

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10049

研究課題名(和文) グルカゴン遺伝子ノックアウトマウスを用いた膵内分泌腫瘍に対する治療・予防法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment and prevention for pancreatic neuroendocrine tumor using glucagon gene knock-out mouse

研究代表者

菊森 豊根 (Kikumori, Toyone)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90402635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵腫瘍を自然発生するグルカゴン遺伝子ノックアウトマウスを用いて、発生した腫瘍を病理学的、分子生物学的に検討することにより生物学的性質を明らかにし、治療・予防法の開発を試みた。このマウスに生じた膵腫瘍がヒト膵内分泌腫瘍(pNET)に組織学的、生物学的態度が酷似することを論文報告した。悪性化の過程の各段階の膵島細胞における、細胞増殖因子、血管新生因子(AKT、mTOR、VEGFなど)の発現を摘出組織標本の免疫染色により検討した。pNETに臨床適応を持つmTOR阻害剤であるエベロリムスを生後まもなくよりこのマウスに投与して膵腫瘍発生が抑制されたことを認めた。

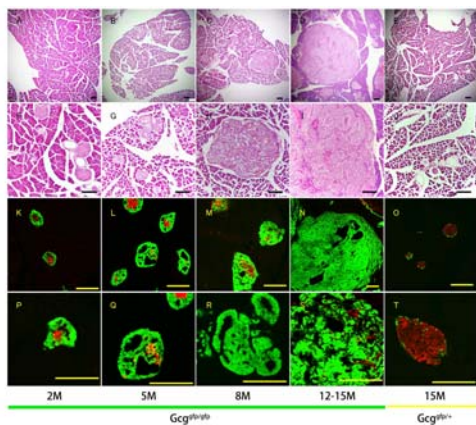
研究成果の概要(英文)：We explored treatment / prevention methods by clarifying pathologically and molecular biologically the biological properties of tumor developed in glucagon gene knockout mouse in which pancreatic tumors arose spontaneously. We reported that the pancreatic tumor developed in this mouse closely resembles histological and biological attitudes to human pancreatic neuroendocrine tumor (pNET). Expression of cellular growth factors and angiogenic factors (AKT, mTOR, VEGF, etc.) in pancreatic islet cells at each stage of the process of malignant transformation were examined by immunostaining of excised tissue specimens. Everolimus, an mTOR inhibitor which has clinical indication for pNET, was continued to be administered to these mice shortly after birth, and it was confirmed that pancreatic tumor development was suppressed.

研究分野：内分泌外科

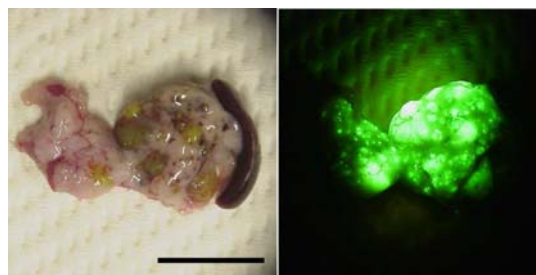
キーワード：膵内分泌腫瘍 グルカゴン mTOR阻害剤

1. 研究開始当初の背景

膵神経内分泌腫瘍(pNET)は膵島細胞から発生する比較的稀な腫瘍であり、機能性と非機能性に分類される。比較的緩徐に進行することが多いとされているが、時間経過とともに肝転移を来することが多く、悪性の経過をたどることが多い。前者は特有の症状により早期に発見される場合もあるが、後者は肝転移を来してから診断される場合が多い。また、多発性内分泌腫瘍症 I 型(MEN1)や von Hippel Lindau 病(VHL)などの遺伝性腫瘍症候群においてもこの pNET が生じることが知られている。近年 pNET に対する分子標的薬の効果が確認されて臨床に導入されてきているが、治療効果はまだ限定的である。また遺伝性腫瘍症候群における pNET の発生抑制効果を臨床的に示された薬剤はまだない。この膵内分泌腫瘍に対する実験動物モデルはインスリンプロモーターにより SV40 ウイルス T 抗原を強制発現させたトランスジェニックマウスや MEN1 の原因遺伝子である Men 1 の heterozygous ノックアウトマウスなどがあるが、インスリンノーマなどの機能性腫瘍を生じる。低血糖を生じるために常にブドウ糖を補給しなければならないなど、生理的なモデルとは言いがたい。我々はグルカゴン遺伝子を緑色蛍光タンパク(GFP)遺伝子で置換したマウス(Gcg^{gfp/gfp})を作成した。このマウスにおいては生後 1-2 ヶ月より膵島細胞の過形成が生じ、さらに時間経過とともに増大・転移を来す。(図 1: Gcg^{gfp/gfp} はグルカゴン遺伝子を GFP で置換したマウスの膵臓の顕微鏡写真。M は生後月を示す。上段は HE 染色、下段は蛍光顕微鏡写真。Gcg^{gfp/+} は heterozygous マウスで対照とした)



