

機関番号 : 11301

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790645

研究課題名 (和文) 膵管上皮細胞の上皮間様相互作用における遺伝子変化

研究課題名 (英文) The genetic change of pancreatic duct epithelial cells mediated by epithelial mesenchymal transition

研究代表者

菅野 敦 (KANNO ATSUSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 70509190

研究成果の概要 (和文) :

1. K-ras 変異を導入した膵管正常上皮細胞株 (Human Pancreatic Duct Epithelial Cell:HPDE) と膵星細胞 (Pancreatic stellate cell:PSC) の確立

正常膵管上皮細胞株 (Human Pancreatic Duct Epithelial Cell:HPDE) に codon12 の変異を有する人癌遺伝子である Kras^{G12V} が組み込まれた retroviral vector pBabepuro-KRAS4B^{G12V} を導入した。HPDE に K-ras が導入されたことを確認済みである。同様の方法で人膵星細胞とラット膵星細胞にも Kras^{G12V} を試みている。

2. K-ras 変異を導入した HPDE と PSC の共培養により変化を来す遺伝子群の同定

(1) HPDE に Kras 変異を導入した HPDE-Kras^{G12V} と人膵星細胞を各々共培養し、共培養によって変化する遺伝子群を microarray の手法を用い、その変化を調べている。

(2) 同様にその変化を miRNA についても miRNA microarray の手法を用いて調べる予定である。

研究成果の概要 (英文) :

1. The establish of the Human Pancreatic Duct Epithelial Cell and Pancreatic stellate cell with K-ras mutation

We established that Human Pancreatic Duct Epithelial Cell (HPDE) which retroviral vector pBabepuro-KRAS4B^{G12V} was transfected. We confirmed that the HPDE had K-ras mutation. We are trying that retroviral vector pBabepuro-KRAS4B^{G12V} was transfected to the human pancreatic stellate cell and the rat pancreatic stellate cell in the similar method.

2. The alteration of the gene by the co-culture of Human Pancreatic Duct Epithelial Cell and Pancreatic stellate cell with K-ras mutation and Pancreatic stellate cell.

(1) We are researching that the alteration of the gene by the co-culture of Human Pancreatic Duct Epithelial Cell and Pancreatic stellate cell with K-ras mutation and Pancreatic stellate cell.

(2) We are examining that the alteration of the miRNA by the co-culture of Human Pancreatic Duct Epithelial Cell and Pancreatic stellate cell with K-ras mutation and Pancreatic stellate cell with miRNA microarray.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内化学

キーワード：(1) 膵癌 (2) 慢性膵炎 (3) K-ras (4) miRNA (5) 膵星細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦での膵癌の死亡数は毎年 2 万人を超え、癌による死亡の中で第 5 位を占めている。膵癌の死亡数は、診断や治療技術の進歩にもかかわらず増加を続けているのが現状である。また、1993～96 年の部位別 5 年生存率調査の結果によると、癌患者全部位の 5 年生存率が 49.9%であり、胃癌は 58.3%、大腸癌が 64.6%、肺癌が 19.9%に対し膵癌は 5.5%と非常に致死率が高いことも膵癌の特徴である。一方、Stage I の切除膵癌例の 5 年生存率が 52.5%と良好であることから、早期発見が膵癌患者の生命予後向上のための最良の方策であることがわかる。しかし、Stage I で発見される例が全体のわずか 2%以下であることはいかに膵癌の早期発見が困難であるかを物語っている。全ての患者に対し、膵癌の有無を調べることは不可能に近く、膵癌の危険群を同定し早期に発見することが望まれる。

近年、発癌における炎症の役割が注目を集めている。消化管では H. pylori 感染と胃癌、炎症性大腸炎と大腸癌など、慢性炎症と消化器癌の関連を示す根拠が増えてきている。膵臓に関しても以前から慢性膵炎が膵癌発生の危険群としてあげられている。腫瘍周囲に存在する炎症細胞は、サイトカイン、ケモカイン、成長因子とともに、腫瘍の成長、進展ならびに転移に促進的に作用する。同様なプロセスは慢性膵炎でも起こり、膵癌発生を促すと考えられている。近年、膵星細胞が膵臓の線維化の進展過程で中心的な役割を担うことが明らかになってきた。膵星細胞は膵腺房細胞周囲や血管周囲に存在し、生理的状态では静止細胞として存在するが、炎症などの種々の刺激により活性化される。活性化した膵星細胞は collagen や fibronectin などの細胞外器質を大量に産生、放出し、膵線維化

