

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14393

研究課題名(和文) 宿主環境要因が個体レベルで膵がん悪性化に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effects of the host environment factors on pancreatic cancer malignancy at whole body levels

研究代表者

高橋 真美 (Takahashi, Mami)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：90214973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓特異的にK-ras変異体を発現させたPtfla(Cre+)/LSL-K-ras(G12D/+)マウスに発生する膵がん組織よりC57BL/6J系統のマウスに同種移植可能な高分化/中分化型膵がん細胞株を5株樹立した。そのうち2細胞株は、C57BL/6J系統の肥満モデルマウスの皮下に移植すると増殖促進が認められ、膵臓への同所移植では、腫瘍内に顕著な脂肪浸潤が見られ、内臓脂肪への播種も観察された。膵臓がんリスク要因として個体レベルの解析が必要な肥満や糖尿病などが腫瘍形成に及ぼす影響を検討することができる同種同所移植モデルを構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Five culture cell lines which develop well/moderately differentiated carcinoma grafts in C57BL/6J mice were established from pancreatic tumors of Ptfla(Cre+)/LSL-K-ras(G12D/+) mice. When these cell lines were subcutaneously implanted to obese Ay mice, promotion of tumor growth was observed in 2 cell lines. Orthotopic implantation of the cells develop pancreatic tumor grafts in which marked fatty infiltration was observed, and dissemination to visceral fat. This orthotopic allograft model is useful to study the effects of pancreatic cancer risk factors such as obesity/diabetes on pancreatic tumor growth at whole body levels.

研究分野：発がん

キーワード：膵臓がん 動物モデル 宿主環境要因 悪性化

## 1. 研究開始当初の背景

発がんのメカニズムを明らかにし、がんを予防するためには、発がんに関わる環境要因・遺伝的要因の影響の解析が重要である。膵臓発がん研究においては、遺伝子改変によるマウス膵臓発がんモデルが海外及び国内で用いられている。膵臓特異的に K-ras 変異体を発現させ、p53 等のがん抑制遺伝子をノックアウトしたモデルでは、高率に膵臓がんが発生するが (Hingorani, S.R., et al., *Cancer Cell*, 2005)、膵臓全体が短期間でがん化するため、発がん過程の解析やがん予防研究にはあまり適さない。一方、K-ras 変異のみのマウスでは、高率に膵管の前がん病変 mPanIN が発生するものの、がんの発生には時間がかかり、発生率もあまり高くないが、膵炎等による発がん促進の解析が可能である (Guerra, C., et al., *Cancer Cell*, 2007)。我々はこれまでに、膵臓特異的に K-ras 変異体を発現させた Ptfla(Cre+)/LSL-K-ras(G12D/+)マウスと肥満モデルマウスとのかけ合わせによって発がんが促進されるという結果を得ている (未発表データ)。しかしながら、複数の形質のマウスの交配実験には膨大な数のマウスの繁殖が必要であり、また、発がんにかかることや、発がん率が高くないことから、より効率の良い実験系の開発が望まれている。現在行なわれている簡便な方法としては、マウス膵臓培養細胞株 Pan02 を、そのバックグラウンドの C57BL 系統のマウスに同種移植する実験系にて、肥満・高脂肪食や遺伝子欠損等の影響が検討されている (Zyromski, N.J., et al., *Surgery*, 2009; White, P.B., et al., *J. Gastrointest. Surg.*, 2010; Doi, C., et al., *BMC Cancer*, 2010)。しかし、この細胞株の移植腫瘍の組織像は非常に低分化・未分化がんであり、管腔構造を形成し間質を多く含む分化型の膵臓がんの組織像とは異なるものである。膵臓発がん過程の解析には、膵

