

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2017～2019  
 課題番号：17K18254  
 研究課題名(和文)2段階細胞系譜追跡法の開発を通じた膵障害後の腺房細胞を起点とするがん化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of canceration derived from injured pancreatic acinar cells through developing two-step lineage-tracing system

研究代表者  
 厚海 奈穂(ATSUMI, Naho)  
 関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90612151  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がんは、早期であっても予後不良であるのに加えて、症状がほとんど出ないために早期発見が難しい。膵臓がん進展のメカニズムの解明を通して新たな治療法を開発する必要がある。膵臓がんの原因の一つとして慢性膵炎が指摘されており、マウス実験から、その発生母地は腺房細胞だと考えられている。

本研究では、腺房細胞の障害への応答が発がんの引き金になる可能性を検証し、そのメカニズムを探るため、障害後の腺房細胞の状態を組織学的および分子生物学的に解析することにした。そのために、2種類の細胞の状態に応じてそれぞれ異なる標識をつけて追跡することを目的とした、2段階細胞系譜追跡法を新たに開発した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

2段階細胞系譜追跡法では、2つの状態(細胞種)を経験したことの目印をつけてその細胞の命運を追跡することで、生体内で多段階の分化系譜を規定できる。さらに、掛け合わせるドライバーマウスを替えることで、他の臓器の異なる現象にも応用可能だという意義がある。例えば、幹細胞あるいは前駆細胞を1段階目に、がん幹細胞を2段階目に標識・追跡することで、がんの起源細胞の同定につながる可能性がある。また、1段階目に幹細胞を、2段階目に前駆細胞マーカー候補陽性細胞を標識し、2つの標識を持つ細胞が終末分化細胞へと分化するかを調べることで、階層的な制御機構によって、器官が維持されているかを検証できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of how pancreatic cancer develops is strongly needed, because of its bad prognosis and difficulty in its early detection due to lack of subjective symptoms. Chronic pancreatitis has been pointed out as one of the causes of pancreatic cancer, and acinar cells are considered as its origin based on the experiments using several mouse models. We launched ourselves on histological and biological analysis of injured pancreatic acinar cells to study the possibility that the response of acinar cells to injury triggers canceration. For this purpose, we've developed two-step lineage-tracing system, which marks two different cellular states, such as undifferentiated and transit-amplifying ones, with two different fluorescent proteins and enables us to trace the cells with the two markers.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：遺伝子改変マウス 細胞系譜追跡 膵臓がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓がんの5年生存率は、ステージ Ⅰ で57%、ステージ Ⅱ では3~11% であり、全種類のがんの平均よりも低い。このように膵臓がんは、早期であっても予後不良であるのに加えて、症状がほとんど出ないために早期発見が難しいのが特徴である。発見が遅れることから手術によって切除できる症例が少なく、膵臓がん進展のメカニズムの解明を通して新たな治療法を開発する必要がある。膵臓がんの原因の一つとして、慢性膵炎が指摘されている。膵炎を発症した人の約4割が膵臓がんにより死亡するからである。マウスでも同様であり、膵臓の腺房細胞特異的に *Kras* 変異を導入しただけのマウスでは、前がん病変である膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) が生じるものの膵臓がんへ進行する頻度は低いが、さらに薬剤 (セルレイン) を投与して慢性膵炎を起こすと膵臓がんを高率に発症する (Guerra C et al., 2007)。これらの事実から、腺房細胞の障害への応答が発がんの引き金になる可能性が想定される。これに対して、腺房細胞ではなく膵管細胞に *Kras* 変異を導入して同様に障害を加えてもがん化しない (Ziv O et al., 2013)。また、内分泌細胞 (膵島を構成する細胞) は、がんの起源になり得るかわかっていない。慢性膵炎ががんに関連することから、膵障害後の腺房細胞の挙動を調べ、中途段階で発現するいくつかの遺伝子を見出した。

## 2. 研究の目的

障害を受けた腺房細胞が、どのような細胞の状態を経て再生に寄与するかを、組織学および分子生物学的に解明する。そのために、新たに **2 段階細胞系譜追跡マウスを作出し、腺房細胞と中途段階とをそれぞれ標識し追跡することで可視化する。**各段階の細胞をセルソーターにより分取して、単細胞レベルで遺伝子発現の網羅的解析を行う。さらに、障害と発がんモデルとを組み合わせたものに、開発した2段階細胞系譜追跡法を適用することで、**障害に応答した腺房細胞が、中途段階を経てがん化する詳細な機構を解明する。**