このマウスに生じた膵腫瘍においてはグルカゴン遺伝子を緑色蛍光タンパクに置換することにより、腫瘍細胞は蛍光顕微鏡下で緑色蛍光を生じる(図 1)。さらに、腫瘍(図 2: 膵臓および脾臓の可視光(左)および紫外線照射(右))は紫外線照射により緑色蛍光を呈する。このことにより原発巣・転移巣の同定が特殊な免疫染色を要することなく可能である。



2. 研究の目的

- (1) 膵島細胞が過形成から腫瘍化、さらに転移巣を形成する経過における細胞内の分子生物学的変化を明らかにすること。
- (2) このモデル動物における膵内分泌腫瘍に対する各種分子標的薬剤の治療効果を明らかにすること。また、それらの薬剤による細胞内シグナル伝達経路などの変化を検討すること。
- (3) 遺伝性腫瘍症候群における膵内分泌腫瘍に対する薬剤による発症予防が可能かどうかを検討すること。

3. 研究の方法

【動物実験】

- (1) 継代維持されているグルカゴン遺伝子ノックアウトマウスの膵島過形成から pNET 形成、さらに転移巣形成にいたる進行における細胞内分子生物学的変化を検討する。
 - ① 悪性化の過程の各段階の膵島細胞における、細胞増殖因子 (AKT, mTOR など) 血管新生因子 (VEGF など)、抗アポトーシス経路の活性化などを摘出組織標本の免疫染色により検討する。
 - ② 転移形成に促進的に働くと考えられる上皮間葉移行(EMT)をこのモデル動物において免疫染色等で検討する。
- (2) 継代維持されているグルカゴン遺伝子ノックアウトマウスに発生した膵腫瘍に対する各種分子標的薬剤の効果を検討する。
 - ① 現在 pNET に臨床適応をもつ mTOR 阻害剤であるエベロリムス、チロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブを投与し、腫瘍縮小効果を確認する。
 - ② AKT, PI3K など細胞増殖促進経路に重要な役割を果たす分子に対する特異的阻害剤の腫瘍縮小効果を検討する。
 - ③ さらに上記の分子標的薬剤の併用効果を検討する

(3) 継代維持されているグルカゴン遺伝子ノックアウトマウスの膵島細胞の悪性化における細胞内遺伝子発現を網羅的に検討する。

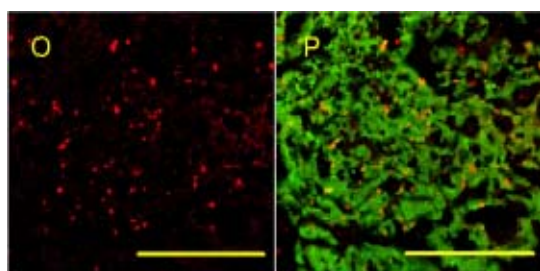
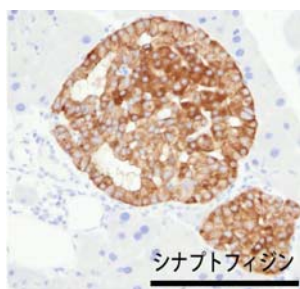
① 過形成、腺腫様病変、転移巣における遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、悪性化に重要な役割を果たしている可能性がある遺伝子を抽出する。

(4) グルカゴン遺伝子ノックアウトマウスに発生した膵腫瘍に対する EMT 抑制による転移抑制効果を検討する。

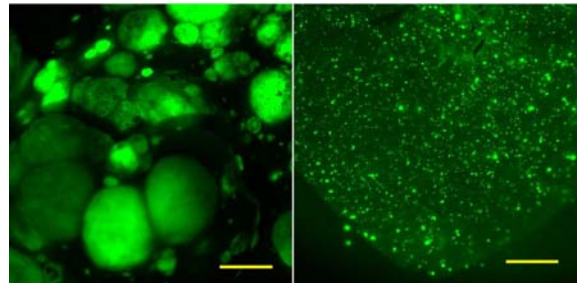
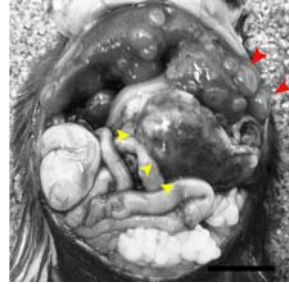
① 転移形成に重要な役割を果たすとされている EMT を特異的に阻害することにより転移が抑制可能かどうかを検討する。TGFβが EMT に促進的に働いているとされている。この TGFβを阻害する薬剤を投与し、転移抑制が認められるかどうかを検討する。

