

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08413

研究課題名(和文)急速に進行する膵管がんの特性を規定する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of pancreatic cancer showing catastrophic progression

研究代表者

池原 譲 (IKEHARA, YUZURU)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：10311440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、膵管がんの発症と進展に寄与する要因の解明を目指して実施した。代表者は、SV40 virusに由来するT抗原がPanINに発現する状況が生じると、急速に進行する膵管がんへと進展すること、および膵管がんの特徴的なtube forming growthが、TGFシグナルの活性化により制御されていることを明らかにした。これらは、自然に存在するポリオーマウイルスが膵管がんの発症に関与している可能性を示唆するものであるとともに、EMTを誘導するKey Factorとして、TGFが管状構造を形成しながら浸潤性に進展してゆく膵臓がん増殖のメカニズムを解明かにしたものである。

研究成果の概要(英文)：The aggressive clinical course of pancreatic duct adenocarcinoma (PDAC) relies on the invasive growth of cells showing the histoarchitecture of the tube form growth invading into retroperitoneal tissue and the nerve plexus and metastasizes to lymph nodes. Tube forming growth is an essential histological feature, but the appearance of PDAC is not connected well with the precancerous lesion, pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN). In this study, we demonstrated that the induced expression of SV40 tsA58 large T antigen with KrasG12D developed pancreatic intraepithelial neoplasia to PDAC, and elucidated that the activation of TGF- signaling plays an important role on the tube forming growth.

研究分野：実験病理学

キーワード：膵管がん 遺伝子改変モデルマウス T抗原 ポリオーマウイルス PanIN TGFb Tube forming Growth

1. 研究開始当初の背景

すい臓がんの臨床病理学的特徴は、catastrophe と表現される急速な進展である。膵管がん発生は、*kras* 遺伝子変異と関係した前がん病変 PanIN の出現を起点とし、*p53* や *Arf/Ink4a*、*Smad4* のがん抑制遺伝子における変異が生じて蓄積することで進展する。前がん病変は、悪性形質を段階的に獲得してゆくことでがん (Pancreatic Duct Adenocarcinoma: PDAC) へと進み、PanIN-PDAC Linear Pathway(図1 経路 A) と表現される。

2. 研究の目的

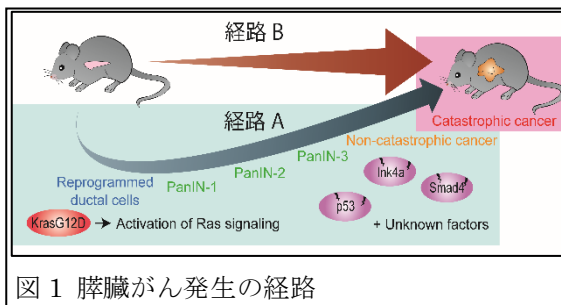


図1 膵臓がん発生の経路

膵管がん発症モデルマウスは、遺伝子改変技術を用いて *Kras*^{G12D} 等を膵臓上皮に発現させることで作成されており、前がん病変 PanIN の出現が必発である。これまでに作成されているこれらモデルマウスは、臨床病理学的に catastrophe と表現される、ヒトすい臓がんの特徴的な急速な進行が十分に再現されておらず、がんの急速な進行メカニズムの解明を十分に達成できているとは言い難い。そこで研究代表者らは、*Kras*^{G12D} とともに温度感受性 SV40 ウイルスに由来する tsA58 large T antigen (T 抗原)を共発現させた遺伝子改変マウスを作成し、報告している(Yamaguchi T, & Ikehara Y. J Pathol. 2014)。T 抗原を発現させたこのモデルは、遺伝子変異の生じた膵組織にポリオーマウイルス感染によって生じる *p53* の機能阻害を想定したものであったが、マウスは生後すぐに膵管がんを発症してがんが急速に進行し、死亡した。そこで当該マウスを出発点

に、Cre/loxP 依存のかつ Tet-On 依存的に T 抗原を発現するマウスを作成して、PanIN から膵管がんが生じるかどうか、そして急速な進行を遂げるかどうかを明らかにする研究を開始した。並行して、生じる膵管がんの生物学的悪性度を評価するため、上皮間葉系変換 Epithelial Mesenchymal Transition(EMT)についての理解を進めることとした。以上より本研究では、1) PanIN が、急速に進行する難治性膵管がんの発生母地となるかどうかを明らかにすること、そして膵管がんにおける 2)EMT のメカニズム解明を研究目的としている。

