

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790358

研究課題名(和文)新規膵癌(膵管内管状乳頭腫瘍)のマウスモデルの作製

研究課題名(英文)An establishment of novel mouse-model of intraductal tubulopapillary neoplasm of the pancreas

研究代表者

山口 浩(Yamaguchi, Hiroshi)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：20510697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：膵管内管状乳頭腫瘍(以下ITPN)は我々の発表した新しい膵癌の概念で、その発生・進展に関わる遺伝子異常は既知の膵癌とは異なることが想定される。これまでの我々の研究では、PIK3CAという遺伝子の変異が腫瘍の発生・進展に関わる可能性が示されている。今回の研究では膵臓特異的にPIK3CAの変異を来したマウスモデルを作製した。このモデルにITPN類似の腫瘍が発生すれば、本腫瘍の診断・治療に非常に関して極めて重要な情報が得られる。現在経時的にマウスを解剖し、その膵における腫瘍発生を検証中の段階である。

研究成果の概要(英文)： Intraductal tubulopapillary neoplasm (ITPN) is a new entity of pancreatic cancer. Although molecular abnormalities implicated in the oncogenesis of ITPNs are still unclear, PIK3CA mutation may play an important role in oncogenesis of ITPNs based on our previous research.

In the present study, we established a novel mouse-model using Cre-LoxP system, in which PIK3CA-mutations were specifically induced in the pancreas. At present, pancreata of mice at 12 to 28 weeks were microscopically investigated in detail. Any pancreatic neoplasms including ITPN-like tumor have not been observed in their pancreata but three cases showed acinar to ductal metaplasia. ITPNs in human are similar to pancreatic ductules in morphological and immunohistochemical levels. Because pancreatic ductule is one of the main components of acinar to ductal metaplasia, it is very interesting that acinar to ductal metaplasia was observed in some cases of our model. Our study is still ongoing.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：膵管内管状乳頭腫瘍 膵癌 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

膵癌の前駆病変としては、現行疾患概念下では pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN), mucinous cystic neoplasm (MCN), intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN),そして intraductal tubulopapillary neoplasm (ITPN)の4者が挙げられる。このうちITPNは、我々が2009年に発表した膵管内腫瘍の新しい疾患概念であり<sup>1</sup>,2010年に改訂された新WHO分類<sup>2</sup>では独立したentityとして取り上げられている。

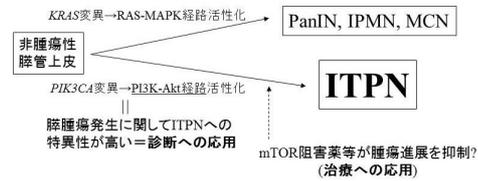
ITPNは、肉眼所見、病理組織学的所見、免疫組織化学的所見及び分子生物学的所見において、従来の膵腫瘍とは明瞭に異なる特徴を有する腫瘍である<sup>1,3,4</sup>が、本腫瘍の発生に直接的に関わり得る遺伝子異常は未だ不明瞭である。

PIK3CAは、PI3Kのcatalytic subunitであるp110 $\alpha$ をコードする遺伝子であり、乳癌や膠芽腫等、様々な悪性腫瘍においてその体細胞変異が報告されている。本遺伝子異常により、PI3K-AKT経路の恒常的活性化が引き起こされ、腫瘍の発生・進展に寄与するものと考えられている。近年、マウスモデルを用いた実験で、臓器特異的なPIK3CAの体細胞変異により、肺<sup>5</sup>及び乳腺<sup>6</sup>に腫瘍が発生したことが報告されている。

浸潤性膵管癌は極めて高率にKRASの体細胞変異を示す腫瘍として知られている。一方で、PIK3CA変異は膵腫瘍においては非常に稀である。我々はITPNにおいて、(i)膵管上皮由来の腫瘍であるにも関わらずKRASの変異が全くみられない、(ii)一部のITPNはPIK3CAの体細胞変異を示す、(iii)PIK3CAが野生型である症例を含めてほとんどのITPNでPI3K-AKT経路が活性化している、という、膵腫瘍としては特筆すべき分子生物学的所見を明らかにした<sup>4</sup>。これらの結果からは、PI3K-AKT経路の活性化がITPNの腫瘍進展に関わっていることが示唆される。前述のように、他臓器ではPIK3CA変異は単独でマウスに腫瘍を形成している。また、AKTのamplification<sup>7</sup>、あるいはPTENのknockout<sup>8</sup>によりPI3K-AKT経路の恒常的活性化を膵特異的に惹起させたマウスモデルで膵管内腫瘍が発生することも報告されている。以上の事実から我々は、マウスにおいて膵特異的にPIK3CAの体細胞変異を導入しPI3K-AKT経路の活性化を惹起すると、ITPNに類似した膵管内腫瘍が形成されるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