の進展に中心的な役割を担っている。膵癌は、周囲に desmoplastic reaction と呼ばれる線維化を伴うが、Desmoplastic reaction は膵癌と相互的に作用し、膵癌の進展に寄与するとの報告もある。Desmoplastic reaction にも膵星細胞が関与し、我々は膵癌間質相互作用の一つの因子として膵星細胞から分泌される periostin を同定し、その作用について報告した。慢性膵炎が膵癌の危険因子であることや desmoplastic reaction に伴う膵癌間質相互作用の関連から膵星細胞と膵癌が強く関連することが推測されるが、そのメカニズムはいまだに不明な点が多い。

我々は膵癌の早期診断開発を目的として、膵癌の癌化に関与する遺伝子群について膵腫瘍の手術切除標本、我々が開発した DMBA (9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene) 投与膵発癌マウスモデル²⁾を材料として検索することによって以下の点を明らかにしてきた。膵癌癌化の初期の変化として K-ras 遺伝子の変化³⁾、c-erbB-2 蛋白の過剰発現⁴⁾、後期の変化として p53⁵⁾、CD44v⁶⁾、survivin⁷⁾ の発現、初期から後期にかけての notch signal の活性化²⁾である。つまり、これら遺伝子の段階的あるいは相乗的な発現異常により膵管の癌化が生ずる。それぞれの異常を示す頻度は高く、これら遺伝子異常の組み合わせによる膵癌分子診断の可能性を示してきた。特に K-ras 遺伝子の変化は重要で、膵癌の約 90%に K-ras 遺伝子変異を認めることから膵発癌における重要な最初の変化と考えられているが、K-ras 変異のみでは癌化せず、その後の癌抑制遺伝子の抑制などの二次変化を来すことによって癌化することが明らかになってきた。しかし、K-ras 変異を来した膵上皮細胞が周囲間質からどのような影響を受けて二次変化に至るかは不明であ

る。

我々は、慢性膵炎が膵癌の危険群と考えられていること、慢性膵炎の原因として間質の膵星細胞が主たる原因であること、K-ras 変異を来すことが膵の癌化に重要であることから、その後の過程を詳細に検討することを目的に、以下の実験計画を立案する。

正常膵管細胞 HPDE と膵星細胞にレトロウイルスベクターを用いて K-ras 変異を誘導する。K-ras 変異を来した HPDE と膵星細胞を共培養することによる mRNA や miRNA 発現の変化や腫瘍形成能の獲得などを調べる。以下に実験の概要を示す。

2. 研究の目的

本研究では、K-ras 変異が膵発癌の初期変化に重要でなおかつ、膵癌細胞のみならず癌周囲間質の膵星細胞が膵の発癌および進展に重要である事に着目し、期間内に以下のことを計画する。1) 正常膵管上皮ならびに膵星細胞に K-ras 変異を導入、細胞株を確立し、共培養することで膵管上皮と間質細胞である膵星細胞の相互作用における遺伝子変化や癌化の過程を明らかにする。2) それらの細胞をヌードマウスや Pdx1 プロモーターを用いた K-ras 変異マウスなどを用い、また DMBA マウスの手法を用いて、in vivo における腫瘍形成能を調べる。3) 手術標本や EUS-FNA から得られる検体において、本研究で明らかにした K-ras 変異に続く二次的遺伝子変化を確認し慢性膵炎における膵癌危険群を明らかにする。

3. 研究の方法

平成 21 年度

(1) K-ras 変異を導入した膵管正常上皮細胞株 (Human Pancreatic Duct Epithelial Cell:HPDE) と膵星細胞 (Pancreatic stellate cell:PSC) の確立

正常膵管上皮細胞株 (Human Pancreatic Duct Epithelial Cell:HPDE) に codon12 の変異を有する人癌遺伝子である Kras^{G12V} が組み込まれた retroviral vector pBabepuro-KRAS4B^{G12V} を導入する。また、同様の方法で人膵星細胞とラット膵星細胞にも Kras^{G12V} を導入する。導入の確認は RNA を抽出し、RT-PCR によって確認する。Retrovirus vector は pBabe-puro を用い、プロトコールに従って遺伝子を導入する。

(2) K-ras 変異を導入した HPDE と PSC の共培養により変化を来す遺伝子群の同定

①: HPDE に Kras 変異を導入した HPDE-Kras^{G12V} と人膵星細胞に Kras 変異を導入した H-PSC-Kras^{G12V}、ラット膵星細胞に Kras 変異を導入した R-PSC-Kras^{G12V}、を各々共培養する。共培養によって変化する遺伝子群を microarray の手法を用い、その変化を調べる。

