

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860534

研究課題名(和文)膵発癌における細胞死機構の解明

研究課題名(英文)The impact of Bcl-xL upregulation in the development of Kras-mutated pancreatic neoplasia

研究代表者

重川 稔(Shigekawa, Minoru)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教(常勤)

研究者番号：00625436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵発癌マウスを用いた検討から、膵前がん病変PanINsおよび癌部におけるBcl-xLの発現上昇が確認された。また膵癌細胞株を用いた検討から、KRAS遺伝子変異がRaf/MEK/ERK経路を介して膵癌細胞のBcl-xL発現を上昇させることが明らかとなった。Bcl-xLを過剰発現させた膵発癌マウスを用いた検討から、Bcl-xL発現上昇することでKRAS遺伝子変異によるPanINsの形成が促進し腫瘍進展が増強することが示された。KRAS遺伝子変異はPanINs早期より認められるため、PanINsに対するBcl-xL抑制が膵発癌抑制治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：KrasLSL-G12D/+ Pdx1Cre (P-KrasG12D) mice showed PanINs in 2 months and developed PDAC in a year. Immunohistochemistry revealed that Bcl-xL was overexpressed in not only PDAC but also PanINs. Kras knockdown downregulated Bcl-xL expression in Kras-mutated cells (PANC1 and MIA PaCa2) but not in wild-type cells (BxPC3). MEK inhibitors decreased expression levels of Bcl-xL as well as phosphorylated ERK in Kras-mutated cells. Kras mutation induces overexpression of Bcl-xL through MEK-ERK pathway. While P-KrasG12D mice developed PanINs, mainly low-grade, with no PDAC at 4 months, all littermate Bcl-xL Tg/ P-KrasG12D mice developed PDAC at 4 months. The median survival of Bcl-xL Tg/P-KrasG12D mice was 7.6 months, while all P-KrasG12D mice lived in more than one year. Bcl-xL overexpression in Kras-mutated cells accelerated carcinogenesis of PDAC, leading to poor prognosis. Targeted therapy on Bcl-xL may be effective not only as an anti-cancer therapy but also as a preventive therapy for PDAC.

研究分野：消化器病学

キーワード：膵癌 細胞死 PanINs Bcl-xL

1. 研究開始当初の背景

我が国における膵癌の年間死亡者数は約3万人であり、肺癌、胃癌、大腸癌、肝癌について5番目の死因となっている。手術症例を含めた5年生存率は10%程度であり、最も予後不良な難治癌の一つである。膵癌手術症例の膵切除検体を用いた検討では、正常膵と比し浸潤性膵管癌では Bcl-xL や Mcl-1 などのアポトーシス抑制蛋白の発現が上昇しており (Miyamoto Y, et al. *Oncology*. 1999)、Bcl-xL の発現が高い症例は予後不良であることが報告されている (Friess H, et al. *Ann Surg*. 1998)。また、膵癌は悪性度が高く化学療法や放射線治療に対して抵抗性を示すが、これにはアポトーシス関連 Bcl-2 ファミリー蛋白の関与が報告されている。近年、膵癌の前駆病変として pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs) という分類が提唱され、異型度に応じて PanIN-1~3 へと段階的に進行し浸潤癌へ進展すると考えられている。アポトーシス経路の抑制による異常な細胞増殖は発癌や癌の進展に寄与すると考えられるが、PanINs においても異型度が低い段階からアポトーシスが抑制されていることがヒト膵癌の切除検体を用いた検討にて示されている (Lüttges J, et al. *Pancreas*. 2003)。また、我々が行った膵発癌モデル (膵特異的に変異 K-Ras^{G12D} 遺伝子を導入した遺伝子改変マウス) を用いた検討においても、PanINs には TUNEL 陽性細胞や活性型カスパーゼ-3 陽性細胞は認められなかった。さらに PanINs では免疫組織化学にて、アポトーシス抑制タンパク質である Bcl-xL の発現上昇も認められた。これらのことから、アポトーシス経路の抑制は進行膵癌における治療抵抗性のみならず発癌初期の段階においても重要な役割を担っている可能性が示唆される。膵発癌・進展における Bcl-xL の発現亢進の分子機構などの細胞死機構を明らかにすることで膵癌早期診断に有用な分子マーカーの発見や進行膵癌に対する新規治療開発の糸口が得られることが期待される。

2. 研究の目的

膵発癌・進展における様々な分子機構を解明することは、早期診断に有用な分子マーカーの発見や新規抗癌治療法の開発のために非常に重要な研究課題である。そこで本研究課題では、膵発癌モデルマウスと種々の細胞死関連蛋白質を欠損あるいは過剰発現させた遺伝子改変マウスを用いて、膵発癌・進展におけるアポトーシス経路の細胞死機構を解明し、新たな治療戦略を構築することを目的として研究を行う。

