

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08705

研究課題名(和文) 膵内分泌腫瘍モデルマウスを用いたアミノ酸代謝異常を介した発がん機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of development of pancreatic neuroendocrine tumors mediated by abnormal amino acid metabolism using a mouse model

研究代表者

堀 美香 (Hori, Mika)

名古屋大学・環境医学研究所・講師

研究者番号：60598043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：グルカゴン遺伝子コード領域を緑色蛍光蛋白質GFP cDNA に置換したグルカゴン遺伝子欠損マウスでは、10か月齢から膵神経内分泌腫瘍(panNET)が発生し、肝臓では多数のGFP陽性細胞を認め、15か月齢まで生存した雄マウスの一部で肝転移巣を認めた。肝転移巣では内分泌顆粒マーカーのChromogranin A、Synaptophysin は弱陽性であった。肝臓で観察されるGFP陽性細胞は、膵内分泌もしくは免疫細胞の特徴を示した。panNET のゲノム解析から細胞増殖や浸潤に関連する43 遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおいてもグルカゴン受容体遺伝子のホモ型変異により多発性のpanNETが発生し、非常に稀なMahvash disease と呼ばれている。グルカゴン遺伝子欠損マウスでは、肝臓で観察されたGFP陽性細胞から微小転移、肝転移巣と転移が進展することが予想され、本マウスはMahvash disease及び肝転移機構の解析に良いモデルとなりうる。

研究成果の概要(英文)：In glucagon gene-deficient mice in which the glucagon gene coding region was replaced with green fluorescent protein GFP cDNA, pancreatic neuroendocrine tumors (panNET) developed from the age of 10 months, and numerous GFP-positive cells were observed in the liver. Liver metastases were observed in some male mice that survived to 15 months of age. Endocrine granule markers Chromogranin A and Synaptophysin were weakly positive in liver metastases. GFP-positive cells observed in the liver showed characteristics of pancreatic endocrine or immune cells. Through genome analysis of panNET, we identified 43 genes related to cell proliferation and invasion.

研究分野：病態医科学

キーワード：膵神経内分泌腫瘍 グルカゴン 肝転移 遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

膵神経内分泌腫瘍 (pancreatic neuroendocrine tumor: panNET) は 10 万人に 1 人の頻度で発見される希少がんであり、膵臓がんの 1-2% を占める。近年の大規模なゲノム解析研究から panNET の 40%、10%、20% にがん抑制遺伝子 *MEN1* 遺伝子変異、クロマチンの再構築やテロメア長の維持に関わる *ATRX*、*DAXX* 遺伝子変異が検出された (Scarpa et al. Nature, 2017, 543, 65)。また、mTOR 経路の *TSC2*、*P TEN*、*PIK3CA* 遺伝子変異 (Jiao et al. Science, 2011, 331, 1199) や DNA 修復に関わる *MUTYH*、*CHEK2*、*BRCA2* 遺伝子変異 (Scarpa et al. Nature, 2017, 543, 65) も認められる。panNET は近年増加傾向にあるが、腫瘍から樹立された細胞株も稀であるため、その生物学的な特性や発がん機構については十分な解析が進められていない。

グルカゴンは膵  $\alpha$  細胞においてプログルカゴンからプロセッシングを受けて分泌され、主に肝臓に作用し、血糖上昇作用に加えてアミノ酸代謝に寄与する。我々のグループでは、グルカゴンと glucagon-like peptide-1 (GLP-1: インスリン分泌促進による血糖低下作用を有するホルモン) がプログルカゴンを共通の前駆体として産生されるという点に着目し、グルカゴン遺伝子のコード領域を GFP cDNA に置き換えたグルカゴン遺伝子欠損 (*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>*) マウスを作製した。このマウスでは血糖値は正常であるが高アミノ酸血症を呈し、GFP 陽性の膵島  $\alpha$  細胞の過形成が認められた (Watanabe et al. Diabetes, 2012, 61, 74)。さらに、*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウスでは 10 か月齢程度から panNET が発生し、15 か月齢では 42% のマウスにおいて肝転移が認められ、悪性度が高いことが明らかになった (Takano et al. PLoS ONE, 2015, 10, e0133812)。しかしながら、*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウスにおいて、高アミノ酸血症やグルカゴン遺伝子を欠損した  $\alpha$  細胞が panNET の発がん過程にどのように関わるのか明らかではない。

## 2. 研究の目的

*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウスを用いて、高アミノ酸血症やグルカゴン遺伝子を欠損した  $\alpha$  細胞が panNET の発がん機構にどのように寄与するのかを明らかにすることにより、panNET の発がん過程を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) グルカゴン遺伝子欠損マウスから自然発生した panNET の生物学的特性解析