3. 研究の方法

1) Cre/loxP 依存のかつ Tet-On 依存的に T 抗原を発現する①のアリールを保有するトランスジェニックマウスを作製した。C57BL/6J マウスへバッククロスを行った後に、掛け合わせによって①から④のアリールを持つマウスを生産して解析を行った。

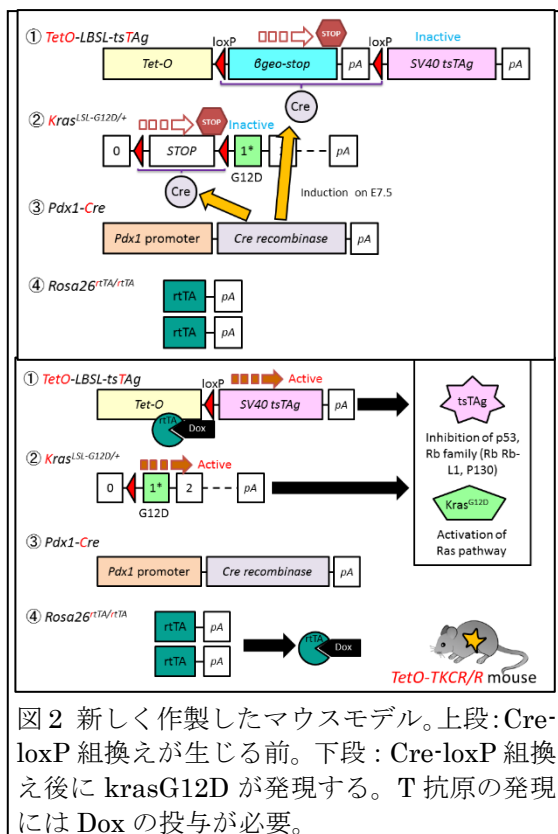


図2 新しく作製したマウスモデル。上段: Cre-loxP 組換えが生じる前。下段: Cre-loxP 組換え後に *kras*^{G12D} が発現する。T 抗原の発現には Dox の投与が必要。

①から④のアリールを持つ 8 週齢の成体マ

ウス (図 2 下段) においては、ドキシサイクリン(Dox) 非投与下で PanIN を生じていること、そして Dox 投与によって T 抗原の発現が誘導されることと膵管がんを速やかに発症するかどうかを検討した。

2) Kras^{G12D} と T 抗原を共発現させた遺伝子改変マウスにおいて発生した膵管がんより培養細胞株を分離し、三次元(3D)培養下で観察される管状構造形成を伴う増殖(Tube forming growth)について、EMT との関連性を想定した解析を行った。

4. 研究成果

1) PanIN は、急速に進行する難治性膵管がんの発生母地となる

本研究では、Dox 投与依存性に tsTA_g を発現する遺伝子改変マウスを作製して解析し、PanIN が直接的に癌化する事を見出した (図 3)。作製したマウスは、図 2 に示した①から④のアリールを保有しており、Kras^{G12D} を発現する膵組織に PanIN を生じる。同マウスは、140 日以上飼育を続けても膵管がんの発症を認めなかったのに対し、Dox 投与の状況では、生じた膵管がんによって投与開始から 2 週間以内に死亡した。組織学的には、Dox 投与開始の 3 日目に、PanIN は高度異形上皮も

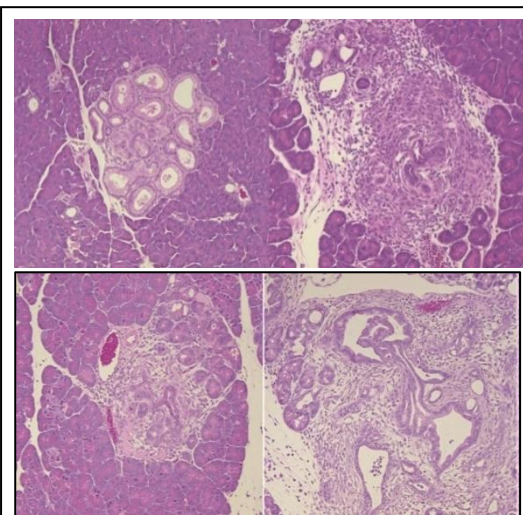


図 3 上段 : PanIN(左)は、Dox 投与開始後(右)に、異形上皮へと変化する。下段左は Dox 投与後 5 日目にみられた初期の膵管がん、投与開始後 7 日目(下段右)には、膵臓全体に広がる。

