

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15745

研究課題名（和文）ラット膵発癌モデルの開発による膵癌早期診断マーカーおよび新規治療法の確立

研究課題名（英文）A development of novel rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma and therapeutic options

研究代表者

五十嵐 聡（IKARASHI, Satoshi）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：50790953

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：膵臓選択的なハイドロダイナミック遺伝子導入法によりラット膵臓にヒト膵癌関連遺伝子を導入し、膵癌モデル動物を確立すること、および、同モデルを用いて腫瘍マーカー、新規治療法を検討することを目的とした。現在までに、効率的に膵癌モデルを作製するための、遺伝子導入パラメータ、遺伝子の濃度、遺伝子の組み合わせの最適化を行い、安全、効率的に膵癌モデルを作製することができた。現在、遺伝子導入後の、膵組織の変化、遺伝子の導入された一細胞ごとの変化の検証などを行い、モデル動物としてのメカニズムを明らかにするとともに、膵癌の治療法開発研究に応用するための検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓選択的なハイドロダイナミック遺伝子導入法により膵癌モデルラットを確立した。その簡便性と再現性から、本モデルの分子生物学的な解析に基づき、ヒト膵癌の治療標的決定のための検討が可能になり、膵癌の早期診断法、新規治療法の開発に寄与すると考える。さらに、今まで難治であった膵癌の診断・治療に大きな恩恵を与え、膵癌の予後改善につながると考える。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to establish an animal model of pancreatic cancer utilizing the pancreas-targeted hydrodynamic gene delivery of human oncogenes in rats. To date, we have successfully developed a novel rat pancreatic cancer model safely and efficiently by optimizing gene delivery parameters, gene concentrations, and gene combinations in order to create efficiently a pancreatic cancer model. Following this development, we are clarifying the molecular mechanism of this pancreatic cancer model to identify the therapeutic target.

研究分野：医学

キーワード：膵癌 ラット膵発癌モデル ハイドロダイナミック遺伝子導入法

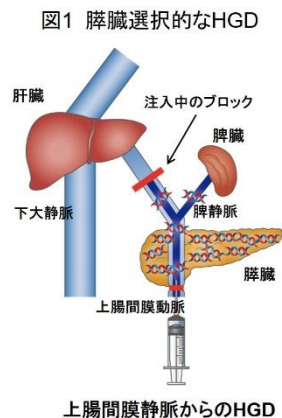
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌はわが国の部位別癌死亡数の第4位であり、5年生存率は8.9%とあらゆる癌腫で最も予後が悪い [1]。早期診断法の確立、新規治療法の開発は喫緊の課題であるが、これまで有用な膵癌動物モデルが確立されておらず、*in vivo* の解析が困難であった。

膵癌においては、様々な遺伝子異常が蓄積するにつれ前癌病変が浸潤癌へと進行する (多段階発癌仮説) とされる [2]。発癌早期から進行期にいたるまでの病態を理解するために人の膵癌を再現する動物モデルが不可欠である。

これまで系統的な研究を重ねてきたハイドロダイナミック遺伝子導入法 (Hydrodynamic gene delivery, 以下 HGD) [3] を用いた臓器特異的な遺伝子導入方法を膵臓に応用し、膵臓に様々な遺伝子を安全、効率的に発現させる方法論を確立した [4] (図1)。また肝臓では、ハイドロダイナミック法で *myc*、*Yap* などの癌遺伝子を導入することによる肝細胞癌モデルが多数報告されている [5]。そこで、本方法論により様々な膵癌関連遺伝子を膵臓選択的に導入し、ヒト膵癌の病態に近い膵癌動物モデルを確立することが可能と考えた。



2. 研究の目的

膵臓選択的な HGD によりラット膵臓にヒト膵癌関連遺伝子を導入し、膵癌モデル動物を確立することを目的とした。また、膵発癌ラットの腫瘍組織を分子生物学的、組織学的に検討するとともに、経時的な血清の解析により早期診断マーカーの検証を行う。加えて検証した種々の遺伝子を標的とした遺伝子治療や分子標的治療の検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

野生型ラットを対象として、門脈を一時的に遮断し上腸間膜静脈からルシフェラーゼ発現プラスミド DNA 溶液を HGD により注入した。ルシフェラーゼ発現解析から臓器選択性と注入量、速度などと安全性の関与を検証し、膵臓選択的な HGD パラメーターの最適化を行った。そのパラメーターを用いて、野生型 *Kras*、変異型 *Kras* (G12D)、*Nras*、*Myc*、*Yap* 遺伝子の発現プラスミド DNA 溶液を単独あるいは組み合わせで作成し、それぞれラット 5-6 匹ずつに対して膵臓選択的な HGD を施行した。飼育期間は HGD 後最長 6 ヶ月とし、腫瘍形成が疑われれば sacrifice した (図 2a)。発癌の有無と関連する分子シグナル伝達機構の解析を行い、膵癌モデル形勢に最適な標的遺伝子を決定した。

続いて、膵発癌の効率化を目指し HGD (2 回法) を行った。まず生理食塩水 (Ns) および変異型 *Kras*、*Yap* のプラスミドを用い、膵臓選択的な HGD を施行。4 週後に再度 HGD を行い、1 週および 4 週後に sacrifice した (図 2b)。主膵管、腺房細胞それぞれにおける発癌の有無を検証した。

