

平成22年5月19日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 ～ 2009  
 課題番号：19590401  
 研究課題名（和文） Ras トランスジェニックラットを用いた発がん起始細胞の同定  
 研究課題名（英文） Identification of cytogenesis of pancreatic cancer  
 in Ras transgenic rats  
 研究代表者  
 深町 勝巳（FUKAMACHI KATSUMI）  
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：90381798

研究成果の概要（和文）：難治がんである膵がんの克服には早期診断・早期治療が重要である。膵がんの起始細胞とがんの進展過程を把握することにより、新たな膵がん診断と治療の開発が期待される。我々はヒト膵がんのモデル動物として活性型 Ras コンディショナルトランスジェニックラットを確立し、腺房細胞からは腫瘍性病変は発生せず、膵がんの起始細胞として膵管、介在管、腺房中心細胞があげられることを示した。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) is one of the most debilitating malignancies in humans. A thorough understanding of the cytogenesis of this disease will aid in establishing successful treatments. We have developed an animal model which uses adult ras<sup>G12V</sup> transgenic rats in which oncogene expression is regulated by the Cre/loxP system. We showed that the origin of PDA is duct, intercalated duct, and centroacinar cells, but not acinar cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

膵がんは早期発見が最も難しいがんのひとつであり、診断されたときにはすでに切除できない場合が多く、種々の化学療法に対しても抵抗性で予後不良な難治がんである。新しい診断法と治療の開発が遅れている理由には、膵発がんに関する初期病変とがんの進

展、さらに膵がんの生物学的特性についての知見が乏しいことによる。そのためには膵がんの特にヒト膵がんのモデルとなり得る動物モデルの開発が必要である。

これまでにマウスの遺伝子改変動物を用いた膵がんモデル動物が作製されており、腺房特異的に活性型 Kras を発現するマウスで

は、腺管由来ではなく、腺房細胞からの脱分化により膵管がん様の腫瘍が発生することが報告されている (Grippio PJ, Cancer Res, 2003, Quaipe CJ, Cell, 1987)。また、PTEN 欠損マウスにおいては、腺房ではなく、PTEN が欠損した腺房中心細胞が、腺房に置きかわって腺管様の構造をつくることが観察されている (Stanger BZ, Cancer Cell, 2005)。しかし、これらのモデルでは「一見膵管がん」様腺がんではあるが、ヒトにみられる膵がんとの類似性には疑問がある。化学発がん物質によるハムスター膵管がんモデルはヒトに類似しているが、ハムスターは SPF 動物ではなく、利便性において問題がある。

我々は、既に確立した Cre/loxP システムを用いたヒト活性型 Hras トランスジェニックラット (Hras250) において、がんを発生させる方法を開発してきた。これまでに、活性型 Hras コンディショナルトランスジェニックラットを用いて、膵において Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (CAG プロモーター) を総胆管から膵管内に注入した後、アデノウイルスが感染した細胞を同定し、発生した初期病変を経時的に観察することにより、膵管 (pancreatic duct)、介在管 (intercalated duct) および腺房中心細胞 (centroacinar cells) および腺房 (acinar cells) に Cre リコンビナーゼの局在がみられたが、腺房からは病変がみられず、膵管、介在管および腺房中心細胞から膵管がんが発生する可能性を示してきた (Ueda S, Carcinogenesis, 2006)。しかし、CAG プロモーター制御下にある Cre リコンビナーゼには標的性がないため、この方法では膵がんの起始細胞を直接的に証明するまでには至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラットにおいてヒトに類似した膵管がんを確実に発生させる方法を開発し、がんの起始細胞を同定し、前癌病変・早期癌の生物学的特性を把握し、それらがいかにして進展して宿主を死に至らせるかを解析し、膵がんの早期診断と治療法の開発に役立てることを目的とした。

本研究においては、我々のヒト活性型 Hras トランスジェニックラット膵管がんモデルをさらに発展させ、膵構成細胞のそれぞれの細胞特異的に Ras を発現させ腫瘍が発生するか病理学的解析により検討し、がんの起始細胞の同定を試みた。また、よりヒトに近いモデルにするためヒト膵管で変異がみられる Kras のトランスジェニックラットを作製した。