しくは Carcinoma In situ(CIS)病変へと変化した(図 3 上段)。Dox 投与開始後 5 日目では、微小浸潤がんが観察され(図 3 下段)、その後は Dox 投与開始後 14 日までに、すべてのマウスが死亡した。これらの事から、作製したマウスに生じた膵管がんは、catastrophe と表現されるヒトすい管がんの臨床病理学的特徴を再現していると考えている。

研究代表者が先に作成し、J Pathol. 2014 に報告した膵管がんを発症するモデルマウスは、生後すぐの発がんであるため、高齢者に多い事の特徴とするヒト膵管がんを再現しているとは言い難いものであった。しかしながらこのたびのトランスジェニックマウスは、Cre/loxP 依存のかつ Tet-On 依存的に T 抗原を成体マウスに発現させることが可能となったため、Dox の投与により発現誘導された T 抗原によって、PanIN が成体マウスで癌化することを再現できたと考えている。このことは、図 1 における経路 B において始点が PanIN であることを明確に示すものであり、膵管がんの発生の瞬間を捉えたことを意味する。

2) EMT メカニズムの解明

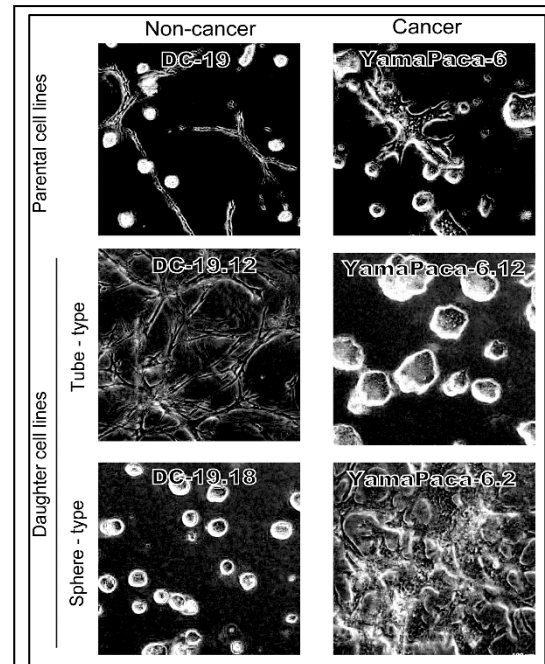


図 4 三次元培養で再現される Sphere と Tube forming 増殖。上段は親株、中段と下段はそれぞれ親株よりクローニング分離した細胞株。

作製したマウスより複数のがん細胞株と不死化細胞株を樹立し、コラーゲン内で 3D 培養してタイムラプスイメージングで追跡した。いずれの細胞株も sphere に加えて tube 構造が混在することを見出した(図 4 a-d)。また、これらの細胞株は、いずれも培養時に TGF β を添加することで Sphere 構造が減少し、管状構造を形成しながらの浸潤性増殖が増加することを見出した。

そこで、限界希釈法を用いて、膵管がん細胞株および不死化膵管上皮細胞株の両方から、それぞれ tube forming clone と sphere forming clone に分離し、DNA アレイを用いた遺伝子発現解析を実施した。その結果、tube forming clone は sphere forming clone に比べて、TGF β シグナルの標的となる分子発現が亢進してい