また、上記で発生した腫瘍を用い免疫染色により発現蛋白を確認した。合わせて肝での Western Blot 法により発現蛋白の確認を行った。

4. 研究成果

(1) 膵臓選択的な HGD パラメーターの最適化

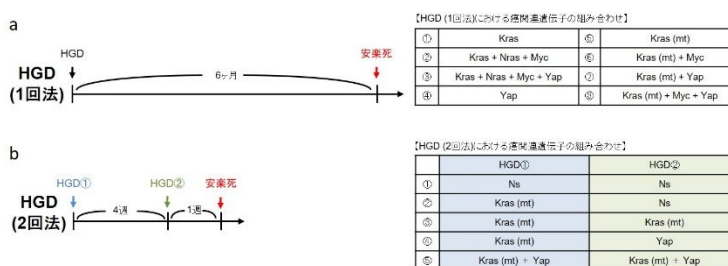
ルシフェラーゼ発現解析、安全性の検証により、体重の 2% 容量の核酸溶液を 1 ml/sec で膵臓選択的に HGD することが最適なパラメーターであった。

(2) 膵発癌に関連する遺伝子群の検証

野生型 *Kras*、変異型 *Kras* を中心とした 8 種類の組み合わせで、膵臓選択的な HGD を施行した。肉眼的には、野生型 *Kras* 中心の組み合わせでは、膵臓に腫瘍形成を疑う所見を認めなかった。変異型 *Kras* 中心の組み合わせのうち、変異型 *Kras*+*Yap* を導入した個体では、肉眼的に膵臓や皮下に腫瘍形成を認めた。組織的には、腺管癌で、著明な間質の増生、線維化を伴っていた (図 3)。免疫染色では、膵原発巣、転移巣ともに Ki67 陽性細胞数の増加と p53、CK7、CK20 染色で陽性を示し、膵癌及びその転移として矛盾しない所見であった。

次に主膵管の腫瘍性変化の検討を行った。HE、MUC5AC、Ki-67 染色で評価すると、*Kras* を含まない *Yap* 単独の個体では、異型上皮を認めなかった。*Kras* と *Yap* の組み合わせでは、異型上皮を認め、とくに変異型 *Kras* では、膵管上皮の異型度が上昇し、Ki-67 および MUC5AC 陽性細胞数

図2 HGDのスケジュールと癌関連遺伝子の組み合わせ



の増加がみられた。

以上より、Kras で発生した膵管上皮内腫瘍性病変に Yap が加わることで、悪性化が促進されると考えられ、変異型 Kras+Yap の組み合わせが、膵癌形成に最適な遺伝子の組み合わせと考えられた。

(3) HGD (2 回法) による発癌期間、悪性度の検証

変異型 Kras を 2 回導入した個体では、主膵管に上皮内癌を認め、Ki-67 陽性細胞数が増加していた。変異型 Kras+Yap を 2 回導入した個体では、HGD 後 5 週で 80% に肉眼的に膵腫瘍が発生した。

組織学的には、acinar-to-ductal metaplasia (ADM) と、それに連続する腺癌と著明な間質増生、線維化を認め、pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) と判断した。同組み合わせでは、HGD 後 8 週以上の長期観察例では、肝転移、皮下転移、播種巣をも認め、組織学的にも悪性度が上昇した。一方、主膵管に上皮内癌を認めたが、周囲に浸潤癌は認めなかった。

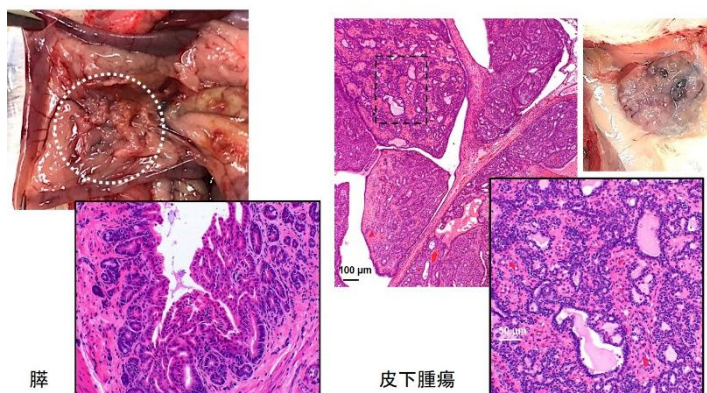
以上より、本モデルで作成された膵癌の由来は腺房細胞と考えられ、また、Yap は膵癌の発生とともに進展に重要な役割を担っていると考えられた。

(4) 腫瘍組織における遺伝子・タンパク発現の検証

腫瘍の悪性転化および転移能の検証のため、Kras および Yap 導入後におけるカドヘリン染色性の検討を行っている。

以上より、膵臓選択的な HGD により膵癌モデルラットが確立できた。簡便性と再現性から、本モデルの分子生物学的な解析に基づき、ヒト膵癌の治療標的決定のための検討が可能になると考えられ、膵癌の早期診断法、新規治療法の開発に寄与すると考える。

図3 HGD (1回法) (変異型Kras+Yap)



< 引用文献 >

1. がん対策情報センター 2009-2011 年統計.
2. Kong K, et al. J Cancer 2020.
3. Kamimura K, et al. Pharm Med 2011.
4. Ogawa K, Kamimura K, Ikarashi S, et al. Mol Ther Nucleic Acids 2017.
5. Chow EK, et al. Hepatology. 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田理、上村顕也、寺井崇二
2. 発表標題 膵臓選択的ハイドロダイナミック遺伝子導入法による新規膵癌モデル動物の確立
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 野生型ラットの膵臓へのヒト膵癌関連遺伝子の導入による膵癌モデル動物の開発と利用	発明者 上村顕也、寺井崇二、柴田理、五十嵐聡	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-102959	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------