管上皮細胞の形質を有する前がん病変段階の細胞を用いることが望ましいが、それらを細胞株化することは難しい。Ptfla(Cre+)/LSL-K-ras(G12D/+)マウスでは、良性腫瘍や比較的分化度の高い膵臓腫瘍も発生するので、それらが悪性化するメカニズムを検討することができると考えた。これまでにマウス膵臓腫瘍より培養細胞株の樹立を試みたところ、低分化・中分化がんの細胞株は樹立できたが、高分化がんや良性腫瘍からは継代可能な細胞株は樹立できなかった。最近、ヒトの腫瘍組織の高度免疫不全マウスへの移植系において、良性腫瘍ながら浸潤がんに移行する可能性のある intraductal papillary-mucinous neoplasm (IPMN)の組織をゼノグラフトとして増やすことが出来ることが報告された (Kamiyama, H., et al., *Lab. Invest.*, 2010)。そこで、マウス膵臓発がんモデルに発生した高分化がんや良性腫瘍組織を C57BL/6J 系統のマウスに同種移植して安定的に継代可能な移植株を樹立するという着想に至った。良性もしくは悪性度の低い腫瘍組織を同種移植し宿主環境により悪性化させる実験系が構築できれば、発がん促進機構の解明や予防剤の開発に有用である。

## 2. 研究の目的

疫学的研究により膵臓がんのリスク要因として、喫煙、慢性膵炎、糖尿病、肥満、運動不足、加齢等が挙げられているが、そのメカニズムは培養細胞レベルの研究では判らず、個体レベルの解析が必須である。移植モデルでは、生体側の様々な因子が腫瘍形成に及ぼす影響を検討することが出来る。特に、炎症や肥満・糖尿病・加齢等、細胞培養系では解析が難しいが発がんとの関わりが指摘されている要因について腫瘍形成への影響を調べる事が出来る利点がある。また、ヒトにおける関与が示唆されている発がんリ

スク要因によって前がん病変や良性病変の悪性化が起これば、その発がんメカニズムを研究するための良いモデルとなる。本研究では、膵臓特異的に K-ras 変異体を発現させた Ptfla(Cre+)/LSL-K-ras(G12D/+) マウスに発生する高分化がんや良性腫瘍を C57BL/6J 系統のマウスに同種移植して継代可能な移植株を樹立し、その移植株を C57BL/6J 系統の病態モデルマウスや遺伝子改変マウスに移植して、良性腫瘍からのがん化、もしくは高分化型がんから低分化がん/転移がんへの悪性化を起こすことを目標とし、異型度・分化度の変化や増殖・浸潤・転移等の増進について解析する。膵がんの悪性化に対する肥満・糖尿病・加齢等の影響を宿主-移植腫瘍間相互作用を利用して総合的に個体レベルで解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Ptfla(Cre+)/LSL-K-ras(G12D/+) マウス由来の各種膵臓病変を用いた移植株・培養細胞株の作成

1 Ptfla(Cre/+) マウスと LSL-K-ras(G12D/+)マウスを交配させ、産出仔のジェノタイプングを行ない、Ptfla(Cre/+)/LSL-K-ras(G12D/+)マウスを選択して長期飼育を行なった。半年～1年で肉眼で検出可能な腫瘍が5～10%程度発生することが見込まれる。腫瘍には、高分化型・中分化型腺がん、及び肉腫様成分を含む低分化・未分化タイプのがんに加え、一部、IPMN等の良性腫瘍が含まれる。組織切片上で検出される微小がんを含めると、発がん率は20～30%程度である。前がん病変の PanIN や微小な IPMN はほぼ100%の頻度で発生する。

腫瘍発生の兆候が見られるマウスより、膵臓腫瘍もしくは膵臓病変部位を摘出し、その一部を C57BL/6J マウスの皮下へ移植し、一部は細胞培養用サンプルとし、残りはホルマリン固定して組織標本作製した。移植マウ

スにおける腫瘍生成の有無を経時的に観察し、増大した腫瘍の組織標本作製するとともに、別の C57BL/6J マウスの皮下に継代移植した。継代が可能になった移植株は、細胞凍結保存液を用いて保存し、その一部を再び移植して、増殖の可否を確認した。また、細胞培養系における増殖・継代の可否も検討し、可能であれば培養細胞株も樹立した。

2 移植株およびオリジナル腫瘍の病理組織像を比較し、同様な形態が維持されているかを調べた。また、組織形態のみでなく、p16 や p53 等のがん抑制遺伝子の発現異常や c-myc やその他のがん関連遺伝子の発現を RT-PCR 法によって調べ、発がんのどの段階に位置する病変であるかを推定した。がん化/悪性化誘導モデルに用いるには、がん抑制遺伝子の不活化が起きていない段階の病変が望ましく、IPMN 等、良性腫瘍の形状を示す移植株の樹立を目標としたが、結果的に良性腫瘍の移植株は得られなかったため、高分化がん、中分化がん、低分化がん等、様々なタイプの移植株や培養細胞株を作成した。