3. 研究の方法

[1] 膵発癌動物モデルを用いた膵前癌病変 (PanINs) および癌部における Bcl-xL 発現の解析

実験には前癌病変 PanINs を経て膵癌を発生する膵発癌マウス (膵特異的に変異型 Kras^{G12D} 遺伝子を発現する遺伝子改変マウス: Kras^{LSL-G12D/+}-Pdx1Cre: KrasD12D マウス) を用いた。同マウスの膵臓では、PanINs が形成されるが、経時的に正常膵に対する PanINs の領域および異型度が増し、最終的に腺癌が形成されることが報告されている (Hingorani SR, et al. *Cancer Cell*. 2003)。これらのマウスから得られる膵組織を用いて、免疫染色法およびウェスタンブロット法にて Bcl-xL の発現量について検討した。コントロールマウスには同腹の Pdx1-Cre マウスを用いた。

[2] 膵癌細胞株を用いた Bcl-xL 発現機構の解析

膵癌細胞株は、KRAS 遺伝子変異のある PANC-1、MIA Paca-2、KRAS 遺伝子変異のない BxPC3 を使用した。細胞株における RAS の活性化については、pull-down assay を用いて検討した。まず、SiRNA を用いて KRAS 遺伝子をノックダウンした際の Bcl-xL 発現変化についてウェスタンブロット法および real-time RT-PCR 法を用いて検討した。また、RAS 経路の下流である Raf/MEK/ERK 経路の抑制が Bcl-xL 発現に影響するかを検討するために、膵癌細胞株に MEK 阻害薬および ERK 阻害薬を投与し、ウェスタンブロット法を用いて Bcl-xL の発現について検討した。

[3] 膵癌進展における Bcl-xL 発現亢進の意義の検討

Bcl-xL 発現亢進が膵発癌に与える影響を検討するために、膵発癌マウス (Kras^{G12D} マウス: Kras^{LSL-G12D/+}-Pdx1Cre) と Bcl-xL トランスジェニックマウス (Bcl-xLTg マウス) を交配させ、Kras 変異-Bcl-xLTg マウス (Kras^{LSL-G12D/+}-Pdx1Cre Bcl-xLTg) を作成した。比較検討を行うコントロールマウスとして、Kras^{G12D} マウスを用いた。まず、Bcl-xLTg マウスの表現型について野生型マウスとの比較検討を行った。次に、Kras 変異-Bcl-xLTg マウスと Kras^{G12D} マウスの膵の肉眼像、組織像 (PanINs の割合、癌の割合) について経時的に比較検討した。最後に、長期飼育に伴う予後について比較検討を行った。

4. 研究成果

[1] 膵発癌動物モデルを用いた膵前癌病変 (PanINs) および癌部における Bcl-xL 発現の解析

Kras^{G12D} マウスでは、月齢2か月から前癌病変である PanINs が認められ、その割合は4

か月で 20%程度、7 か月で 50%程度と経時的に PanINs 領域の進展が認められた。また、PanINs の異型度も月齢を追うごとに強くなり、月齢 1 年以上の KrasG12D マウスでは肉眼的にも膵腫瘍を形成し、組織学的腺癌も認められた。KrasG12D マウスの膵臓において、経時的にアポトーシス関連蛋白である Bcl-xL の発現上昇を認めた。また、KrasG12D マウスの膵組織を用いて Bcl-xL 免疫染色を行ったところ、PanINs および癌部において周囲の正常膵上皮細胞と比し Bcl-xL 蛋白の発現上昇を認めたことから、膵腫瘍進展に、Bcl-xL 発現上昇が関与している可能性が示唆された。

[2] 膵癌細胞株を用いた Bcl-xL 発現上昇機構の解析

KRAS 遺伝子変異を有する PANC-1、MIA Paca-2 において KRAS 遺伝子のノックダウンに伴い、Bcl-xL mRNA 発現の低下および Bcl-xL 蛋白発現の低下が認められた。一方、KRAS 遺伝子変異を有さない BxPC3 では KRAS 遺伝子をノックダウンしても mRNA・蛋白レベルともに Bcl-xL 発現変化は認められなかった。以上のことから、膵癌細胞における KRAS 遺伝子変異が Bcl-xL 発現に関与していることが示唆された。次に RAS 経路の下流シグナルである ERK のリン酸化について検討したところ、PANC-1 では KRAS 遺伝子ノックダウンに伴い ERK のリン酸化が低下していた。一方、BxPC3 では KRAS 遺伝子をノックダウンしても ERK のリン酸化に変化を認めなかった。また、PANC-1 では MEK 阻害薬の投与に伴い、ERK のリン酸化および Bcl-xL の発現低下を認め、ERK 阻害薬の投与に伴い Bcl-xL の発現低下を認めた。これらの結果から、KRAS 遺伝子変異を伴う膵癌細胞において、MEK/ERK 経路が Bcl-xL の発現に関与していることが示唆された。

