

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19325

研究課題名(和文)ポルフィリン合成経路代謝産物解析による新規膵癌診断法の開発

研究課題名(英文)The development of a new diagnostic method for pancreatic cancer by analyzing metabolites in porphyrin and heme synthetic pathway.

研究代表者

重川 稔(Shigekawa, Minoru)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00625436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではElastase1Creマウスを用いて膵臓の遺伝子改変を行うことで、腫瘍部に遺伝子変異を認め、非腫瘍部に遺伝子変異を認めない新規膵発癌遺伝子改変マウスの作成に成功した。膵発癌マウスに対してアミノレブリン酸(5-ALA)を静脈投与し膵凍結切片における5-ALA中間代謝物であるプロトポルフィリン(PpIX)の集積を蛍光顕微鏡で評価したところ、癌部だけではなく前癌病変であるPanINsにおいてもPpIX集積が確認された。今後、正常部とのさらなる比較検討が必要であるが、膵前癌病変の検出に5-ALA中間代謝物が有用である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：KrasLSL-G12D/+ Elastase1Cre Trp53flox/flox mice (KrasG12D-p53 deleted mice) showed pancreatic intraepithelial lesions (PanINs) and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) in 3 months. X-gal staining positive areas of the pancreatic tissue in Elastase1Cre crossing with ROSA26 mice was about 1-2% in whole pancreas. Positive areas of X-gal staining in the pancreas of KrasG12D-p53 deleted mice completely matched pancreatic tumors, whereas negative area of X-gal staining was morphologically normal acini (non-tumor lesions). We examined fluorescent positive areas of pancreatic frozen sections using fluorescence microscopy in KrasG12D-p53 deleted mice with intravenous injection of 5-ALA, and compared these fluorescent positive areas to histological findings of serial frozen sections with H&E staining. Positive fluorescent areas completely matched not only PDAC but also PanINs which are considered pre-cancerous lesions.

研究分野：膵臓

キーワード：膵癌 前癌病変 新規モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の膵癌年間死亡者数は約3万人と年々増加傾向であり、肺癌、胃癌、大腸癌について4番目の死因となっている。膵癌は年間罹患率と年間死亡数がほぼ同数であり、消化器癌の中で最も予後不良な癌腫の一つである。予後不良の要因の一つとして、発見時70%程度が非切除進行膵癌であり、早期発見が難しいことが挙げられる。非切除症例は根治が難しく、膵癌の予後を改善するためには切除可能な段階での早期発見が必要不可欠であり、適切な早期診断マーカーや膵癌危険群の同定が望まれる。

膵癌の前癌病変として pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs) が報告されている (Hruban R, et al. Am J Surg Pathol. 2004)。PanINs は膵管上皮の過形成や異型度を病理学的に形態から分類し、異型度に応じて PanIN-1~3 まで分類したものである。膵癌組織の検討から、PanIN-1 から上皮内癌に相当する PanIN-3 まで段階的に進行し、浸潤癌へ進展すると考えられている。また PanIN-1 から PanIN-3 に至るまで段階的に遺伝子変異や遺伝子欠失が蓄積されることも示されている。その中でも Kras 遺伝子点変異は PanINs の初期から認められることが報告されている。この PanINs から膵癌に至る過程は、膵癌モデルマウス (特異的に変異型 KRAS<sup>G12D</sup> 蛋白を発現する遺伝子改変マウス; Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> Pdx1Cre, KrasG12D マウス) を用いた検討で確認されており (Hingorani SR, et al. Cancer Cell. 2003) PanINs は1年以上の経過で進行膵癌へと進行すると報告されている。

癌細胞においてポルフィリン合成経路の中間代謝物であるプロトポルフィリン (Pp) が蓄積しやすいことが知られている (Ichizuka M, et al. Int Immunopharmacol. 2011)。ポルフィリン合成経路の最終代謝産物の一つであるヘムはミトコンドリアにおける ATP 産生に重要な役割を果たしているが、嫌気代謝下の癌細胞では解糖系が活性化している。このようにがん細胞ではヘムの合成がエネルギー代謝上必須でなく、このことがヘムの基質である Pp が腫瘍内において蓄積する要因の一つとして考えられているが、その詳細については未だ明らかとはなっていない。Pp は蛍光物質であり、腫瘍細胞に蓄積する特性を持つことから、担癌患者に対する蛍光診断や光線力学的治療 (photodynamic therapy, PDT) に応用されている。5-アミノレブリン酸 (5-ALA) はミトコンドリアにおいて合成される内因性のアミノ酸であり、ポルフィリン合成経路における最初の生成物であるが、5-ALA を外部より投与することで、癌細胞において Pp がより多く蓄積することから蛍光増感剤として用いられている。これまでに、膀胱癌や脳腫瘍、大腸

