

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07416

研究課題名(和文) ヒト膵癌のゲノム異常に基づく膵癌発症モデルマウスの作製と治療応用

研究課題名(英文) Development and therapeutic application of model mice harboring genomic alterations in human pancreatic cancers

研究代表者

泥谷 直樹(Hijiya, Naoki)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：80305036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は最も予後不良な癌の一つで、5年生存率は10%に満たない。その理由として、早期に浸潤癌に進展するため、根治切除術の適応になる症例が少ないこと、既存の抗癌剤が奏功する症例が少ないこと、が挙げられる。したがって、膵癌の治療成績や予後を改善するためには、癌の進展に関わる分子メカニズムを詳細に解明することが必要である。本研究では、ヒト膵癌の発症・進展時に付加される遺伝子異常を導入したヒト膵癌に近いモデルマウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作製されたヒト膵癌のゲノム異常を導入したマウスでは、ヒト膵癌と同様に膵癌前駆病変から浸潤癌への組織学的進展過程が観察される。また、転移・播種巣形成や癌悪液質の発症等についても高頻度にみられることから、膵癌の発症から癌死に至る過程を経時的に観察可能なモデルとなる。このマウスを詳細に解析することで、膵癌の早期診断法や新規治療法の開発につながる知見を得ることが可能となり、膵癌の治療成績の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer (PC) remains a highly lethal disease with the worst prognosis of all solid tumors. The overall survival rate remains poor, only 10% of patients surviving for 5 years for two reasons: First, most the cases are inoperable because they are detected at an advanced stage. Second, only few cases show the effectiveness to current chemotherapy. Therefore, it is necessary to elucidate the molecular mechanism underlying the progression of PC. In this study, we generated pancreatic cancer model mice harboring genetic alterations observed in the human PC carcinogenesis.

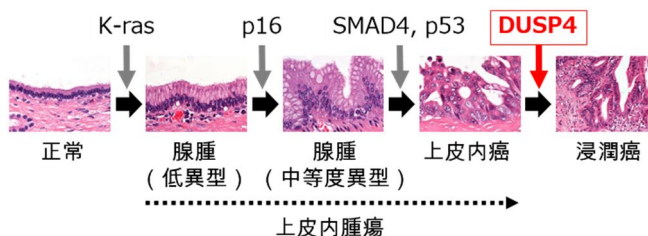
研究分野：分子病理学

キーワード：膵癌 モデルマウス 早期診断法 新規治療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌の前癌病変である Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) や Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN) は、がん遺伝子 k-ras の活性化や、がん抑制遺伝子 p16, SMAD4, p53 などの不活化が逐次蓄積されて上皮内癌に進展する(右図)。しかし上皮内癌から浸潤癌へ進展する分子メカニズムについては不明だった。



私はこのメカニズムを解明するために膵癌の上皮内癌と浸潤癌のゲノム異常を比較検討してきた。その結果、浸潤癌では第 8 番染色体短腕が高頻度に欠失し、DUSP4 遺伝子の発現が抑制されていること、それに伴う MAP キナーゼの恒常的活性化が癌細胞の浸潤能獲得に寄与していることを明らかにした (Hijiya et al. Cancer Res. 2016) (右図)。

(2) ヒト腫瘍で見出されるゲノム異常を導入した腫瘍発症マウスは、ヒト腫瘍の発生・進展過程をモニターできる有用なモデルである。加えて、腫瘍の早期診断法や分子標的薬を含む抗癌治療法の開発、治療抵抗性の評価など臨床応用に直結した疾患モデルになり得る。しかしそのためには、「ヒト腫瘍のゲノム異常を忠実に再現したモデルであるか?」という問いをクリアしなければならない。これまで、膵癌発症マウスはいくつか作製されている。しかしそれらはすべて、腫瘍発生初期に生じる活性型変異 K-ras に加えて、上皮内腫瘍の発生過程で付加される p16 や Smad4、p53 のいずれかの遺伝子異常を合併したマウスである。つまり上皮内腫瘍で存在しているゲノム異常のみで浸潤癌のモデルを構築しようとしている。私は本研究で、ヒト膵癌により近いモデルの作製を目指す。そのために、私が同定した浸潤に関わる責任遺伝子である Dusp4 を欠失させたモデルマウスを作製する。