PIK3CAの体細胞変異により、マウスの膵にITPNが発生するか否かを検討し、診断や治療への応用性を明らかにする。



3. 研究の方法

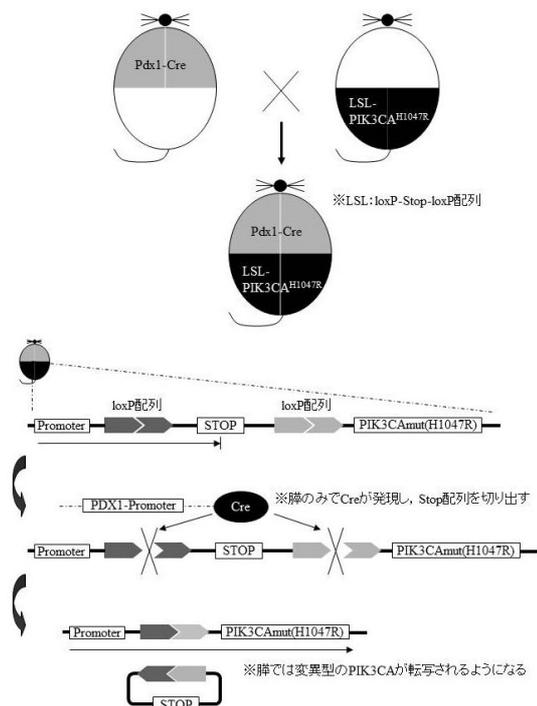
・膵特異的にPIK3CAの体細胞変異を導入したモデルマウスの作製

Creは部位特異的組換え酵素であり、DNA分子の特定の配列(loxP)同士の間で組換えを起こすたん白質である。このCre-loxPシステムを用いて上記のモデルマウスを作製する。

PDX1は膵臓の発生分化の過程で胎生期から発現する膵臓上皮のマーカー遺伝子であり、その発現により細胞が膵臓に分化する方向に定められる。PDX1のプロモーター下にCre組換え酵素を発現させると、膵特異的にCreを発現させることが出来る(PDX1-Creマウス)。

また最近、内因性のPIK3CA遺伝子のプロモーター領域にloxP-Stop-loxPという配列が挿入され、その下流に変異型PIK3CA(E545K, H1047R)の配列が連なった遺伝子改変マウス(LSL-PIK3CA<sup>mutant</sup>マウス)が作製されている<sup>6</sup>。

この2種類の親マウスを交配させることにより、膵特異的にCre酵素でStop配列が切り出され、変異型のPIK3CAが転写・翻訳される遺伝子改変マウスが作製される。このモデルにITPN類似の膵腫瘍が発生するかどうかの検証を行う。

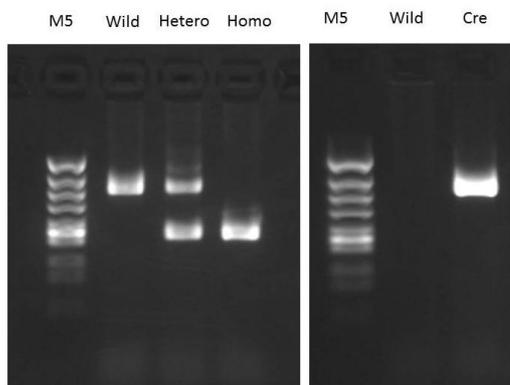


#### 4. 研究成果

PDX1-cre マウスについては、アメリカの Mutant Mouse Regional Resource Center より凍結精子の形で購入・空輸し、理化学研究所バイオリソースセンターにおいて個体化、微生物検査を行った後、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター動物実験施設に搬入した。

LSL-PIK3CA<sup>mutant</sup> マウスに関しては、カナダのトロント大学の協同研究施設に依頼し、2 系統のマウス(LSL-PIK3CA<sup>E545K</sup>, LSL-PIK3CA<sup>H1047R</sup>)を直接空輸した。上記と同様に理化学研究所においてクリーニング・微生物検査を行い、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター動物実験施設に搬入した。

それぞれのマウスにおいて継代を行い、遺伝子異常をホモで有するマウス、ヘテロで有するマウスを作製し、genotyping で目的となる遺伝子が導入されていることを確認した。



PIK3CA 変異マウスのgenotyping PDX1-Creマウスのgenotyping

PDX1-cre マウスのヘテロ接合体、LSL-PIK3CA<sup>mutant</sup> マウスのホモ接合体を交配することにより、膵特異的に Cre が発現し変異型 PIK3CA が翻訳されるマウスと、Cre が発現せず変異型 PIK3CA が翻訳されないマウスが作製された(前者が研究対象のマウスであり、後者がコントロールとなる)。