(2) 各種培養細胞株の in vivo における増殖に対する肥満の影響とそのメカニズムの検討

移植株を植えた C57BL/6J マウスへの高脂肪食の投与や、同系統の肥満 Av マウス (アグーチを全身で高発現する) への移植株の皮下又は膵臓移植により、肥満が腫瘍形成に及ぼす影響を調べた。また、加齢により膵臓の細胞の機能低下が起こること等が報告されていることから、若齢及び老齢マウスの膵臓に同所移植した場合の腫瘍形成についても検討した。

上記の検討でがんの増殖・進展が認められた実験系において、腫瘍組織の凍結サンプルやホルマリン固定切片を用い、cDNA アレイ解析や定量 RT-PCR、免疫染色等により、増殖・浸潤等に関わる因子の発現変化を調べた。

これら一連の研究により、宿主環境要因が個体レベルで膵がん増殖・浸潤に及ぼす影響を解析するための同種同所移植マウスモデルが構築され、膵がんの進展抑制法開発の一助となることが期待される。

#### 4. 研究成果

##### (1) Ptfla(Cre+)/LSL-K-ras(G12D+)マウス由来膵がん培養細胞株の樹立

膵臓特異的にK-ras変異体を発現させるPtfla(Cre+)/LSL-K-ras(G12D+)マウスを繁殖し、得られた膵臓腫瘍組織から細胞培養を行い、培養細胞株を樹立した。また、一部の腫瘍組織は、直接シャーレで培養せず、C57BL/6Jマウスの皮下に移植し、移植株およびオリジナル腫瘍の病理組織像を比較し、同様な形態が維持されているかを確認後、数回継代移植してから培養した。樹立できた細胞株はサブクローン化し、C57BL/6Jマウスの皮下に移植して腫瘍形成能及びその組織型を調べた。低分化/未分化がん3例全例から細胞株を樹立出来たが、高/中分化型がんから樹立出来たのは21例中15例であった。そのうちC57BL/6Jマウスの皮下に移植して腫瘍が増大したものは7株で、残り8株は、一旦小さい腫瘍を形成したが、1~2週間で退縮した。形成された皮下腫瘍の組織型は元の腫瘍に似ている場合が多かったが、元々の腫瘍も組織が均一ではなく、高分化型の部分と低分化型の部分が混在しているものが多く、同一の腫瘍から樹立された培養細胞でもクローンによって組織型が異なるものが見られた。

特に、IPMN 由来高分化がん組織 3 例から培養細胞株の樹立を試みた場合、2 例は培養細胞株の樹立に成功し、もう 1 例では成功しなかった。前者の 2 細胞株を各々サブクローン化し C57BL/6J マウスの皮下に移植したところ、1 例では、高分化から低分化まで様々な分化度の腫瘍が形成され、もう 1 例では、形成された腫瘍は扁平上皮化生していた。一

方、培養細胞株が得られなかった腫瘍の組織を C57BL/6J マウスの皮下に移植したところ、腫瘍が形成され、継代することができる移植株が得られたが、その組織型は中分化へ変化していた。また、この移植腫瘍組織から樹立した培養細胞株は、C57BL/6J マウスの皮下に移植すると退縮してしまうため、免疫不全の Scid-bg マウスの皮下に移植してみたところ、腫瘍は退縮しなかったが、得られた腫瘍の組織像は低分化型であった。

このように、特に細胞株樹立が困難な高分化型がんでは、培養・継代中にセレクションがかかって、分化度が低いものに変化していきやすいと考えられた。

##### 2 樹立培養細胞株におけるがん抑制遺伝子の発現

14株のマウス培養細胞株について、ヒト膵がんではメチル化や欠失が高頻度に起きているp16の発現をRT-PCR法で調べたところ、4つの細胞株では発現が認められたが、残りの10株では発現が見られなかった。一方、TP53は14株全てで発現しており、シークエンス解析でも変異等は検出されなかった。ハムスターの膵臓の化学発がんモデルでは、K-ras変異に加えてp16のメチル化や欠失による発現消失が高頻度に起きていることが報告されている(Li J., et al. Carcinogenesis, 2004)。K-ras変異単独のマウスモデルでは発がん率は低いが、K-ras活性化変異に加えてp16の発現消失が起こることが発がんの主な経路であることが示唆された。p16の発現が消失していない4株とそれ以外の細胞株との分化度や形態に特に特徴は見られなかった。

