアがIn vivoでも再現された。

## Current Status of Research Progress

### Current Status of Research Progress

2: Research has progressed on the whole more than it was originally planned.

### Reason

膵癌初代培養細胞株との共培養により、筋芽細胞の筋分化の抑制が、PCR法、免疫蛍光染色の両方で確認された。これにより同共培養条件下のマウス筋芽細胞の形態学的変化が定量的に証明できた。膵癌初代培養細胞株の培養上清を供給するのみでも、上記現象が再現できたことから、遠隔臓器同士（腫瘍細胞と筋細胞）のクロストークという当初の仮説をある程度支持する結果を得ることができたと考えている。上記結果より、膵癌細胞から放出される何らかの液性因子が、膵癌に伴うサルコペニアの進展に関与している可能性がある。メカニズムの解明という観点では、共培養条件下で特定のmiRの発現量が変化することが明らかとなり、メカニズム解析の足がかりとなる知見を得ることができた。現時点では共培養条件下の筋芽細胞からRNAを抽出すると同時に、培養上清中からRNAを抽出し、miRを始めバイオマーカーとなる因子を同定する作業を継続している。通常の方法では培養上清中から得られるRNA量が少なく、施行できるPCR回数が限られているため、現在、効率の良いRNAの回収法を検討している。また、miR以外の因子の関与についても検討中である。

In vivoモデルでは、同系膵癌の同所移植モデルで筋肉量・脂肪量の低下が明らかとなり、膵癌によるサルコペニアを誘導することが確認され、マウスモデルは妥当であると考えた。移植6週後に、マウス筋肉からRNAを抽出し、PCR法で筋分化マーカーを定量したが、個体間のばらつきが大きく、有意差を認めるには至らなかった。これについては、膵癌による筋分化の抑制に対し、生体が代償的に筋分化マーカーの発現を上昇させている可能性も考えられ、更に実験系を工夫する必要があると考えている。本年より、マウスの筋力をIn situで定量することが可能となったため、筋分化マーカーについては、筋力との相関も併せて観察する予定である。

## Strategy for Future Research Activity

本年度は、下記を目標に研究を展開する。

- ①In vitro系：膵癌初代培養細胞株と筋芽細胞の共培養実験を継続する。本年度は、筋分化の抑制を引き起こすメカニズムを解明することを主な目標とする。このため、共培養条件下での筋芽細胞よりRNAを収集し、トランスクリプトーム解析、マイクロアレイなどを用い、共培養により筋分化の抑制を引き起こす候補分子を同定する。候補分子が同定された後、その分子をshRNAなどでノックダウンして上記事象が解除されるか検討する。また、培養上清から効率よくRNAを回収する方法を探索した後、同様の検討を培養上清のRNAでも行うことを検討する。
- ②バイオマーカーの探索：膵癌に伴うサルコペニア進展、ひいては予後不良因子となるバイオマーカーの探索をmiRの関連を探索する。現時点で候補miRは筋芽細胞の分化に関わるものが多いが、腫瘍の増殖、浸潤に関連するmiRについても本年度は検討対象とする。候補miRが同定された後、siRNAを用いたmiRのノックダウンにより、筋芽細胞の分化抑制が解除されるか実験を行う。
- ③In vivo系での検討：同系膵癌の同所移植により、下腿・下肢筋肉の減少が認められた。サルコペニアの定義上、筋肉量のみならず筋力の低下も証明する必要がある。本年度は同系膵癌の同所移植マウスの筋力を測定すること、また筋肉からRNAを抽出するのみならず、組織学的に筋組織に変化がないか、検討する。
- ④サルコペニア進展を解除する薬剤の探索：①により、候補となる候補分子が同定された後、文献学的検索により、サルコペニアを解除する候補薬剤の検討を行う。In vitroでは、培養上清などに候補薬剤を添加することにより、筋芽細胞の分化が促進されるかを検討する。In vitroではマウスに候補薬剤を経口投与することにより筋肉量低下が解除されるかを検討する。

## Report (1 results)

2019 [Research-status Report](#)

## Research Products (9 results)

- |  | All | 2019            |              |
|--|-----|-----------------|--------------|
|  | All | Journal Article | Presentation |
| [Journal Article] Genetic analysis of postoperative recurrence of pancreatic cancer potentially owing to needle tract seeding during EUS-FNB   |     |                 | 2019         |
| [Journal Article] IPMNのゲノム解析：Recent advance in the clinical genetics of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas.   |     |                 | 2019         |
| [Journal Article] 血漿遊離核酸を用いた膵腫瘍診断  |     |                 | 2019         |
| [Presentation] A rare case of esophago-gastric junctional squamous cell carcinoma following complete response of neuroendocrine carcinoma successfully treated with multidisciplinary therapy. |     |                 | 2019         |
| [Presentation] 血漿遊離核酸を用いた膵腫瘍診断   |     |                 | 2019         |
| [Presentation] The Temporal Order of KRAS and GNAS Mutations in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas and Evolution to Invasive Carcinoma.                                  |     |                 | 2019         |
| [Presentation] Capturing Pancreatic Tumor-derived Mutations from Fine Needle Aspiration Using Digital PCR.   |     |                 | 2019         |

[Presentation] EUS-FNAにより播種再発を来したと考えられた膵体部癌の1切除例

2019 □

[Presentation] 胆管外に脱落のない胆管プラスチックステントによる腸管穿孔の1例

2019 □

**URL:** <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-19K17480/>

Published: 2019-04-18 Modified: 2021-01-27

# Early diagnosis of pancreatic cancer based on diversity of field defect and molecular genetic approach

Research Project

All

## Project/Area Number

20H03655

## Research Category

[Grant-in-Aid for Scientific Research \(B\)](#)

## Allocation Type

Single-year Grants

## Section

一般

## Review Section

[Basic Section 53010:Gastroenterology-related](#)

## Research Institution

[Asahikawa Medical College](#)

## Principal Investigator

**水上 裕輔** 旭川医科大学, 医学部, 准教授 (30400089)

## Co-Investigator(Kenkyū-buntansha)

**谷上 賢瑞** 東京大学, アイソトープ総合センター, 特任助教 (90648627)

**小野 裕介** 医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所, 臨床生体情報解析部, 部門長 (40742648)

**唐崎 秀則** 医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所, 外科の消化器病疾患研究部, 副部門長 (50374806)

## Project Period (FY)

2020-04-01 – 2023-03-31

## Project Status

Granted (Fiscal Year 2020)

## Budget Amount [\\*help](#)

¥17,810,000 (Direct Cost: ¥13,700,000、Indirect Cost: ¥4,110,000)

Fiscal Year 2020: ¥6,760,000 (Direct Cost: ¥5,200,000、Indirect Cost: ¥1,560,000)

## Keywords

膵癌 / 発癌素地 / クローン進化 / 早期診断

## Outline of Research at the Start

本研究は、前駆病変が多発する切除膵を用いて、背景膵の初期クローン集団の生体分子情報による膵発癌素地の可視化を目指す。このために、個々の前駆病変の形態・占拠範囲・遺伝子変異、及び間質を含むRNA・タンパク質発現情報を統合する。またゲノム編集を応用したヒト膵初代培養系により、初期浸潤に至る起源細胞と経路を特定する。これらの情報をもとに、膵発癌素地の詳細な分子情報を基盤とするマルチバイオ検出系による、膵癌の早期診断、及び個体の発癌危険性を予測するアルゴリズムを構築する。

URL: <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-20H03655/>

Published: 2020-04-28 Modified: 2020-08-26