2. 研究の目的

(1) 膵上皮内腫瘍の発症に関わる活性型変異 K-ras や変異 p53 に加えて、上皮内癌から浸潤癌への進展に関与する Dusp4 の欠失を付加した膵癌発症マウスを作製して、膵癌の発症・進展過程を解析する。

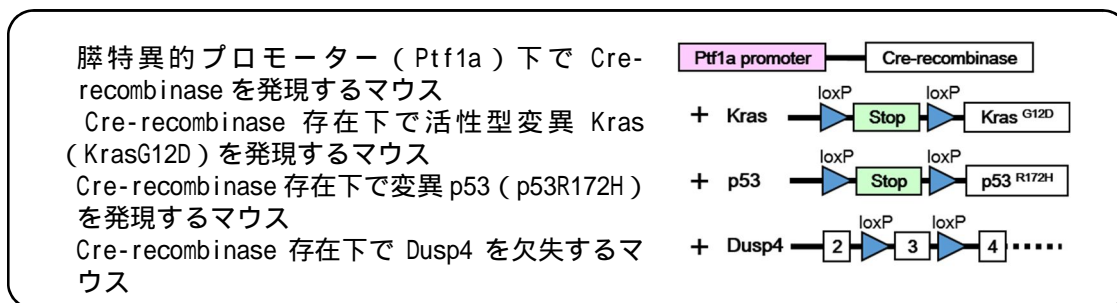
(2) このマウスを用いて膵癌の発症・進展過程を詳細に解析することにより、発症早期に血中濃度が上昇するバイオマーカーを抽出し、新規の早期膵癌診断法の開発につなげる。

(3) 上皮内腫瘍が浸潤癌に進展する過程で活性化するシグナル伝達経路を同定して、その経路上に存在する分子群の中から治療標的となり得る分子を抽出することで、膵癌に対する新規分子標的治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 膵癌発症マウスの作製

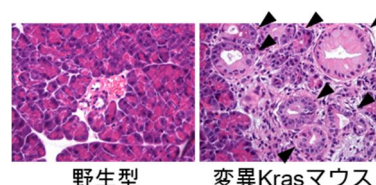
ヒト膵癌を模倣した膵癌発症マウスは以下の遺伝子改変マウスを交配して作製する。



- とも C57BL/6 由来の純系マウスで、それぞれ Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC)、Jackson Laboratory、National Cancer Institute (NCI)、The European Mouse Mutant Archive (EMMA) より入手済みである。

とを交配したマウス (膵特異的変異 Kras 発現マウス) では、既存の報告と同様にヒトの PanIN に類似した前癌病変 (右図黒矢頭) の形成を認めた。

このマウスにさらに および をかけ合わせることで、ヒト膵癌の遺伝子異常を合併した膵癌発症マウスを作製する。



(2) 膵癌発症マウスの解析

【組織学的解析】

下記3種類の遺伝子改変マウスを作製して、組織学的変化を経時的に観察する。

- + (膵特異的変異 Kras 発現マウス)
- + + (膵特異的 Kras 発現 + 変異 p53 発現マウス)
- + + + (膵特異的変異 Kras 発現 + 変異 p53 発現 + Dusp4 欠失マウス)

生後4週から18か月までの各時期において、適切な方法で屠殺後、膵臓を含む各臓器を採取して、一部を凍結保存、残りをホルマリン固定する。組織標本を作製して、前癌病変や浸潤癌の形成の有無と、腫瘍面積比、悪性度、転移巣の有無等について、野生型マウスを対照として比較検討する。解剖時に浸潤癌を示唆する腫瘤性病変を認めた場合は、腫瘤片を採取・分散して癌細胞株の樹立を試みる。観察期間中に死亡したマウスについては適宜解剖して膵臓の組織学的検索と死因究明に努める。

【末梢血・血清学的解析】

上記の組織学的解析に用いたマウスから採取した血液を用いて血液生化学検査を施行した後、凍結保存する。評価項目は以下の通りである。

赤血球・白血球数及び細胞分画、一般血液生化学、血糖値、インスリン濃度

また、血液から血漿およびエクソソームを回収して、それぞれメタボローム解析および micro RNA 発現解析に備える。

【パスウェイ解析と治療標的の同定】

前癌病変および浸潤癌の凍結標本から腫瘍細胞を Laser Capture Microdissection (LCM) で選択的に回収し、RNA を抽出して網羅的発現解析を施行する。得られたデータをパスウェイ解析 (Ingenuity Pathway Analysis) することで、浸潤癌で特異的に活性化しているシグナルパスウェイを同定する。その中から治療標的となり得る分子を抽出する。もし既に阻害薬あるいは分子標的薬が存在する分子があれば治療の標的分子候補とする。