##### (2) 移植細胞株のin vivoにおける増殖に対する肥満の影響

樹立された細胞株のうち、C57BL/6J 系統のマウスに造腫瘍性があり、その組織像が高~中分化型であった 5 株を肥満モデルの Ay マウスとその WT マウスの皮下に移植して腫瘍増殖の違いを検討した結果、Ay マウスでの

増殖が促進される細胞株 2 株と、WT マウスと変わらない細胞株 3 株の 2 つに分かれた。A $\nu$  マウスで増殖が低下する細胞株はなかった。A $\nu$  マウスへの皮下移植で増殖促進が見られた 2 つの細胞株を A $\nu$  マウスの膵臓に同所移植したところ、同様に A $\nu$  マウスで増殖促進が見られた。この同所移植では、腫瘍内に顕著な脂肪浸潤が見られ、内臓脂肪への播種も観察された。腫瘍の増殖促進が一番顕著に見られた高 / 中分化型がん細胞株由来の皮下腫瘍及び膵臓腫瘍組織から RNA を抽出し、Agilent のアレイ解析を行った。A $\nu$  マウスで共通して発現が高い遺伝子を抽出し、さらに、リアルタイム PCR を行った。その結果、SAA3, MMP12, F4/80 遺伝子の発現が A $\nu$  マウスの脂肪組織や腫瘍で上昇していた。これらは、炎症、マクロファージで発現していることが知られている。アグーチの高発現は内臓脂肪を蓄積させ、マクロファージを呼び寄せて活性化させると考えられる。これら由来のアディポカイン、サイトカインや、腫瘍内に浸潤した脂肪細胞やマクロファージが腫瘍増殖を促進する可能性が示された。

A $\nu$  マウスの皮下や膵臓に移植した場合に腫瘍の増殖促進が一番顕著に見られた高 / 中分化型がん細胞株を、高脂肪食投与により肥満させた野生型マウスの皮下または膵臓に移植し、通常食マウスに移植した場合との比較を行なったところ、皮下及び膵臓移植腫瘍の増殖促進傾向が見られ、特に同所移植において腫瘍内への脂肪浸潤や横隔膜への播種が多く観察された。高脂肪食による肥満は A $\nu$  マウスほど顕著ではなかったが、腹部内臓脂肪が増加し、膵臓の血管周りへの脂肪蓄積が見られ、これら由来のアディポカインや、腫瘍内に浸潤した脂肪細胞やマクロファージが腫瘍増殖を促進したと考えられた。

一方、宿主の肥満による影響を受けない細胞株もあり、宿主の肥満由来がん促進因子に

対するがん細胞側の受容体の発現等を調べてその原因を明らかにすることが今後の課題である。

## 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 1 件)

1 Hori, M., Mutoh, M., Ishigamori, R., Imai, T., Takahashi, M. Activated ductal proliferation induced by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in fat-induced pancreas of KK-A $\nu$  mice. *In Vivo*, 32: 499-505, 2018. 査読有り. DOI: 10.21873/invivo.11267

[学会発表](計 3 件)

1 高橋真美、石ヶ守里加子、武藤倫弘、今井俊夫。Analysis of cancer promotion mechanisms using allograft models of mouse pancreatic adenocarcinoma cell lines. 第75回日本癌学会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2016年10月8日。

2 高橋真美、石ヶ守里加子、武藤倫弘、田中卓二、今井俊夫。肥満モデル A $\nu$  マウスにおける膵臓の脂肪浸潤のがんの発生・増殖に対する影響。がん予防学術大会 2016 名古屋、名古屋大学基礎医学研究棟(愛知県・名古屋市)、2016年7月1-2日。

3 高橋真美、石ヶ守里加子、武藤倫弘、藤井元、宮本真吾、田中卓二、今井俊夫。Increase of pancreatic cancer development in pancreas-specific *K-ras* mutant mice by crossing with obesity A $\nu$  mice and involvement of the M-CSF. 第10回日米癌合同会議(ハワイ)、2016年2月19日。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 真美 (TAKAHASHI Mami)

国立研究開発法人 国立がん研究センター 研究所 動物実験施設 ユニット長  
研究者番号：90214973