癌患者に対して 5-ALA を投与し蛍光発色を観察することで、腫瘍の局在診断 (5-ALA 蛍光診断) や PDT に臨床応用されている。また、担癌マウスに 5-ALA 投与を行い、代謝物であるポルフィリンが血清中や尿中に排泄されることが報告されている (Ichizuka M, et al. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2011)。膵癌領域においても、膵癌動物モデルに対する 5-ALA を用いた PDT の報告や 5-ALA を用いた膵癌転移性病変の局在診断を試みた報告などがなされている。しかしながら、癌の分化度、組織型や様々な遺伝子変異などの生物学的特徴や抗癌剤感受性と Pp 蓄積の関連性について検討した報告はなく、膵異型上皮や膵前癌病変である PanINs における Pp 蓄積の有無についてもこれまで詳細な検討されていない。

## 2. 研究の目的

癌細胞ではポルフィリン合成経路の代謝異常が認められ、ポルフィリン経路で代謝されるアミノレブリン酸 (5-ALA) の負荷により中間代謝物であるプロトポルフィリン (Pp) が蓄積する。しかしながら 5-ALA 投与後の前癌病変である PanINs における Pp の動態についても詳細な検討はなされていない。本研究では、組織型・分化度などの異なる膵癌細胞や前癌病変である PanINs における Pp をはじめとするポルフィリン合成経路中間代謝物の動態について検討する。本研究の遂行により、膵癌悪性度の新規診断法、早期発見のための膵前癌病変検出法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### [1] 膵癌遺伝子改変マウスの使用

本研究に用いる膵癌モデルマウスとして、前癌病変 PanINs を経て膵癌を発生する KrasG12D マウスや KrasG12D マウスとアポトーシス抑制タンパク質である Bcl-xL を強制発現させたマウス (Bcl-xLTg マウス) を交配したマウス (Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> Pdx1Cre Bcl-xLTg マウス; KrasG12D・Bcl-xLTg マウス) がん抑制遺伝子である p53 を完全欠損した KrasG12D・p53 欠損マウス (Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> Pdx1Cre Trp53<sup>flx/flx</sup>) を用いる。これまでの検討から、KrasG12D マウスでは PanIN-1~2 が2か月齢で膵全体の20%程度、約4か月齢で40%程度に認められ、さらに1年~1年半で浸潤性膵管癌に至ることが明らかとなっており、KrasG12D・Bcl-xLTg マウス、KrasG12D・p53 欠損マウスでは、2か月~4か月で膵管癌が形成され、KrasG12D マウスよりも癌の進展がより促進されることを確認している。

### [2] 膵癌遺伝子改変マウスを用いた腫瘍部、非腫瘍部における Pp 集積の評価

〔1〕で作成した複数の膵発癌モデルマウスにおいて、複数の月齢において膵発癌の有無などを検討する。具体的には、肉眼的所見および膵の組織所見を検討し、各月齢における肉眼的な膵腫瘍の有無、転移病変の有無、組織的に PanINs、非癌部、癌部の割合、さらに組織学的悪性度などを検討する。同時に得られる膵凍結検体から連続する膵凍結切片を作成する。この連続凍結切片を用いて蛍光顕微鏡観察および HE 染色を行う。蛍光顕微鏡観察では、励起光を 385 ~ 425nm、蛍光 430nm 以上に設定し観察する。蛍光顕微鏡観察で陽性細胞を検出し、連続切片で作成した HE 染色による組織像と比較検討することで、腫瘍部 (PanINs や癌部)、非腫瘍部における Pp の集積について評価を行う。

蛍光顕微鏡観察において Pp の蛍光強度が弱い場合や有意な差が認められない場合は、5-ALA をマウス尾静脈より静脈投与し、腫瘍部での中間代謝物の量を増加させることで同様の解析を行い、再検討を行う。5-ALA (250mg/kg) は尾静脈より静注する。経静脈投与した群では膵への分布および 5-ALA の半減期を考慮し、投与後 1 時間で同様の検討を行う。