[3] 膵癌進展における Bcl-xL 発現亢進の意義の検討

Bcl-xLTg マウスの膵において Bcl-xL 蛋白の過剰発現が認められたが、膵の肉眼像、膵の組織像は同腹の野生型マウスと比較して明らかな差を認めなかった。Kras 変異-Bcl-xLTg マウス (Kras^{LSL-G12D/+}-Pdx1Cre Bcl-xLTg) では、KrasG12D マウスと比較し、月齢早期からより広範囲の PanINs が形成された。また、KrasG12D マウスでは月齢 4 か月において組織学的腺癌は認められなかったが、Kras 変異-Bcl-xLTg マウスでは月齢 2 か月から組織学的腺癌が確認され、4 か月では 100%に組織学的腺癌の形成を認めた。これらの結果から、膵発癌マウスにおいて Bcl-xL の発現亢進により腫瘍進展が促されること

が示された。さらに、1 年以上生存し得た Kras 変異-Bcl-xLTg マウスは 1 匹も認められず、KrasG12D マウスと比し有意に予後不良であった。

以上より、膵癌において KRAS 遺伝子変異は Raf/MEK/ERK 経路を介して Bcl-xL 発現を上昇させ、Bcl-xL の発現上昇は Kras 変異による膵発癌を促進した。これまでの報告から KRAS 遺伝子変異は PanINs 早期より認められることが明らかとなっており、PanINs に対する Bcl-xL 抑制が膵発癌抑制治療につながる可能性が示唆された。

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]

なし

[学会発表] (計 7 件)

[1] 池澤 賢治、重川 稔、岩橋 潔、川口 司、清水 聡、名和 誉敏、疋田 隼人、阪森 亮太郎、宮城 琢也、巽 智秀、竹原 徹郎 . (2014) 膵癌の発生・進展における Bcl-xL の意義 . 第 100 回日本消化器病学会総会 . 東京 , 4 月 23-26 日

[2] Kenji Ikezawa, Minoru Shigekawa, Hayato Hikita, Kiyoshi Iwahashi, Satoshi Shimizu, Takatoshi Nawa, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara . (2014) The significance of Bcl-xL in the development of KrasG12D-driven pancreatic neoplasia. Digestive Disease Week 2014. Chicago, USA, May 4 - 8 (Oral Basic Science Plenary)

[3] 池澤 賢治 重川 稔 疋田 隼人 吉岡 鉄平 岩橋 潔 巽 智秀 竹原 徹郎 . (2014) 膵癌の発生・進展における Bcl-xL 発現亢進機構およびその意義の解明 . 第 45 回日本膵臓学会総会 . 小倉 , 7 月 11-12 日

[4] Kenji Ikezawa, Minoru Shigekawa, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara . (2014) The impact of Bcl-xL in the development of KrasG12D-driven pancreatic neoplasia. 第 73 回日本癌学会総会 . 横浜 , 9 月 25-27 日

[5] 池澤賢治 重川稔 竹原徹郎 . (2014) 膵癌の発生・進展における Bcl-xL 発現亢進機構およびその意義の解明 . 第 56 回日本消化器病学会大会 (JDDW2014) . 神戸 , 10 月 23 日-26 日

[6] Kenji Ikezawa, Minoru Shigekawa, Hayato Hikita, Kiyoshi Iwahashi, Takatoshi

Nawa, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2015) The significance of Bcl-xL in the development of Kras mutation-driven pancreatic neoplasia. 3rd JSGE International Topic Conference, Sendai, Japan, Apr 24 - 25. (Oral presentation)
[7] Kenji Ikezawa, Minoru Shigekawa, Hayato Hikita, Kiyoshi Iwahashi, Takatoshi Nawa, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2015) The impact of Bcl-xL upregulation in Kras-mutated pancreatic neoplasia. Digestive Disease Week 2015. Washington D.C., USA, May 16 - 19 (Oral presentation)

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

該当なし

取得状況（計0件）

該当なし

〔その他〕

ホームページ等：

http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/research_a.html

6．研究組織

(1)研究代表者

重川 稔 (Minoru Shigekawa)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00625436

(2)研究協力者

池澤 賢治 (Kenji Ikezawa)