②: 同様にその変化を miRNA についても miRNA microarray の手法を用いて調べる。

③: HPDE-Kras^{G12V} に PSC から分泌される増殖因子や炎症性サイトカインなどで刺激、もしくはその阻害剤などで阻害した場合の mRNA miRNA の変化を microarray で調べる。

④: 上記実験によって同定された mRNA と miRNA を real-time PCR で定量的に解析し、最も変化を来す重要な遺伝子を同定する。

⑤: HPDE-Kras^{G12V} H-PSC-Kras^{G12V}、R-PSC-Kras^{G12V}、を共培養し、増殖能、足場非依存性増殖能、scratch assay や Boyden chamber を用いた移動能など腫瘍細胞としての characterization を行う。

(3) 慢性膵炎および膵癌症例の組織における K-ras 変異の検討

慢性膵炎と膵癌の上皮と間質を Laser capture microdissection の手法を用いて削りだし、RNA を抽出、in vitro の実験にて同定した遺伝子群を real-time PCR の手法を用いて定量的に解析する。

平成 22 年度

(1) K-ras 変異を導入した HPDE と PSC の in vivo における腫瘍形成能の検討

①: HPDE-Kras^{G12V} と H-PSC-Kras^{G12V}、R-PSC-Kras^{G12V} を単独もしくは混合し、ヌードマウスの皮下、および膵臓に移植し、腫瘍増殖能の検討、ならびに膵星細胞が HPDE に及ぼす影響を調べる。

②: in vitro の検討で Kras の変化に引き続いて起こる二次的な遺伝子変化を siRNA の手法を用いて knockdown させる事で腫瘍形成能を抑制、もしくは腫瘍の治療に応用が可能かどうかを検討する。

③: 更に、Pdx1 プロモーターを用い Kras 遺伝子変異を導入した transgenic mouse に、我々が確立した DMBA マウスの手技を用い、DMBA を膵臓に注入することで、Kras の変異が base にある状態でのマウス膵発癌モデルを作成し、in vivo における Kras に引き続いて起こる遺伝子変化の検討、並びに siRNA を用いた

抗腫瘍効果の検討を行う。

(2) 慢性膵炎症例の組織における K-ras 変異およびそれに伴う遺伝子群の同定
慢性膵炎患者組織を手術標本もしくは EUS-FNA にて採取し、K-ras 変異や二次的遺伝子変化を同定、その患者群を長期経過観察することにより膵発癌の危険群を同定する可能性を見いだす。

4. 研究成果

(1) K-ras 変異を導入した膵管正常上皮細胞株 (Human Pancreatic Duct Epithelial Cell:HPDE) と膵星細胞 (Pancreatic stellate cell:PSC) の確立

正常膵管上皮細胞株 (Human Pancreatic Duct Epithelial Cell:HPDE) に codon12 の変異を有する人癌遺伝子である Kras^{G12V} が組み込まれた retroviral vector pBabepuro-KRAS4B^{G12V} を導入した。HPDE に K-ras が導入されたことを確認済みである。同様の方法で人膵星細胞とラット膵星細胞にも Kras^{G12V} を試みている。

(2) K-ras 変異を導入した HPDE と PSC の共培養により変化を来す遺伝子群の同定

① HPDE に Kras 変異を導入した HPDE-Kras^{G12V} と人膵星細胞を各々共培養し、共培養によって変化する遺伝子群を microarray の手法を用い、その変化を調べている。

② 同様にその変化を miRNA についても miRNA microarray の手法を用いて調べる予定である。

③ HPDE-Kras^{G12V} と PSC 共培養し、増殖能、足場非依存性増殖能、scratch assay や Boyden chamber を用いた移動能など腫瘍細胞としての characterizarion を施行中である。

(3) 慢性膵炎および膵癌症例の組織における K-ras 変異の検討

慢性膵炎と膵癌の上皮と間質を Laser capture microdissection の手法を用いて削りだし、RNA を抽出、in vitro の実験にて同定した遺伝子群を real-time PCR の手法を用いて定量的に解析中である。

(4) K-ras 変異を導入した HPDE と PSC の in vivo における腫瘍形成能の検討

HPDE-Kras^{G12V} と H-PSC-Kras^{G12V}、R-PSC-Kras^{G12V} を単独もしくは混合し、ヌードマウスの皮下、および膵臓に移植し、腫瘍増殖能の検討、ならびに膵星細胞が HPDE に及ぼす影響を調べる予定である。

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 7 件)