## 3. 研究の方法

ヒト活性型 Kras コンディショナルトランス

## ジェニックラットの樹立

ヒト活性型 Hras トランスジェニックラット (Ueda S, Carcinogenesis, 2006) と同様に Cre/loxP 系によりヒト活性型 Kras の発現を制御可能な導入遺伝子を作製した。活性型 Kras<sup>G12V</sup> の発現を容易に検出可能なように導入 Kras 遺伝子には HA タグ配列を付加した (HA-Kras<sup>G12V</sup>)。HA-Kras<sup>G12V</sup> を pCALNL5 ベクター (理研 DNA Bank) に挿入し、発現カセットを切り出し精製した。作製した導入遺伝子を SD ラット受精卵にマイクロインジェクション法により注入した。注入した受精卵を偽妊娠ラットに移植した。離乳後、尻尾より DNA を抽出し、PCR 法により導入遺伝子の有無を確認した。2 系統 (Kras301, Kras327) を確立した。

## ラット膵癌の発生

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを HEK293 細胞に感染させて、アデノウイルスを増幅し精製した。精製したアデノウイルスを、Hras250 または Kras301/Kras327 トランスジェニックラットの総胆管から膵管内に注入 ( $4 \times 10^9$  ifu/ml, 150  $\mu$ l) することによって膵管がんの発生を試みた。

## 病理解析

採取した組織は、ホルマリンまたはパラホルムアルデヒドで固定しパラフィン包埋した。薄切した組織切片は HE 染色または免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

Hras トランスジェニックラットを用いた膵癌モデルをこれまでに確立したが、さらによりヒトに近いモデルとするため、ヒト膵管で高頻度に変異がみられる Kras トランスジェニックラットを樹立した。ヒト Kras 遺伝子を導入したラット前核期受精卵に作製した発現カセットを注入した。翌日 2 細胞期に発生した 265 個の胚を偽妊娠雌ラットの卵管に移植した。37 匹のファウンダーラットを得た。遺伝子型判定の結果、雄 4 匹・雌 1 匹より導入遺伝子が検出された。このうち、導入遺伝子の発現が確認され、かつ次世代に導入遺伝子を伝搬することが確認された Kras301 と Kras327 の 2 系統を樹立した (図 1)。

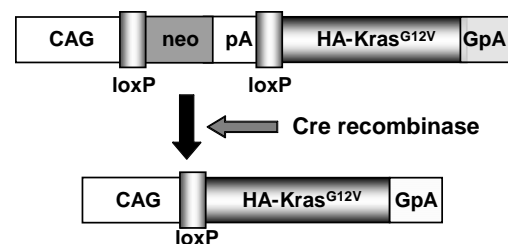


図 1 Kras301/327 の導入遺伝子

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (CAG-Cre) を生後の成熟した Hras250 または Kras301/327 の膵管に注入することにより、種々の段階の膵管がんが、2-4 週間程度の短期間に発生した。病理組織学的に Hras250 と Kras301 および 327 ラットにおいて差違はみられず、同様の膵管がんが発生していた。このモデルにおける膵管がんは、病理学的解析により膵管、介在管および腺房中心細胞に由来し、腺房細胞からは腫瘍性病変は発生しないことが示唆された。このモデルにおいて病理学的には腺房由来の病変は発生しないことが示唆されたが、直接的に腺房から病変は発生しないことを証明するため、腺房特異的に Cre recombinase を発現させることにより、腺房細胞から腫瘍性病変が発生するか否か追究した。

膵臓の腺房細胞に特異的に Cre recombinase を発現させるため、腺房細胞に発現する Amylase または Elastase のプロモーターで発現制御される Cre recombinase 発現アデノウイルスベクター (Amy-Cre または Ela-Cre) を用いた (図 2)。

Amy-Cre	Amylase promoter	Cre	pA
Ela-Cre	Elastase promoter	Cre	pA
CAG-Cre	CAG promoter	Cre	pA

