

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22800

研究課題名（和文）ヒト膵癌モデル動物の確立および新規バイオマーカーとしてのエクソソームの解析

研究課題名（英文）Establishment of human pancreatic cancer model animals and analysis of exosomes as novel biomarkers

研究代表者

小川 光平（Ogawa, Kohei）

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：20882781

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：我々が独自開発した膵臓選択的ハイドロダイナミック遺伝子導入法により、膵癌モデル動物の確立を目指した。膵臓は多段階発癌する自然史が判明しており、その関連遺伝子として報告のあるKRAS、CDKN2A、TP53、SMAD4およびYAP遺伝子を選択した。これら遺伝子をハイドロダイナミック法を用いて、膵臓選択的に遺伝子導入を行った。その中で、KRAS遺伝子とYAP遺伝子で膵管がんの発生を来す個体を認めた。そこで、より効果的に膵発癌を来すことを狙って、KRAS遺伝子とYAP遺伝子を同時に遺伝子導入を行った。さらに複数回遺伝子導入を繰り返すことで早期に膵癌モデル動物が作成できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌モデル動物は、これまで報告がない。この膵癌モデル動物が作出方法が確立されたことで、これまで最難治の癌である膵臓の新規治療や早期発見のバイオマーカー確立につながる革新的な研究成果と考える。この基礎研究が、将来膵癌患者の生命予後改善に寄与しうる期待して、膵臓組織からのタンパクやエクソソーム解析を引き続き行っていくことが重要である。

研究成果の概要（英文）：We aimed to establish an animal model of pancreatic cancer using our original pancreatic selective hydrodynamic gene delivery method. The natural history of pancreatic cancer is known to be multistage carcinogenesis, and KRAS, CDKN2A, TP53, SMAD4, and YAP genes, which have been reported to be related genes, were selected. These genes were selectively introduced into the pancreas using the hydrodynamic method. Among them, we found an individual that develops pancreatic duct cancer with KRAS gene and YAP gene. Therefore, in order to induce pancreatic carcinogenesis more effectively, the KRAS gene and the YAP gene were introduced simultaneously. Furthermore, it was confirmed that pancreatic cancer model animals could be created at an early stage by repeating gene transfer multiple times.

研究分野：悪性腫瘍

キーワード：膵癌 モデル動物 遺伝子ハイドロダイナミック法 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は、固形腫瘍の中でも最難治の癌と言われている。その原因は、早期診断が困難で有効な治療が確立されていないことに起因する。従って、膵癌の早期診断を可能とするための、簡便で診断能の高いバイオマーカーの確立が重要である。近年、癌の早期診断のための細胞外小胞(エクソソーム)の解析が進められており、予後不良の膵癌の早期診断、治療法の開発にも寄与すると期待できる。一方で、内包される miRNA や種々の蛋白などの解析のためには、ヒト膵癌モデル動物を用いた検討が必要である。従って、汎用しうる有用なヒト膵癌モデルの確立とそのモデルを使ったエクソソームの解析が、ヒト膵癌の診断さらには治療の検討に重要な基盤となると考えた。

申請者らは、これまでの研究で、膵臓に選択的に遺伝子を導入する方法を考案し、同方法論を用いて、Ras 変異体発現プラスミドを中心とした複数の遺伝子の導入により、短期間で野生型ラットに膵癌の発生と転移を認め、ラット膵癌モデルを作出した。このラット膵癌モデルを用いて、ヒト膵癌の早期診断マーカーを確立でき、その問いに答えを見いだせると考えた。そのマーカー候補として、近年、多くの癌種で注目されている、癌細胞から放出される 40-150 nm 程度の小胞すなわちエクソソームに着目した。このエクソソームは様々な miRNA や蛋白などを含み、血中を流れ、臓器間のシグナル伝達、さらには癌の進行、転移などに寄与することが報告されている (San Lucas FA, et al.: Ann Oncol. 2016)。癌種やがんの進行などによって、特異的な mRNA、miRNA および蛋白が内包されているとされ、解析が進められている。膵癌においても、癌の微小環境における細胞間コミュニケーションを制御していることが明らかにされている (Allenson K, et al.: Ann Oncol. 2017)。

従って、癌において、その診断のために組織学的診断や従来からの腫瘍マーカーに加えてエクソソームが重要なツールとして位置づけられ、リキッドバイオプシーとして注目されている。予後不良な膵癌に対しても、エクソソームの解析はヒト検体を用いて、検討されているが、腫瘍組織そのものの十分量の採取が困難であることもあり、膵癌の早期診断への応用にはまだ十分な知見の蓄積がなされていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、膵癌の早期診断マーカーを確立したいという、問いに対して、膵臓に選択的に遺伝子を導入する方法論を用いて、Ras 変異体発現プラスミドを中心とした複数の遺伝子の導入により、短期間で野生型ラットに膵癌を発生させる、ラット膵癌モデルの確立を目指す。そして、この膵癌モデル動物を用いて、膵癌組織の評価と放出される特異的なエクソソームの抽出、同定を行い、内包成分の特徴、分子生物学的評価を行うことにより、新規バイオマーカーとしての有効性を検証し、確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 膵癌モデル動物の確立