1. Takanami K, Yamada T, Tsuda M, Takase K, Ishida K, Nakamura Y, Kanno A, Shimosegawa T, Unno M, Takahashi S.

Intraductal papillary mucinous neoplasm of the bile ducts: multimodality assessment with pathologic correlation. Abdom Imaging. 2011 印刷中. 査読有

2. 菅野敦, 佐藤賢一, 下瀬川徹

【IPMNにおける「国際診療ガイドライン」の検証】手術例と経過観察例から導き出した分枝型IPMNの治療方針
胆と膵 30 巻 3 号 Page245-249 2010 査読 無

3. 菅野敦, 佐藤賢一, 廣田衛久, 正宗淳,

片寄友, 海野倫明, 石田和之, 全陽, 下瀬川徹

類円形を呈した胆管内乳頭状腫瘍の一例
胆道 23 巻 4 号 Page677-683 2010 査読 有

4. 菅野 敦 下瀬川徹

目でみるトレーニング

Medicina 第 47 巻 第 6 号 1093-1099
2010 査読 無

5. 菅野 敦 佐藤賢一 廣田衛久 正宗

淳 高館達之 力山敏樹 海野倫明 石田

和之 下瀬川徹術前に診断し得た下部胆管

原発腺内分泌細胞癌の 1 例
胆道 24 巻 5 号 714-721 2010 査読 有

6. Kanno A, Satoh K, Hirota M, Hamada S, Umino J, Itoh H, Masamune A, Egawa S, Motoi F, Unno M, Ishida K, Shimosegawa T.

Granular cell tumor of the pancreas: A case report and review of literature.

World J Gastrointest Oncol. 2010 Feb

15;2(2):121-4. 査読 有

7. Kanno A, Satoh K, Hirota M, Hamada S, Umino J, Itoh H, Masamune A, Asakura T, Shimosegawa T.

Prediction of invasive carcinoma in branch type intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.

J Gastroenterol. 2010 Sep;45(9):952-9.

査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. A Kanno, T Kamisawa, T Shimosegawa, K Okazaki, T Nishino, H Watanabe, F Okumura, T Nishikawa, K Kobayashi, T Ichiya, H Takatori, K Yamakita,

K Kubota, H Hamano, K Okamura, K Hirano, T Ito, S B H Ko, M Omata

IAP and JPS 2010 -Fukuoka- July10/2010
Standard steroid therapy for autoimmune pancreatitis

2. 菅野敦, 佐藤賢一, 下瀬川徹
第96回日本消化器病学会総会 平成22年4月22日-新潟-

シンポジウム10: 膵IPMNの手術適応の見直し
分枝型IPMNの手術適応の再検討

3. 菅野敦, 佐藤賢一, 下瀬川徹
第96回日本消化器病学会総会 平成22年4月23日-新潟- **ワークショップ5**: 自己免疫性膵炎をめぐる新たな展開 IgG4陰性自己免疫性膵炎の診断基準における位づけ

4. 菅野敦, 佐藤賢一, 下瀬川徹
JDDW 2009 2009年 10月17日-京都-
ポスター 膵管内乳頭粘液腫瘍(IPMN)の手

術適応と切離線を決定するための検査法

5. 菅野敦, 佐藤賢一, 下瀬川徹
JDDW 2009 2009年 10月14日-京都-
ワークショップ 自己免疫性膵炎関連疾患の
病因病態

IgG4陰性自己免疫性膵炎の臨床的背景の検討

6. 菅野敦, 佐藤賢一, 下瀬川徹
JDDW2010 -横浜- 2009年10月13日
自己免疫性膵炎の治療と予後 自己免疫性膵炎の再燃に関する検討

7. 菅野敦, 佐藤賢一, 正宗淳, 廣田衛久, 菊田和弘, 桑潔, 濱田晋, 渡辺崇, 伊藤広通, 下瀬川徹, 高館達之, 力山敏樹, 海野倫明, 石田和之
第45回日本胆道学会 2009年 9月18日
千葉 下部胆管に発生した腺内分泌細胞癌の一例

8. 菅野敦, 佐藤賢一, 下瀬川徹
第40回日本膵臓学会大会 2009年7月30日
-東京-
ワークショップ 2 自己免疫性膵炎診断基準
2006の再評価 診断基準の国際化に向けて
当科における自己免疫性膵炎診断基準 2006の検討

[図書] (計 1 件)

1. 自己免疫性膵炎 1 超音波
見て診て学ぶ 膵腫瘍の画像診断 木村理著
菅野敦, 佐藤賢一, 下瀬川徹 永井書店 p316-321 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 敦 (KANNO ATSUSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：70509190

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：