4. 研究成果

(1) 膵特異的変異 Kras 発現マウス (+ マウス)

すでに100匹以上のマウスを得ており、生後1年以上経過観察している。膵臓に生じた腫瘍組織を経時的に採取して病理学的解析を施行したところ、解析したすべての個体において、生後4週からヒトの PanIN に類似した前癌病変の発症を認めた。そのうち8例では、上皮内癌から浸潤癌に進展した組織像を散在性に認めたが、るいそうや活動性低下等の癌悪液質に起因する全身症状を呈する個体は観察されなかった。

このことから Kras の変異のみでは膵癌の発症には不十分で、さらなる遺伝子異常の付加が必要であることがわかった。

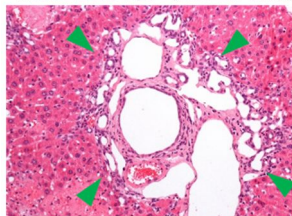
(2) 膵特異的 Kras 発現 + 変異 p53 発現マウス (+ + マウス)

研究期間中に約40匹の個体を得た。生後1年以上経過観察している。病理組織学的解析の対象としたすべての個体において、生後2ヵ月時点で上皮内癌の発症を認めた。さらに、多くの個体で生後6ヵ月以内に浸潤癌への進展が観察され(下左図)、約半数の個体は悪液質症状を呈して癌死に至った。組織学的解析により、腫瘍は低分化型腺癌が多く、一部の個体では中分化～高分化型を呈していた。30%の個体で肝臓や肺への微小な播種・転移巣を認めた(下中・右図)。3例について摘出した腫瘍組織から細胞株の樹立に成功した。これらの細胞株は元の腫瘍の組織型と類似していた。これらを同系統の C57BL/6 マウスに皮下移植したところ、1週間以内に皮下腫瘤を形成した。さらに3週間で皮下の筋層を貫通して後腹腔まで浸潤した。以上の結果は、マウスでは Kras の活性型変異と p53 の機能消失型変異により高率に膵癌が発症・進展することを示唆しており、これまで文献で報告されている内容を支持していた。

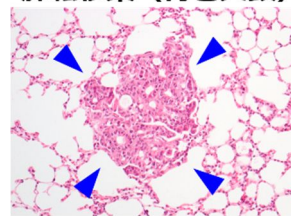
発症した膵癌 (黄色矢頭)



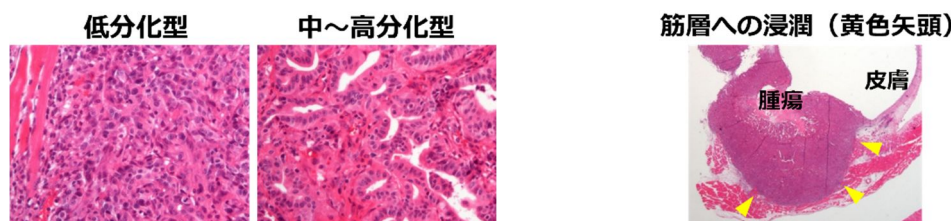
肝肺転移巣 (緑色矢頭)



肺転移巣 (青色矢頭)



(3) **膵特異的変異 Kras 発現 + 変異 p53 発現 + Dusp4 欠失マウス (+ + + マウス)**
 約 30 匹の個体を得た。 + + マウスと同様に、生後 2 ヶ月時点で上皮内癌の発症を認めた。ほとんどの個体が 3~6 ヶ月以内に浸潤癌に進展し、癌悪液質症状を呈した。突発的に癌死に至るマウスも認め、急激な癌の増殖と周囲臓器への侵襲に伴うものと考えた。組織型は + + マウスと同様に低分化型腺癌が多く、一部の個体では中分化~高分化型を呈していた(下左図)。ほぼすべての解剖例で腸間膜や肺への播種・転移を認めた。3 例について摘出組織から細胞株の樹立に成功した。これらは、 + + マウスの腫瘍から樹立した細胞株と同様に、同系統の C57BL/6 マウスに移植可能であり、高度の増殖能と組織侵襲性を示した((下右図))。1 週間以内に皮下腫瘍を形成した。さらに 3 週間後後腹膜腔に浸潤した。Kras の活性化変異と p53 の機能消失型変異に Dusp4 の欠失を付加することで、より悪性度の高い膵癌を発症するマウスモデルを構築できた。