#### <現在の実験進展状況及び考察>

マウスや凍結精子の空輸、その後の個体化やクリーニング、微生物検査、さらには homo 接合体、hetero 接合体マウスの樹立に非常に日数がかかり、目的とするマウスの第一世代を作製するまでに予想以上の期日が必要であった。2013 年 7 月に、PDX1-cre マウスのヘテロ接合体、LSL-PIK3CA<sup>mutant</sup> マウスのホモ接合体の最初の交配が可能となった。その後、週齢 12 週より、対照群、コントロール群それぞれ 4 匹ずつ sacrifice し、膵腫瘍発生の検証を行っている。現在週例 28 週までの検討が行われたが、現時点では腫瘍発生例はない。3 例の変異型マウスにおいて、Acinar-Ductal metaplasia (ADM)が観察された。

ADM は多くの膵癌マウスモデルで見られる病変であり、少なくともその一部は前癌病変である可能性が指摘されている。また、ITPN は形態学的、免疫組織化学的に腺房中心細胞・介在導管といった腺房と膵管の境界域にある組織への類似性がうかがわれる腫瘍であり、その発生過程に ADM が関わっている可能性も十分に考えられ、興味深い所見である。今後、4 週ごとにマウスの sacrifice を行い、少なくとも 1 年(52 週)の期間、定期的に観察し腫瘍発生の有無を検証していく予定である。

#### 参考文献

1. Yamaguchi H, Shimizu M, Ban S et al. Intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas distinct from pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms, Am J Surg Pathol 2009, 33:1164-1172
2. Adsay NV, Fukushima N, Furukawa T et al. Intraductal neoplasms of the pancreas. Edited by Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2010, p. pp. 304-313
3. Yamaguchi H, Kuboki Y, Hatori T et al. The discrete nature and distinguishing molecular features of pancreatic intraductal tubulopapillary neoplasms and intraductal papillary mucinous neoplasms of the gastric type, pyloric gland variant, J Pathol 2013, 231(3):335-41
4. Yamaguchi H, Kuboki Y, Hatori T et al. Somatic mutations in PIK3CA and activation of AKT in intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas, Am J Surg Pathol 2011, 35:1812-1817
5. Engelman JA, Chen L, Tan X et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers, Nat Med 2008, 14:1351-1356
6. Adams JR, Xu K, Liu JC et al. Cooperation between Pik3ca and p53 mutations in mouse mammary tumor formation, Cancer Res 2011, 71:2706-2717
7. Elghazi L, Weiss AJ, Barker DJ et al. Regulation of pancreas plasticity and malignant transformation by Akt signaling, Gastroenterology 2009, 136:1091-1103
8. Stanger BZ, Stiles B, Lauwers GY et al. Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas, Cancer Cell 2005, 8:185-195

#### 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 2件)

1. Yamaguchi H, Kuboki Y, Hatori T, et al. The discrete nature and distinguishing molecular features of pancreatic intraductal tubulopapillary neoplasms and intraductal papillary mucinous neoplasms of the gastric type, pyloric gland variant. 2013. J Pathol(231:335-41), doi: 10.1097/PAS.0b013e318283ce4c.
2. Yamaguchi H, Aishima S, Oda Y, et al. Distinctive histopathologic findings of pancreatic hamartomas suggesting their "hamartomatous" nature: a study of 9 cases. 2013. Am J Surg Pathol(37:1006-13), doi: 10.1002/path.4242.

〔学会発表〕(計 6件)

1. 山口浩, 久保木友子, 清水京子, 他. 膵管内管状乳頭腫瘍と膵管内管状腺腫の分子病理学的相違. 2013年7月25-26日, 日本膵臓学会, 仙台国際センター
2. 山口浩, 久保木友子, 柴田亮行, 他. 膵 intraductal tubulopapillary neoplasm と intraductal tubular adenoma の分子病理学的相違. 2013年6月6-8日. 日本病理学会総会, ロイトン札幌
3. Hiroshi Yamaguchi, Michio Shimizu, Yuko Kuboki, et al. Molecular Comparison between Intraductal Tubulopapillary Neoplasms and Intraductal Tubular Adenomas of the Pancreas Indicates Their Distinctive Nature. Mar.2nd-8th, 2013. United States & Canadian Academy of Pathology's 102nd Annual Meeting, Baltimore, MD, USA.
4. Hiroshi Yamaguchi, Takuma Tajiri, Toru Furukawa, et al. Pancreatic Hamartomas: Interesting Histopathological Findings Indicating Their "Hamartomatous" Nature. Mar.16th, 2013. Showa Pathology Seminar for Pancreatic and Hepatobiliary Disease, Tokyo.
5. 山口浩, 相島慎一, 小田義直, 他. 膵過誤腫の病理組織学的特徴. 2012年6月28-29日, 日本膵臓学会, ホテルメトロポリタン山形.
6. 山口浩, 清水道生. 膵腫瘍を見直す 2010年WHO新分類を踏まえて Intraductal neoplasms. 2012年4月26-28日, 日本病理学会総会, 京王プラザホテル, 東京.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕  
特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口浩 (YAMAGUCHI, Hiroshi)  
埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20510697

(2)研究分担者

該当者なし

(3)連携研究者

該当者なし