#### 4. 研究成果

##### 〔1〕新規膵癌モデルマウスの樹立

KrasG12D マウスを用いた検討では、前癌病変 PanIN-1 ~ 2 は 2 か月で膵の 20% 程度、4 月半で 40% 程度に認められ、さらに 1 年 ~ 1 年半の自然経過で浸潤性膵管癌に至ることが確認された。KrasG12D・Bcl-xLTg マウスでは KrasG12D マウスと比し、癌の進展が促進され、より厳しい予後を呈したが、組織学的には主に高分化型であり、肉眼的に遠隔転移を認めるマウスは稀であった。KrasG12D・p53 欠損マウスはこれらのマウスよりさらに予後不良であり、組織学的にも分化度の低い癌を呈した。これらのマウスは KrasG12D マウスをベースに交配し作成しているが、KrasG12D マウスでは Pdx1Cre マウスを用いるため、組織形態的に正常膵腺房細胞と観察される細胞 (非腫瘍細胞) においても Kras 遺伝子変異が導入されており、Kras 変異がポルフィリン合成経路にどのような影響を与えるかについては不明であり、本検討において KrasG12D マウスを使用する問題点として考えられた。

当教室で飼育されている Elastase1Cre マウスは腺房細胞特異的に Cre recombinase を発現するマウスである。本マウスと ROSA26 マウスを交配し、X-gal 染色を用いて膵腺房細胞における Cre recombinase 発現効率を確認したところ、全腺房細胞の 1-2% 程度であることが確認された。そこで、この Elastase1Cre マウスと Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> マウスを交配させ、さらに腫瘍形成をより促進するために

Trp53<sup>flox/flox</sup> マウスを交配させることで、Kras 遺伝子変異および p53 遺伝子欠損を伴う腫瘍部とそれぞれの遺伝子変異および欠損を伴わない正常膵 (非腫瘍部) の対比が可能な新規膵発癌マウス (Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> Trp53<sup>flox/flox</sup> Elastase1Cre) の作製を試みた。同マウスは 3 か月齢で肉眼的に膵腫瘍を認め、組織学的に膵癌であることを確認した。さらに ROSA26 マウスと交配させ Cre 発現の局在について検討を行うと、腫瘍部で X-gal 染色が陽性となり、非腫瘍部で X-gal 染色が陰性となることが確認でき、遺伝子変異を伴う腫瘍部と遺伝子変異を伴わない正常部の比較検討が可能な新規膵癌モデルマウスの作製に成功した。

##### 〔2〕膵発癌遺伝子改変マウスを用いた腫瘍部、非腫瘍部における Pp 集積の評価

12 か月齢の KrasG12D マウスの膵凍結切片を用いて蛍光顕微鏡観察を行い、腫瘍部における PpIX 集積を評価したところ有意な蛍光発色は観察されなかった。このため、アミノレブリン酸 (5-ALA) の介入が必要と考え、5-ALA を尾静脈より投与した 3 か月齢の Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> Trp53<sup>flox/flox</sup> Elastase1Cre マウス、12 か月齢の KrasG12D マウスおよびコントロール (PDX1Cre) マウスの膵凍結切片を用いて、5-ALA 中間代謝物である PpIX 発現の有無を蛍光顕微鏡で評価した。同時に連続切片を HE 染色し、組織学的に比較検討を行った。5-ALA を投与したコントロールマウスでは正常膵腺房細胞において蛍光発現は認められなかった。KrasG12D マウスでは、形態的に正常な腺房細胞でも蛍光発色を認めたものの、前癌病変 PanINs においてより強く蛍光発色を認め、さらに癌部においてより強い蛍光発色を認め、腫瘍の進展に伴う蛍光発色増強が示唆された。また、今回検討した月齢において Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> Trp53<sup>flox/flox</sup> Elastase1Cre マウスの膵組織を検討したところ、PanINs は認められず PanINs と正常部の比較検討は困難であったが、癌部において強い蛍光発色が認められた。今後、正常部とのさらなる比較検討が必要であるが、浸潤癌のみならず前癌病変の検出に 5-ALA 中間代謝物が有用である可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重川 稔 (SHIGEKAWA, Minoru)  
大阪大学・大学院医学系研究科  
・消化器内科学・助教  
研究者番号：00625436

(2) 研究分担者

該当なし  
研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし  
研究者番号：

(4) 研究協力者

池澤 賢治 (IKEZAWA, Kenji)  
佐藤 克彦 (SATO, Katsuhiko)