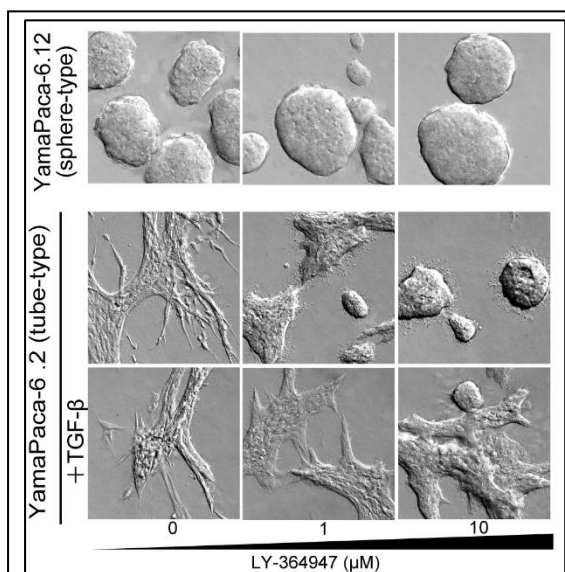


図 5 TGF β 阻害剤 [LY36497] 処理で、管状構造形成は停止する

たことが明らかになった。そこで、tube forming clone に TGF β シグナル阻害剤を加えて培養したところ、管状構造が消失して sphere を形成するようになった(図 5 d-f)。このとき TGF β を添加して培養すると、管状構造形成 が回復した (図 5 g-h)。これらのことは即ち、3D 培養下において再現される管状構造形成は、TGF β シグナルの活性化に依存しており、TGF β シグナルの減弱は Sphere 形成性に、TGF β シグナ

ルの増強は tube forming の誘導に寄与することを示しているといえる。

TGF β シグナルの活性化に依存して出現する管状構造形成と、TGF β シグナルの減弱によって出現する Sphere 形成は、超微形態学的には上皮性消失と回復を意味する(図 6)。TGF β 阻害剤 LY36497 処理によって生じた Sphere では、tight junction や microvilli の出現など上皮性の特徴的な構造を確認できるのに対し、sphere forming clone に対する TGF β 処理は、上皮性構造の消失をもたらした(図 6)。

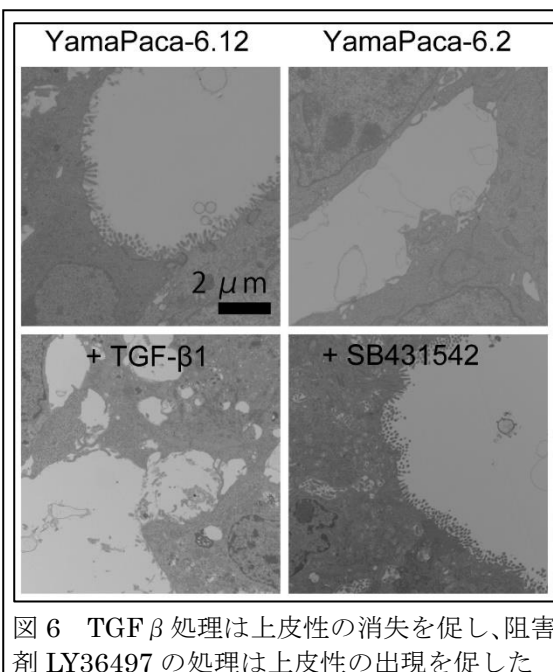
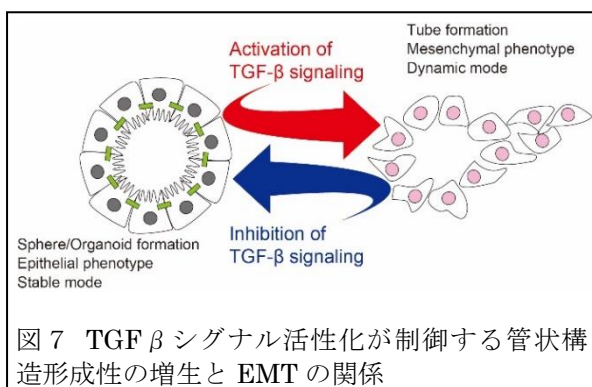


図 6 TGF β 処理は上皮性の消失を促し、阻害剤 LY36497 の処理は上皮性の出現を促した

これまでに行われた膵管がん発生に関する一連の研究は、膵臓上皮特異的に遺伝子発現を誘導する Pdx1 プロモータなどを利用した Cre/loxP 遺伝子組換え技術であり、Kras^{G12D} の発現誘導と p53 遺伝子の除去を行う PKC マウスの使用を基軸に、種々の遺伝子変異を生じさせた多段階のがん進展メカニズムを検討するものである(Morris J.P. Nature Review Cancer. 2010; 10(10): 683-95)。ここでは、① reprogrammed (または metaplastic) ductal cell の出現、②PanIN の出現、③PDAC の出現よりなるスキームを想定しているが、PKC マウスに生じた膵管がんは、他のマウスモデルに生じた大腸や肺のがんと比較しても、

catastropheな進展を遂げているとは言い難い。これに対して、我々の研究が示すところは、SV40 virusに由来するT抗原がPanINに発現する状況が生じると、急速に進行する膵管がんへの進展を促進するというものであり、自然に存在するポリオーマウイルスが発がんリスクとなることを示している。加えて、膵管がんの特徴的なtube forming growthは、TGFβシグナルの活性化で制御されていることを明確にしている(図7)。そして、ヒト膵管がん組織において、TGFβはEMTを誘導す