(4) **各種マウスの末梢血・血清学的解析結果**

上記の 3 系統のマウスとも赤血球数や白血球数および細胞分画については、野生型マウスとの違いはみられなかった。血糖値は、特に + + および + + + マウスで有意な低下がみられた。いずれのマウスも組織学的に膵実質の著明な線維化が観察されたことから、膵機能低下に伴う糖分吸収障害と、悪液質の一症状である食欲不振に起因するものと考えた。インスリン濃度については現在解析中である。一般血液生化学に関しては、生後 4 週までは明らかな変化はなかったが、癌悪液質症状を呈するようになった時点で電解質異常を認めた。食餌摂取量および飲水量減少に伴う脱水によるものと考えた。

(5) **パスウェイ解析と治療標的の同定**

野生型マウスの膵組織および上記の 3 系統のマウスの膵腫瘍から RNA を回収して、網羅的発現解析を施行した。現在、解析データを用いてパスウェイ解析を施行しているところである。今後マウス膵癌で活性化しているパスウェイを抽出して、治療標的となり得る分子の同定を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakada C, Hijiya N, Tsukamoto Y, Yano S, Kai T, Uchida T, Kimoto M, Takahashi M, Daa T, Matsuura K, Shin T, Mimata H, Moriyama M.	4. 巻 251
2. 論文標題 A transgenic mouse expressing miR-210 in proximal tubule cells shows mitochondrial alteration: possible association of miR-210 with a shift in energy metabolism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pathol.	6. 最初と最後の頁 12-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ratsada P, Hijiya N, Hidano S, Tsukamoto Y, Nakada C, Uchida T, Kobayashi T, Moriyama M.	4. 巻 528
2. 論文標題 DUSP4 is involved in the enhanced proliferation and survival of DUSP4-overexpressing cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 586-593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirashita T, Hirashita Y, Iwashita Y, Endo Y, Kiyonaga M, Matsumoto S, Hijiya N, Moriyama M, Murakami K, Inomata M.	4. 巻 4
2. 論文標題 S6 ribosomal protein phosphorylation is associated with malignancy of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg	6. 最初と最後の頁 571-579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamei N, Yamada Y, Hijiya N, Takaji R, Kiyonaga M, Hongo N, Ohta M, Hirashita T, Inomata M, Matsumoto S.	4. 巻 44
2. 論文標題 Invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: relationships between mural nodules detected on thin-section contrast-enhanced MDCT and invasive components.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Abdom Radiol	6. 最初と最後の頁 3139-3147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00261-019-02084-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakada C, Hijiya N, Tsukamoto Y, Yano S, Kai T, Uchida T, Kimoto M, Takahashi M, Daa T, Matsuura K, Shin T, Mimata H, Moriyama M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 A transgenic mouse expressing miR-210 in proximal tubule cells shows mitochondrial alteration: possible association of miR-210 with a shift in energy metabolism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pathol	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高司 亮, 山田 康成, 清永 麻紀, 松本 俊郎, 平下 禎二郎, 太田 正之, 猪股 雅史, 泥谷 直樹	4. 巻 64
2. 論文標題 【腹部の最新画像情報2019】術前画像診断に苦慮した膵 invasive intraductal papillary mucinous carcinomaの1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床放射線	6. 最初と最後の頁 915-919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18888/rp.0000000921	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 泥谷 直樹
2. 発表標題 胆道・膵臓腫瘍の遺伝子異常と病理診断 膵癌の進展に関わるゲノム異常とシグナルパスウェイ
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒木 秀作, 泥谷 直樹, 塚本 善之, 中田 知里, 猪股 雅史, 小林 隆志, 守山 正胤
2. 発表標題 ZNF395の発現低下は膵癌の増殖能亢進と進展に寄与する
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 一万田 充洋, 泥谷 直樹, 赤木 智徳, 白下 英史, 衛藤 剛, 猪股 雅史, 守山 正胤
2. 発表標題 大腸癌におけるDUSP4発現変動の意義
3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------