## 3. 研究の方法

### (1) 2 段階細胞系譜追跡法の開発

**腺房細胞 (標識 1) と中途段階 (標識 2) を経た再生過程を可視化**するための新たなコンストラクトを作製する。標識は蛍光で行うため、2色の蛍光を持つ細胞の単細胞遺伝子発現解析も可能となる。

(2) **2 段階細胞系譜追跡に必要なマウスの作出:** 中途段階を規定するいくつかの候補遺伝子の下流で、テトラサイクリン応答因子 (tetO) および DNA 組換え酵素 flippase を発現する BAC Tg マウスを作出する。

(3) 2 段階細胞系譜追跡法を用いた、膵障害モデルの作製と腺房細胞の再生過程の解析:  
**腺房細胞 (標識 1) の中途段階 (標識 2) を経た再生過程を可視化**する。標識を持つ細胞の単細胞遺伝子発現解析を行い、「**腺房細胞の子孫**」の増殖に関する遺伝子群を同定する。

(4) **慢性膵炎モデルを作製し、腺房細胞が、中途状態を規定する遺伝子と膵臓がん誘発遺伝子の持続的高発現を経て膵がんを発症するかどうかを 2 段階細胞系譜追跡法との組み合わせによって検証する。**

## 4. 研究成果

### (1) 2 段階細胞系譜追跡法の開発

**2 段階細胞系譜追跡法の原理**は以下のとおりである。2 段階細胞系譜追跡法は、以下 3 つの系統の交配により得られた産仔を用いる。

- ・Elastase1-CreERT2 ; 腺房細胞特異的に CreERT2 を発現
- ・Gene X-tetO-flippase ; 中途段階において発現する遺伝子 (Gene X) の制御下においてテトラサイクリン応答因子 (tetO) と flippase を発現
- ・Rosa26<sup>Venus-rtTA-mKeima</sup> ; 2 段階細胞系譜追跡マウス

**【1 段階目の標識】** 全身の細胞に発現する Rosa26 locus に 2 段階細胞系譜追跡用コンストラクトをノックインする。先頭に loxP で挟まれた終止コドンを入れる。これにより、タモキシフェンによる 1 回目の誘導 (誘導 1) によって CreER が活性化して終止コドンが取り除かれた場合にのみ、蛍光 1 (Venus) が発現する。**誘導 1 によって腺房細胞特異的に、1 つ目の蛍光標識 (Venus) を付ける。同時に、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) 蛋白質も発現するようになる。1 つ目の蛍光標識と rtTA の発現は、細胞が分裂した場合も、分化などにより腺房細胞でなくなった場合も受け継がれる。**

**【2 段階目の標識】** ドキシサイクリンを投与して 2 回目の誘導を行う (誘導 2)。rtTA 蛋白質発現を受け継いでいる細胞 (= 誘導 1 の時点で腺房細胞だった細胞) のうち、誘導 2 の時点で 中途段階を規定する遺伝子を発現するようになった細胞では、ドキシサイクリンによる誘導によって rtTA 蛋白質が活性化されて テトラサイクリン応答因子 (tetO) 配列に結合し、flippase が転写される。Flippase は 2 段階細胞系譜追跡コンストラクトの frt 配列間の配列を切り出す。その結果、**腺房細胞の標識 1 を持ち、誘導 2 の時点で中途状態であった細胞 (flippase を発現) にのみ 2 個目の蛍光標識 (mKeima) が誘導される。** 以上の方法で、腺房細胞 (蛍光標識 1) から中途段階を経た細胞に蛍光標識 2 をつける。標識 1 と同様、標識 2 も、細胞が分裂・分化した後も受け継がれる。

## (2) 2 段階細胞系譜追跡に必要なマウス (Gene X-tetO-flippase) の作出

【概要】 1 回目の腺房細胞標識を持っている細胞特異的に 2 回目の中途段階にある細胞の標識を誘導するためのマウス (BAC Tg ; BAC トランスジェニックマウス) を作出する。具体的には、中途段階を規定する遺伝子の下流で、テトラサイクリン応答因子 (tetO) と DNA 組換え酵素 flippase を発現するものである。