図 2 腺房細胞特異的 Cre recombinase 発現アデノウイルスベクター (Amy-Cre、Ela-Cre) および非特異的 CAG-Cre の構造

まず、Amy-Cre または Ela-Cre が腺房細胞特異的に活性型 Ras の発現を誘導するか検討した。発現誘導された活性型 Kras 発現細胞を HA 抗体により同定することが可能な Kras301/327 ラットに CAG-Cre と同様に Amy-Cre を膵管へ注入し、注入 2 日後における HA-Kras<sup>G12V</sup> の発現を蛍光免疫染色により同定した。その結果、活性型 Kras<sup>G12V</sup> は腺房のみに検出され、膵管・腺房中心細胞およびランゲルハンス島にはみられなかった (図 3)。また、Ela-Cre によっても同様に腺房細胞においてのみ活性型 Kras<sup>G12V</sup> は発現していた。この時、活性型 Kras<sup>G12V</sup> を発現する腺房細胞は増殖細胞のマーカーである Ki67 に陰性であった。

次に、Amy-Cre または Ela-Cre を Hras250 または Kras301/327 ラットの膵管へ注入し、8 週間経過後において病変の発生の有無を検討した。その結果、いずれのラットにおいても膵病変はみられなかった (図 4)。さらに、6 ヶ月経過後においても膵病変は発生しなかつ

た。また、いずれの細胞にも発現可能な CAG-Cre を Hras250 または Kras301/327 ラットの膵管へ注入すると、2-4 週間でほぼ全ての個体で膵管がんが発生した。

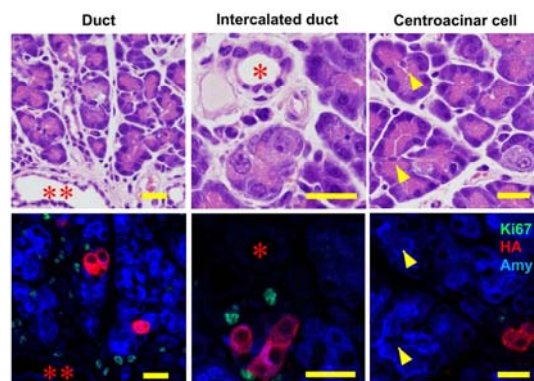


図 3 Kras327 ラットへの腺房細胞特異的 Cre 発現アデノウイルスベクター (Amy-Cre) 投与後の HA-Kras の腺房細胞特異的発現。\*, 介在管; \*\*, 膵管; 矢頭、腺房中心細胞。Bar=50μM

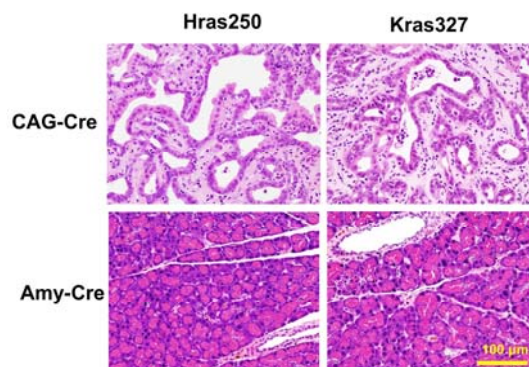


図 4 Hras250 および Kras327 ラットにおける CAG-Cre と Amy-Cre 投与後の組織像

我々の確立した膵がんモデルである Hras250 において病理学的に腺房からは腫瘍性病変は発生しないことが示唆されていた。しかしながら、マウス膵癌モデルを用いた研究では腺房細胞からも膵管がんが発生する説をとる報告が多くある (Wagner, Gastroenterology, 1998; Zhu, Am J Pathol, 2007; Habbe, PNAS, 2008)。これらマウスモデルでは、胎児期から膵臓にがん遺伝子等が発現していることが多く、成熟した膵臓の細胞から病変が発生しているのかどうかは不明である。我々のモデルでは成獣の成熟した膵臓組織にがん遺伝子を発現させることが可能であり、ヒトに近い状態で膵がんを発生させることができる。