申請者らが確立した方法で、ラット膵癌モデルを作出する。野生型ラットの上腸間膜静脈にカテーテルを挿入し、一時的に門脈を結紮して、血流分布を膵臓限局的にした状態で、ヒト膵癌関連遺伝子発現プラスミドをハイドロダイナミック (HGD) 法で導入する。導入遺伝子の候補としては、膵発癌関連遺伝子として報告のある Kras、Kras mutant (G12D)、Myc、Nras、Yap を単独または組み合わせで導入を行う。その後は、定期的な全身状態評価と採血、さらには本学動物実験施設に設置されている動物用 CT を用いて、膵癌発生の有無を確認することで、短期間に効率的に膵癌を発生させる候補遺伝子を選定する。

### バイオマーカーとしてのエクソソーム検討

で作出したラット膵癌モデルから経時的に採取していた血清エクソソームから、正常ラットと比較して発現が変化している miRNA、蛋白を抽出し網羅的に解析する。さらに経時的腫瘍因子の変化(腫瘍径、個数、組織学的な悪性度(ki-67, MUC 等の染色評価)と発現変化のあった miRNA、蛋白について real-time PCR, Western Blot で行った解析を対比することで、血中バイオマーカーとしてのエクソソームの有用性を検証する。

## 4. 研究成果

Kras、Kras<sup>G12D</sup>、Myc、Yap 発現プラスミド DNA 溶液を単独あるいは組み合わせで膵臓選択的遺伝子導入 (HGD 法) をする。

変異型 Kras を導入した群では、HE 染色で膵管上皮の乳頭状変化、核の極性消失など前癌病変と考える変化を認め、Ki67、MUC5AC 陽性細胞が増加した。MUC5AC は膵上皮内腫瘍性病変の初期

から陽性になることが知られている。Yap 単独では膵管上皮の異形を認めなかった。

発癌シグナルが低下する HGD 後 4 週間後に再度 HGD を実施 (研究結果の結果より Kras<sup>G12D</sup>、Yap の組み合わせ)。

取水間領域における、腫瘍性変化では、変異型 Kras を 1 回導入した個体と比較して、変異型 Kras を 2 回導入した個体では、上皮内癌と考える組織像を認め、Ki67 陽性細胞数も増加した。MUC5AC は HGD 単回と複数回で有意差を認めなかった。

腺房細胞領域における腫瘍性変化では、変異型 Kras および Yap を 2 回導入することにより、膵腺房細胞と隣接して、acinar to ductal metaplasia と考える腺管と、それに連続する腺癌と間質増生を認め PDAC と判断した。さらに Kras<sup>G12D</sup> + Yap を 2 回導入した個体では、Ki67 陽性細胞数の上昇、血清 CA19-9 の上昇を認めた。以上より 5 週間という短期間で膵頭部に肉眼的な腫瘤形成を認めた。

膵炎などのストレス下で、腺房細胞は管状の構造へと形態変化する (ADM)。また変異型 Kras は炎症性障害と相乗的に作用し、転写調節因子である Yap、TAZ を介して持続的な ADM を引き起こし、PDAC へと発展することが報告されている。本モデルで認めた PDAC は、腺房細胞が起源と考えられた。

Kras<sup>G12D</sup> 及び Yap を膵臓選択的 HGD 法で導入することにより、ADM を経て PDCA が発生した。主膵管領域では浸潤癌を認めなかったことから、本モデルで発生した腫瘍は腺房細胞が起源と考えられた。Kras<sup>G12D</sup> 単独と比較し、Kras<sup>G12D</sup> と Yap を組み合わせて導入した個体では、ADM 及び PDCA の発生率が上昇し、転移をも生じた。

Kras 下流の転写制御因子 YAP は、膵癌進行に重要なエフェクターとして知られており、YAP は上皮細胞の細胞接着因子を阻害し、間葉系遺伝子の発現を亢進させ、上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) を引き起こすことから膵癌の発生に関与するだけでなく、膵癌細胞の浸潤、転移を促進する。今回の研究結果で、Yap を導入した個体では腺癌細胞のカドヘリンスイッチを認め EMT が促進していたことも確認できた。

以上より、研究成果のまとめは以下の通りである。

- ・主膵管では、Kras<sup>G12D</sup> の増幅により、膵管上皮細胞の腫瘍性変化が促進された。上皮内癌と考える組織像を認めたが、浸潤癌は認めなかった。Yap 単独では腫瘍性変化を認めなかった。

- ・腺房細胞領域では、Kras<sup>G12D</sup> 及び Yap を HGD 法で 2 回導入するより、5 週で ADM を経て PDAC が生じた。

- ・Kras<sup>G12D</sup> 単独群と比較して、Kras<sup>G12D</sup> + Yap 群では発癌率、転移率が上昇した。免疫組織化学染色では、Kras<sup>G12D</sup> + Yap 群で Ki67 陽性細胞とカドヘリンスイッチを認め、上皮間葉転換が促進していた。

- ・発癌メカニズムの解析では、Kras<sup>G12D</sup> 及び Yap の HGD 後、Erk、Akt、TGF $\beta$ 、CTGF の関与するシグナル伝達経路の活性化を認め、ヒト膵癌を模倣した腫瘤形成と、発癌シグナル伝達を認めた。

この研究により、ヒト膵癌関連遺伝子の膵臓選択的な HGD により膵癌ラットモデルが確立した。さらに発癌メカニズムの解析により新規治療法、早期診断法の開発に寄与できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shibata O, Kamimura K, Tanaka Y, Ogawa K, Owaki T, Oda C, Morita S, Kimura A, Abe H, Ikarashi S, Hayashi K, Yokoo T, Terai S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Establishment of a pancreatic cancer animal model using the pancreas-targeted hydrodynamic gene delivery method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Ther Nucleic Acids .	6. 最初と最後の頁 342-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtn.2022.03.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------