4. 研究成果

この研究で用いたグルカゴン遺伝子ノックアウトマウスに発生した膵腫瘍は免疫染色によりシナプトフィジン陽性(図 3)、Ki-67 ラベリングインデックスが数%であること(図 4 赤色は Ki-67 を示す。(図 4 左) 緑色および赤色二重蛍光の蛍光顕微鏡写真 赤: Ki-67、緑 膵腫瘍細胞 (図 4 右))、クロモグラニン陽性であることを確認した。この結果はこの腫瘍がヒトの pNET G2 に相当する腫瘍と組織学的に酷似していることを示した。

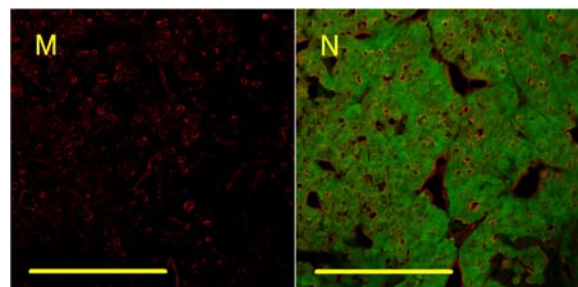


また、このマウスにおいては生後 15 ヶ月の時点で肝転移、腹膜播種を生じた。(可視光(図 5)および紫外線照射下のマクロ像(図 6 左)および肝臓の蛍光顕微鏡像(図 6 右) この結果はこのマウスに発生した膵腫瘍は、生物学的態度において pNTE G2 に酷似していることを示した。

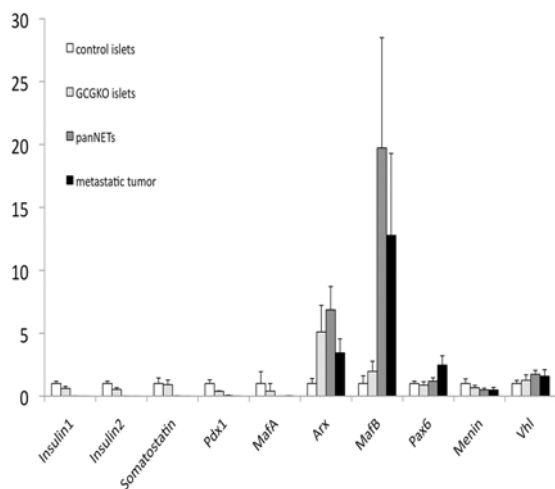


細胞増殖因子・血管新生因子の発現の検討

このマウスに発生した膵腫瘍細胞表面には VEGF の発現が認められた。(赤色は VEGF を示す。(図 7 左) 緑色および赤色の二重蛍光顕微鏡写真 赤: VEGF、緑: 膵腫瘍細胞 (図 7 右))



また膵腫瘍の細胞における mRNA の発現を RT-PCR により検討したところ、膵 B 細胞ではなく膵 α 細胞特異的遺伝子発現パターンが認められた。(図 8)



mTOR 阻害剤であるエベロリムス投与による腫瘍発生抑制効果の検討

このマウスに対して生後まもなくよりエベロリムスを継続投与したところ、膵腫瘍の発生を抑制する傾向が認められ現在データを解析中である。(論文作成中)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- ① Takano Y, Kasai K, Takagishi Y, Kikumori T, Imai T, Murata Y, Hayashi Y. Pancreatic Neuroendocrine Tumors in Mice Deficient in Proglucagon-Derived Peptides. PLoS One、査読有、10巻、2015、e0133812
DOI: 10.1371/journal.pone.0133812

〔学会発表〕(計2件)

- ① 武内 大、菊森 豊根 多発性内分泌腫瘍症の診断と治療 当院のMEN1に随伴する腫瘍の検討 第28回日本内分泌外科学会総会 平成28年5月26日 ロイヤルホール横浜(神奈川県・横浜市)
- ② Dai Takeuchi, Toyone Kikumori The efficacy and safety of total parathyroidectomy and autotransplantation for the treatment of hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 1 46th World Congress of Surgery 平成27年8月24日 Centara Grand & Bangkok Convention Centre at CentraWorld (タイ、バンコク)

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊森 豊根 (Toyone Kikumori)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90402635

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

林 良敬 (Hayashi Yoshitaka)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号：80420363

(4)研究協力者

無し