雌雄の *Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウスの生存曲線について調べた。*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウスにおいて、膵臓  $\alpha$  細胞、panNET を含む膵組織切片の病理学的解析及び免疫染色を実施した。*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウスのうち肝転移巣を有するマウス (n=4)、有さないマウス (n=5) の panNET を含む膵臓パラフィン組織切片について、抗 Ki67 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。各切片において最も Ki67 陽性率が高い panNET を選び、ハイブリットセルカウントを用いて、撮影画像のヘマトキシリン陽性核に対する Ki67 陽性核の割合を算出した。*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウス由来 panNET 及び肺 (コントロール) の凍結組織 (n=4) から DNA を抽出し、全エクソン解析を行った。

### (2) panNET 由来オルガノイド培養

*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウス由来 panNET の酵素処理を行い、オルガノイド培養を行った。

### (3) $\alpha$ 細胞及び血中・肝臓内 GFP 陽性細胞の特性解析

12 週齢の *Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* 及び *Gcg<sup>gfp/+</sup>* マウスから膵島単離・RNA 抽出を行い、遺伝子発現解析を行った。肝転移巣を有する *Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウスの下大静脈から血液を採取後、溶血により赤血球を除去し、細胞を固定後、フローサイトメーターを用いて血液細胞の解析を行った。panNET を発生した *Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウスの膵臓組織切片の免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

### (1) グルカゴン遺伝子欠損マウスから自然発生した panNET の生物学的特性解析

雌雄の *Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウスの生存曲線について調べたところ、雌は 12 か月齢、雄は 14.5 か月齢で

生存率は56%であった。12か月齢以上のすべての  $Gcg^{gfp/gfp}$  マウスで panNET の発生を認め、肝臓においても多数の GFP 陽性細胞が確認された。15か月齢まで生存した雄の  $Gcg^{gfp/gfp}$  マウスの一部において肝転移を認めた。免疫組織学的解析から、 $Gcg^{gfp/gfp}$  マウスの膵島  $\alpha$  細胞及び panNET は膵内分泌細胞マーカーである Chromogranin A、Synaptophysin、NCAM、 $\alpha$  細胞の転写因子である ARX 陽性であった。肝転移巣では ARX 及び NCAM 陽性であったが、Chromogranin A、Synaptophysin は弱陽性であった。肝転移巣を有する  $Gcg^{gfp/gfp}$  マウス及び有さない  $Gcg^{gfp/gfp}$  マウスの panNET における Ki67 陽性率は3~20%であり、高分化型の NET G2(増殖能が低く、低~中悪性度を示す)に分類された。肝転移巣の有無で Ki67 index に差は認められなかった。

panNET の全エクソン解析から、解析したすべてのマウスで共通して体細胞変異を有する 43 遺伝子を同定した。43 遺伝子は細胞増殖や浸潤に関連しており、 $Gcg^{gfp/gfp}$  マウスで発生する panNET の発生・進展に寄与する可能性があり、現在詳細な解析を行っている。

## (2) panNET 由来オルガノイド培養

$Gcg^{gfp/gfp}$  マウス由来 panNET の酵素処理を行い、マトリゲルを用いてオルガノイド培養を行った。培養中、GFP 陽性細胞の増殖は認められず、GFP 陰性の膵管様細胞の増殖が認められた。培養液の検討が必要である。

## (3) $\alpha$ 細胞及び血中・肝臓内 GFP 陽性細胞の特性解析

panNET は  $\alpha$  細胞由来であり、その発生過程を明らかにするために、膵島単離を行った。 $Gcg^{gfp/gfp}$  マウスの膵島では、 $Gcg^{gfp/+}$  マウスの膵島と比較して、 $\alpha$  細胞の増殖に関連する *MafB*、*Arx* 遺伝子、アミノ酸トランスポーターの *Slc38a5* 遺伝子の発現が増加していた。 $Gcg^{gfp/gfp}$  マウスの血液細胞において、GFP 陽性細胞は顆粒球、単球、リンパ球集団の領域に分布していた。肝臓で観察された GFP 陽性細胞の中には、Chromogranin A、Synaptophysin、NCAM もしくは ARX に陽性で  $\alpha$  細胞の性質を有する細胞、マクロファージマーカーである F4/80 に対して陽性で免疫細胞の性質を有する細胞が存在した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀美香、前田康喜、今井俊夫、筆宝義隆、豊國伸哉、林良敬
2. 発表標題 グルカゴン遺伝子欠損マウスで自然発症する膵内分泌腫瘍の解析
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀美香、前田康喜、今井俊夫、筆宝義隆、豊國伸哉、林良敬
2. 発表標題 グルカゴン遺伝子欠損マウスにおける膵内分泌腫瘍の解析
3. 学会等名 第30回日本がん予防学会総会
4. 発表年 2023年

〔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
研究分担者	筆宝 義隆  (Hippo Yoshitaka)  (30359632)	千葉県がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・研究所長    (82504)	

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
---------	---------