るKey Factorとして、管状構造を形成しながら激しい浸潤性増殖を制御する役割を担うなど、進行がんにおける生物学的悪性度の既定に寄与していることを明らかにできたと結論する。

5. 主な発表論文等

Sivakumar T, Ikehara Y, (5人中2番目) Dynamics of erythrocyte indices in relation to anemia development in Theileria orientalis-infected cattle. 査読有, The Journal of Protozoology Research 2017 27. 23-33. 4.
 Ogawa T, Ikehara Y (20人中7番目), ST6GALNAC1 plays important roles in enhancing cancer stem phenotypes of colorectal cancer via the Akt pathway Oncotarget. 査読有, 2017 8;8(68):112550-112564.
 Hayashizaki K, Ikehara Y (19人中17番目) Myosin light chain 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway

inflammation. Sci. Immunol. 査読有, 2016 1)
 Kaibori M, Ikehara Y, (15人中12番目) Evaluation of fluorescence imaging with indocyanine green in hepatocellular carcinoma, Cancer Imaging, 査読有, 2016:16(6).
Yamaguchi T, Ikehara Y (9人中6番目) Verification of WFA-Sialylated MUC1 as a Sensitive Biliary Biomarker for Human Biliary Tract Cancer. Ann Surg Oncol. 査読有, 2016; 23(2):671-677
 Saito T, Ikehara Y (10人中6番目) . Comparison of intratumoral heterogeneity of HER2 expression between primary tumor and multiple organ metastases in gastric cancer: Clinicopathological study of three autopsy cases and one resected case. Pathol Int. 査読有, 2015; 65(6): 309-17
 Matsuda A, Ikehara Y (15人中4番目) Lectin Microarray-Based Sero-Biomarker Verification Targeting Aberrant O-Linked Glycosylation on Mucin 1. Anal Chem. 査読有, 2015; 87(14): 7274-7281
 Iio E, Ikehara Y (18人中6番目) A novel glycobiomarker, Wisteria floribunda agglutinin macrophage colony-stimulating factor receptor, for predicting carcinogenesis of liver cirrhosis. Int J Cancer. 査読有, 2015;138(6): 1462-1471.
 [雑誌論文] (計21件)
 [学会発表] (計12件)
Ikehara Y Hemostasis using low-temperature plasma treatment -To develop a novel technology for processing tissue, cells, and biomaterials Plasma Conference 2017 (PLASMA2017) 2017年11月23日(招待講演)
Ikehara Y Biomarker research based on the principles of pathology- Glycoproteomics using genetically engineered mouse models 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月6

日（招待講演）

池原 讓、山口高志、池原早苗、中西速夫、
膵管がんを発症する遺伝子改変マウスモデル
の作成とこれを利用したバイオマーカー
への展開第 34 回日本糖質学会年会 2015
年 07 月 31 日 （招待講演）

〔図書〕（計 2 件）

池原 讓 最近のオミックス解析技術の進歩
-糖鎖解析技術の進歩で実現される糖鎖報
の解読と病態理解.オミックス解析技術 遺
伝子医学 MOOK 2015 vol 29 P94-99

山口 高志、池原 早苗、池原 讓 .
Catastrophic hypothesis による膵発癌 — ヒ
ト膵癌とマウスモデル膵癌 . 査読無し、
臨床消化器内科 2016;Vol.31 No.13(5-1)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

池原 讓 (IKEHARA, Yuzuru)

国立研究開発法人産業技術総合研究所

創薬基盤研究部門・上級主任研究員

研究者番号：10311440

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

山口 高志 (YAMAGUCHI Takashi)

千葉大学大学院医学研究院・腫瘍病理学教室・

講師

研究者番号：60626563

池原 早苗 (Sanae Ikehara)

千葉大学大学院医学研究院・腫瘍病理学・特

任助教

研究者番号：50598779

(4)研究協力者

橋本 美香 (HASHIMOTO, Mika)

国立研究開発法人産業技術総合研究所

創薬基盤研究部門・テクニカルスタッフ