

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07095

研究課題名(和文)膵管内乳頭粘液性腫瘍の発生メカニズムを反映した新規マーカーの確立

研究課題名(英文)Validation of new markers for Intraductal papillary mucinous neoplasms based on the tumorigenic mechanism.

研究代表者

山口 洋志 (Yamaguchi, Hiroshi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80457704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN: Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm)を発生する新しい遺伝子改変マウスを起点とした解析から同定された、原因遺伝子変異によって発現が制御される分子群に関して、マウス実験系でさらなる解析を行った。
その結果、インターロイキン1ファミリーとSOX転写因子が有望な分子として同定された。患者由来IPMN組織、正常ヒト膵管上皮細胞培養系、ヒト膵癌細胞株を含むヒト実験系における解析を施行した。

研究成果の概要(英文)：I established a new mouse model in which pancreas-specific development of Intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) were obtained by induction of the mutant GNAS and detected molecules which were regulated by the mutant GNAS. This study was conducted to evaluate the importance of the molecules regulated by the mutant GNAS and validate the effectiveness as new markers for therapy and diagnosis of human IPMNs.

Further analysis of the molecules in the mouse system, an interleukin-1 family and a SOX transcription factor were identified to be analyzed in human system. The analysis in human system including patient-derived tissues of IPMNs, normal human pancreatic duct epithelial cells and human pancreatic cancer cells was conducted.

研究分野：消化器外科学、膵臓外科学、分子腫瘍学、細胞生物学

キーワード：膵管内乳頭粘液性腫瘍 遺伝子改変マウス GNAS IL-1ファミリー SOX転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床的背景：IPMN は、粘液産生性上皮の膵管内における乳頭状増殖から膵管拡張と嚢胞形成をきたし、膵腫瘍性嚢胞の原因として最多を占める疾患である。通常型膵癌に比べ進行は緩徐であるが、腺腫から浸潤癌まで生物学的悪性度の異なる広い範囲の病変が含まれることから、悪性度の評価や治療方針の決定において議論となる問題点が多い。病変の生物学的悪性度の評価は、臨床画像による形態学的評価による予測に依るところが大きく、IPMN の発生メカニズムや生物学的悪性度を反映する有効な分子マーカーの確立が、より正確な診断・治療のために重要であると考えられる。

(2) これまでの知見と本研究の学術的背景：近年、IPMN 切除例の 40~60% に通常型膵癌にはみられないGNAS コドン 201 の機能亢進性のミスセンス変異を認めることが明らかとなった¹⁾²⁾。さらに、膵臓特異的に変異 KRAS と変異 GNAS を発現させた遺伝子改変マウスでは IPMN に類似する嚢胞性腫瘍が発生することが報告された³⁾。これらの知見から GNAS コドン 201 変異は IPMN の発生に極めて重要であると考えられるが、そのメカニズムに関してはほとんどわかっていない。研究代表者はメカニズムの解明のために、変異 GNAS を任意のタイミングで発現誘導可能な遺伝子改変マウスとマウス膵癌細胞株を作成し、変異 GNAS 発現誘導によって制御される分子群を同定した。

2. 研究の目的

新たに同定された、変異 GNAS によって制御される分子群に関して解析を行い、IPMN 発生や進行における役割に関して検討する。ヒト

細胞における機能や、ヒト IPMN 組織における発現と病理学的所見や予後等の臨床データとの関連性を検討し、質の高いトランスレーショナルな validation の成された新規病態マーカー分子を発見することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス実験系における解析

変異 GNAS 発現誘導可能遺伝子改変マウス、マウス膵癌細胞において、発現誘導の有無で上記分子群の変化を qPCR、Western blot、免疫染色等を用いて解析し、さらに有望な分子を絞り込む。

(2) ヒト実験系での解析

In vitro の解析として研究代表者が以前に確立した正常ヒト膵管上皮細胞培養系⁴⁾と、ヒト膵癌細胞株を用いる。マウス実験系で有望とされた分子の発現、機能を、正常ヒト膵管上皮細胞モデルとヒト膵癌細胞株で確認する。マウス実験系、in vitro のヒト実験系で有望とされた分子に関して、ヒト IPMN 組織における発現を免疫染色により解析する。ヒト IPMN 組織での発現と臨床病理学的因子との関連性を解析し、IPMN の診断と治療における新規マーカーとなり得る分子を同定する。