我々のモデルで、Amylase または Elastase プロモーターに発現制御される Cre recombinase 発現アデノウイルスベクター

(Amy-Cre、Ela-Cre)を用いることにより腺房細胞特異的に活性型 Ras (Hras<sup>G12V</sup>またはKras<sup>G12V</sup>)を発現させることが可能となった。今回、Amy-Cre または Ela-Cre により腺房細胞特異的に活性型 Ras を発現させても腫瘍性病変は発生しなかった。また、活性型 Kras<sup>G12V</sup>を発現する腺房細胞は増殖マーカーKi67 陰性であったことから、腺房細胞は Ras が活性化されても増殖しないことが明らかとなった。したがって腺房細胞からは腫瘍性病変は発生しないということが直接証明された。以上より、我々のモデルにおいて、膵管がんは腺房細胞以外の膵管、介在管または腺房中心細胞より発生することが強く示唆された。ヒト膵がんのほとんどが膵管に由来する膵管がんであることが病理学的に示されており、Hras250 および Kras301/327 ラットは、ヒト膵がんのモデル動物として有用であると考えられる。このヒト膵がんモデルを新しい診断・治療方法の開発に用いることにより、ヒト膵がんの克服への一助となることが期待される。

#### 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 5 件)

- ① Tanaka, H., Fukamachi, K., Futakuchi, M., Alexander, D.B., Long, N., Tamamushi, S., Minami, K., Seino, S., Ohara, H., Joh, T. and Tsuda, H. (2010) Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. *Cancer Sci*, 101, 341-346. 査読有
- ② Fukamachi, K., Tanaka, H., Hagiwara, Y., Ohara, H., Joh, T., Iigo, M., Alexander, D.B., Xu, J., Long, N., Takigahira, M., Yanagihara, K., Hino, O., Saito, I. and Tsuda, H. (2009) An animal model of preclinical diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Biochem Biophys Res Commun*, 390, 636-641. 査読有
- ③ Fukamachi, K., Imada, T., Ohshima, Y., Xu, J. and Tsuda, H. (2008) Purple corn color suppresses Ras protein level and inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Cancer Sci*, 99, 1841-1846. 査読有
- ④ Tsuda, H., Iigo, M., Takasuka, N., Ueda, S., Ohshima, Y., Fukamachi, K., Shirai, T., Hirano, S., Matsuda, E.

and Wakabayashi, K. (2007) Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. *Food Chem Toxicol*, 45, 1013-1019. 査読有

- ⑤ Ohnishi, T., Fukamachi, K., Ohshima, Y., Jiegou, X., Ueda, S., Iigo, M., Takasuka, N., Naito, A., Fujita, K., Matsuoka, Y., Izumi, K. and Tsuda, H. (2007) Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats in a medium-term bioassay model for carcinogens. *Toxicol Pathol*, 35, 436-443. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Hajime Tanaka, Yutaka Ohshima, Katsumi Fukamachi, David Alexander, Mitsuru Futakuchi, Takashi Joh, Hiroyuki Tsuda, Possible identification of cytogenesis of pancreas cancer and lung cancer in the rat, 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 1 日, 横浜
- ② Hajime Tanaka, Katsumi Fukamachi, David Alexander, Mitsuru Futakuchi, Takashi Joh, Hiroyuki Tsuda, Adult pancreatic acinar cells are refractory to transformation by Ras oncogene, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28 日, 名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ヒト変異型 K-ras (K-rasV12) 遺伝子をコンディショナルに発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物及びその用途

発明者: 津田洋幸、深町勝巳、デイビッド・ビー・アレキサンダー

権利者: 名古屋市立大学

種類: 特許

番号: 特願 2007-243313

出願年月日: 2007. 9. 20

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深町 勝巳 (FUKAMACHI KATSUMI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90381798

(2) 研究分担者

津田 洋幸 (TSUDA HIROYUKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・特任  
教授  
研究者番号：30094387  
(H19→H20：連携研究者)

アレキサンダー デイビッド (ALEXANDER  
DAVID)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究  
員  
研究者番号：00335267  
(H19→H20：連携研究者)