【方法】 BAC Tg マウスを作出して、ノックインマウスの様な正確な発現制御とトランスジェニックマウスの迅速な作出を両立させる。BAC クローンは、標的遺伝子座だけでなく、発現調節に関わるコアプロモーターやエンハンサーも含む。そのため、内在性の発現パターンを良く再現して挿入遺伝子が発現する。組換え用 plasmid (遺伝子配列を挿入する箇所の両端の homology arm と挿入する遺伝子配列を含む) を作製して大腸菌内相同組換えを行う。組換え BAC クローンをマウス受精卵に注入して移植すると、通常の Tg マウスと同様に次の世代で目的のマウスが得られる。

2 段階細胞系譜追跡法のためのコンストラクトを作製した。これを用いて、まずは *in vitro* で *in vivo* における 2 段階細胞系譜追跡を再現する予備実験を行った。

( ) COS7 細胞へ Cre 発現プラスミドとの double-transfection を行い、Venus が発現することを確認した。

( ) Cre および Flippase 発現プラスミドとの triple-transfection により Venus と mKeima が発現することを確認した。しかし、mKeima の発現率が十分でないと考えられたため、改善のための検証を行った。2 つの遺伝子発現 (Venus と mKeima) を両立させるために IRES 配列を用いているが、P2A や T2A の使用を検討する、あるいは mKeima を使用していることに何等かの原因がある場合、別の蛍光タンパク質を使用するなどの解決方法が考えられたため、今後の検討課題としている。上記 ( ) の実験においては、3 つのプラスミドを別個に transfection しているため、同一細胞において 3 つのプラスミドが共発現している確率は高くないと考えられる。そのため、mKeima の発現効率の低さの原因は、単に Flippase 発現効率が低かっただけの可能性も想定される。コンストラクト作製に難航したため 2 段階細胞系譜追跡マウスの個体化には至っていないが、ES クローンは取得したため、まずはこの ES クローンに対して Cre および Flippase を効率良く発現させることで確認が可能となると考えられる。

本研究で新たに開発した 2 段階細胞系譜追跡法では、2 種類の細胞の状態に応じてそれぞれ異なる標識をつけることで、2 つの状態（細胞種）を経験したことの目印をつける。2 つの標識を両方とも持つ細胞の命運を追跡することで、生体内で多段階の分化系譜を規定できる。本研究は**時系列を追って細胞の状態の変化を標識し、その後の細胞の命運を視覚化**することが独創的な点である。

さらに、2 段階細胞系譜追跡マウスでは、掛け合わせるドライバーマウスを替えることで、標識する遺伝子を任意に選ぶことができるため、**他の臓器の異なる現象の検討にも応用可能だ**という意義がある。例えば、がん幹細胞の正常組織における由来が、組織幹細胞であるか、ある程度分化した前駆細胞であるかはまだわかっていないことが多い。幹細胞あるいは前駆細胞を 1 段階目に標識、がん幹細胞マーカーを 2 段階目に標識・追跡することで、**がんの起源細胞の同定につながる可能性がある。**

2 段階細胞系譜追跡法の他の応用例としては、組織の維持にあたって、まだ幹細胞および前駆細胞を含む階層構造が機能しているかわかっていない臓器の解析が考えられる。1 段階目に幹細胞を標識、2 段階目に前駆細胞マーカー候補陽性細胞を標識し、2 つの標識を持つ細胞が終末分化細胞へと分化するかを調べることで、**階層的な制御機構によって、器官が維持されているかを解明できる可能性がある。**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 厚海奈穂、上野博夫	4. 巻 第33巻 第6号
2. 論文標題 乳がんの起源とクローン進化の解明 多色細胞系譜追跡法によるアプローチ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioClinica	6. 最初と最後の頁 76-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 厚海奈穂、上野博夫	4. 巻 第33巻 第9号
2. 論文標題 乳がんの起源細胞とクローン進化の解明に向けた新アプローチ 多色細胞系譜追跡法およびその発展法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioClinica	6. 最初と最後の頁 84-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 厚海奈穂、上野博夫	4. 巻 第2巻 第2号
2. 論文標題 乳がんの起源細胞とクローン進化の解明に向けた新しいマウスモデルの開発 多色細胞系譜追跡法およびその発展法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PrecisionMedicine	6. 最初と最後の頁 57-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----