4. 研究成果

(1) 変異 GNAS 発現誘導可能マウス膵癌細胞による研究成果

遺伝子改変マウスから確立された、これまでに報告のない新たな細胞であり、完全に同一細胞種で変異 GNAS の発現 On・Off のみを変えて、その影響を正確に比較解析できる重要なツールである。変異 GNAS の発現 On により、発現が上昇する分子群に関して、GNAS 発現を

off にすることにより、発現が著明に低下することを qPCR で確認した。変異 GNAS の effector と考えられるサイクリック AMP (cAMP) の agonist を投与することにより、変異 GNAS 発現が Off でも、同様に有意な発現上昇を認め、変異 GNAS の effector として cAMP の重要性が示唆された。さらに、cAMP シグナル経路下流の複数の effector のうち、代表的な一つの effector の阻害薬を用いたところ、GNAS 発現 On による IL-1 ファミリーの発現上昇は有意に抑制されたが、SOX 転写因子の発現上昇は抑制されず、cAMP の下流で異なる発現制御機構が働いていることが推測された。

(2) 遺伝子改変マウス：新規 IPMN マウスモデルの膵組織における研究成果

変異 GNAS 発現を On にし、マウス膵組織の変化を追跡観察した。ヒト IPMN に最も類似した病変が形成される時期を同定し、パラフィン包埋切片の免疫染色を施行した。免疫染色を施行するにあたり、変異 GNAS 発現 On により発現が上昇する分子群に関して、まず文献検索を行い、これまでに報告されている知見、腫瘍学的な役割、ヒト膵組織での発現を調査した。次いで、利用可能な市販抗体が存在するかどうかを検索し、対象を絞り込んだ。マウス実験系の結果から、IL-1 ファミリーと SOX 転写因子が有望なマーカー候補として同定され、ヒト実験系における重点的な解析対象とした。

(3) ヒト IPMN 組織における研究成果

正常ヒト膵管上皮細胞培養系での、対象分子の群の発現、機能解析を予定したが、正常ヒト膵管上皮細胞培養系作成に関して当学 IRB の許可を得るのに時間を要したため、ヒ

ト IPMN 組織における免疫染色による対象分子の発現解析を先行させた。当学 IRB の許可を得て、当科におけるこれまでの IPMN 切除例に関する後方視的解析を施行し、データベースを作成した。IPMN 切除例の術後全生存期間を解析したところ、腺腫症例と浸潤癌症例で有意差を認めた。そのため、腺腫症例と浸潤癌症例比較を計画し、H-E 染色による病理組織所見を見直し、典型的な症例を選んでパラフィン包埋切片の免疫染色を施行した。IL-1 ファミリーの免疫染色では、腺腫病変上皮の 80% が、浸潤癌病変上皮の 25% が陽性であった。SOX 転写因子の免疫染色においては、腺腫病変上皮 50% が、浸潤癌病変上皮の 10% が陽性であった。IL-1 ファミリーの腺腫病変のマーカーとしての有用性が示唆され、今後、症例数をさらに増やして検討を進めていきたい。

(4) ヒト細胞における解析

正常ヒト膵管上皮細胞培養系、ヒト膵癌細胞株を用いて、cAMP 刺激に加え、サイトカイン刺激による IL-1 ファミリーと SOX 転写因子の発現制御機構の解析を進めている。

< 引用文献 >

- 1) Wu J, Matthaei H, Maitra A, Dal Molin M, et al. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med*, 3, 2011, 92ra66
- 2) Furukawa T, Kuboki Y, Tanji E, et al. Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Sci Rep*, 1, 2011, 161
- 3) Taki K, Ohmuraya M, Tanji E, et al.

GNAS(R201H) and Kras(G12D) cooperate to promote murine pancreatic tumorigenesis recapitulating human intraductal papillary mucinous neoplasm. *Oncogene*, 35, 2016, 2407-2412

4) Yamaguchi H, Kojima T, Ito T, et al. Transcriptional control of tight junction proteins via a protein kinase C signal pathway in human telomerase reverse transcriptase-transfected human pancreatic duct epithelial cells. *Am J Pathol*, 177, 2010, 698-712

5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕(計1件)

Yamaguchi H, Kimura Y, Imamura M, Nagayama M, Ito T, Nobuoka T, Mizuguchi T, Takemasa I. Oncological features and outcomes of curatively resected pancreatic non-functional neuroendocrine tumor: single institute experiences. *JOP*, 査読有, 18, 2017, 335-341

<http://pancreas.imedpub.com/oncological-features-and-outcomes-of-curatively-resected-non-functional-pancreatic-neuroendocrine-tumor-single-institute-experiences>
[http?aid=20238](http://pancreas.imedpub.com/oncological-features-and-outcomes-of-curatively-resected-non-functional-pancreatic-neuroendocrine-tumor-single-institute-experiences)

〔学会発表〕(計9件)

山口洋志、木村康利、今村将史、永山稔、中山健太、藤野紘貴、木村明菜、水口徹、竹政伊知朗。膵頭部癌に対する空腸動脈の解剖に基づく上部空腸間膜から SMA マージン郭清の手技とアウトカム。第79回日本臨床外科学会総会、11/23-25/2017、東京

②山口洋志、木村康利、今村将史、永山稔、

林毅、小野道洋、水口徹、坂田耕一、加藤淳二、竹政伊知朗。局所進行膵癌に対して化学放射線療法により病理学的CRが得られた4切除例。JDDW2017 第25回日本消化器関連学会週間、10/12-15/2017、福岡

Yamaguchi H, Kimura Y, Imamura M, Nagayama M, Kono T, Ito T, Nobuoka T, Mizuguchi T, Takemasa I. Role of lymph node metastasis and its evaluation in non-functional pancreas neuroendocrine tumor. The 29th meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, Joint congress of the 6th A-PHPBA, 6/7-10/2017, Yokohama

山口洋志、木村康利、今村将史、永山稔、河野剛、水口徹、竹政伊知朗。膵・十二指腸神経内分泌腫瘍の根治的切除後再発に関する検討。第117回日本外科学会定期学術集会、4/27-29/2017、横浜

山口洋志、木村康利、今村将史、永山稔、河野剛、水口徹、竹政伊知朗。局所進行から当初切除不能膵癌と診断されたが、根治切除に至った conversion 症例の特徴。第110回日本臨床外科学会北海道支部例会、12/3/2016、札幌

山口洋志、木村康利、今村将史、伊東竜哉、及能大輔、河野剛、水口徹、竹政伊知朗。当科における散発性非機能性膵神経内分泌腫瘍の特徴と治療成績。第78回日本臨床外科学会総会、11/24-26/2016、東京

山口洋志、木村康利、伊東竜哉、今村将史、永山稔、河野剛、及能大輔、水口徹、竹政伊知朗。当科における膵神経内分泌腫瘍に対する腹腔鏡下尾側膵切除術に関する検討。第8回膵臓内視鏡外科研究会、11/23/2016、東京

Yamaguchi H, Kimura Y, Imamura M, Nagayama M, Kyuno D, Kohno T, Mizuguchi T, Furuhashi T and Takemasa I. J2-artery Oriented Dissection of Meso-pancreatoduodenum and Upper Jejunum in Pancreaticoduodenectomy for Pancreatic Cancer. 40th ICS World Congress, 10/23-26/2016, Kyoto

山口洋志、木村康利、今村将史、河野剛、林毅、田村文人、水口 徹、坂田耕一、加藤淳二、竹政伊知朗。化学放射線療法により病理学的CRが得られた局所進行膵癌の3切除例。第119回日本消化器病学会北海道支部例会、9/3-4/2016、札幌

6. 研究組織

研究代表者

山口 洋志 (YAMAGUCHI, Hiroshi)

札幌医科大学医学部・消化器・総合、乳腺・内分泌外科学講座・助教

研究者番号：80457704