

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590804

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた膵癌の起源細胞の同定

研究課題名(英文) Approaching the cell of origin for pancreatic ductal adenocarcinoma by using genetically-engineered mice

研究代表者

伊地知 秀明 (IICHI Hideaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70463841

研究成果の概要(和文)：我々は *Ptfla-cre* を用いた膵臓上皮特異的な *Kras* 活性化+*TGF-beta* II 型受容体ノックアウトというマウスモデルを既に樹立し報告している。このモデルでは膵臓に著明な間質の増生・線維化を伴う分化型の ductal adenocarcinoma が生じ、ヒト膵癌の組織像をよく近似していた。ただし、全膵臓上皮における胎生期からの遺伝子改変というデザインであり、膵臓全体が腫瘍化し、膵癌の起源細胞については不明であった。そこで本研究では、膵臓の前駆細胞での発現が知られている *Nestin* 遺伝子のプロモーター下にタモキシフェンにより遺伝子改変を誘導するシステムを用い、成熟期のマウスにおいて *Nestin* 陽性細胞特異的に *Kras* の活性化と *TGF-beta* II 型受容体のノックアウトが生じるマウスを作製した。今回のモデルでは、膵臓内に限局的に前癌病変～ductal adenocarcinoma が生じた。これは、先行する全膵臓腫瘍化モデルに比べ、より臨床に近い状況で発癌するモデルと考えられ、また成熟期の膵臓における *Nestin* 陽性細胞が通常型膵癌の起源細胞となり得ることが実験的に証明されたといえる。

研究成果の概要(英文)：We have already established a genetically-engineered mouse model containing pancreas epithelium-specific *Kras* activation and *TGF-beta* type II receptor knockout. This model develops differentiated pancreatic ductal adenocarcinoma with abundant stroma including marked fibrosis (desmoplasia), which recapitulates histological features of human pancreatic cancer very well. However, this model cannot approach the cell of origin for pancreatic ductal adenocarcinoma because every pancreatic epithelium possesses genetic alterations described above and an entire pancreas is rapidly occupied by the tumor. In this study, by using Tamoxifen-inducible cre-loxP system driven by *Nestin* promoter, a new mouse model of adult-onset, *Nestin*-positive cell-specific *Kras* activation plus *TGF-beta* type II receptor knockout was established. *Nestin* is known to be expressed in pancreatic progenitor cells. This mouse developed focal pancreatic ductal adenocarcinoma as well as pre-cancer lesions, which is considered as a closer approximation of human pancreatic carcinogenesis compared with the former models. This study proves that *Nestin*-positive cells in the adult pancreas can be the cells of origin for pancreatic ductal adenocarcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵癌、遺伝子改変マウス、起源細胞、Nestin-creER、Kras、TGF-beta、Tamoxifen-inducible

1. 研究開始当初の背景

最難治癌である膵癌患者の予後改善のためには、その病態の理解を深めることが必要不可欠である。

近年がんにおいても正常組織と同様に自己複製能と多分化能を有するがん幹細胞を頂点とする階層構造が存在すると考えられるようになり、固形腫瘍においても癌幹細胞は注目を集めている。癌幹細胞は cancer initiating cell とも定義される。

通常型膵癌が膵臓のどの細胞系統 (acinar, duct, islet cell) に由来するのかについては、その表現型が ductal adenocarcinoma (DAC) であることから、臨床的には以前より duct cell 由来と考えられてきた。近年遺伝子改変マウスモデルは著明な進歩を遂げ、我々のモデルも含め、ヒト膵癌に似た DAC を呈するモデルが報告されてきた (Hingorani, Cancer Cell 2003;4:437, Aguirre, Genes Dev 2003;17:3112, Hingorani, Cancer Cell 2005;7:469, Bardeesy, PNAS 2006;103:5947, Ijichi, Genes Dev 2006;20:3147)。しかし、これらのモデルは全膵臓上皮に胎生期より遺伝子改変が生じるため、膵癌の起源に対する回答は得られない。

これらの中で、我々の樹立したモデル *Ptf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tgfbr2^{fl/fl}* は、未分化な腫瘍の混在のない分化型 DAC を呈すると共に、著明な間質の増生・線維化 (desmoplasia) も伴っており、ヒト膵癌の組織型を最もよく近似するモデルであった。

一方、*Nestin-cre;LSL-Kras^{G12D}* というモデルにより、Nestin 陽性細胞に活性型 Kras が発現すると前癌病変様の変化が生じることが示され、膵臓における Nestin 陽性細胞が、膵癌の起源となり得ることが示された (Carriere, PNAS 2007;104:4437)。もっとも、この Kras 変異のみのモデルでは浸潤癌は得られていない。

2. 研究の目的

Nestin 陽性細胞特異的に成熟期から Kras 活性化と TGF-beta II 型受容体ノックアウトを起こす遺伝子改変マウスを作製し、成熟期の膵臓における Nestin 陽性細胞が膵癌の起源細胞となり得るかを検討する。

3. 研究の方法

ヒト膵癌の組織像をよく近似する遺伝子改変の組み合わせ Kras 活性化 + TGF-beta II 型

受容体ノックアウトを、Nestin 陽性細胞特異的にタモキシフェン誘導性に起こさせるために、*Nestin-creERT2*、*LSL-Kras^{G12D/+}*、*Tgfbr2^{fl/fl}* という 3 ラインのマウスを交配し、*Nestin-creERT2;LSL-Kras^{G12D/+};Tgfbr2^{fl/fl}* という遺伝子型のマウスを作製した。

このマウスに対し、生後 8 週以後にタモキシフェン 200 mg/kg を 3 日間連続で腹腔内投与し、成熟期に遺伝子改変を開始させ、さらに 10 週後に安楽死させ、その表現型を解析した。解析には H&E 染色・アルシアンブルー染色による組織学的検索と CK-19, Hes1, phospho-ERK, Nestin の免疫染色を用いた。

また *Nestin-creERT2;ROSA26r* というマウスも作製し、生後 8 週以後に同様にタモキシフェン 200 mg/kg を 3 日間連続腹腔内投与し、1 週後に安楽死させ、X-gal 染色により Nestin 陽性細胞の分布を検討した。

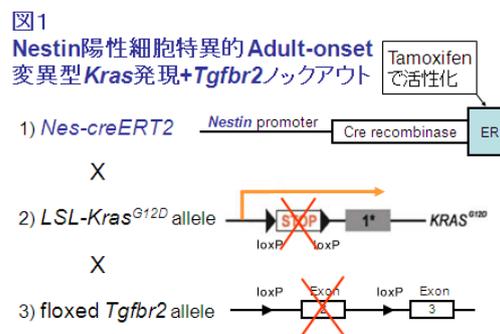
ヒト膵癌手術検体を用い、Nestin の免疫染色を行った。

なお、手術検体を用いた検討は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会により承認された研究計画に基づき同意の得られた患者の検体を用いて行った。マウスを用いた検討は、東京大学大学院医学系研究科・医学部動物実験委員会により承認された研究計画に基づいて行われた。

4. 研究成果

1) *Nestin-creERT2;LSL-Kras^{G12D/+};Tgfbr2^{fl/fl}* マウスの作製

Nestin-creERT2 マウスは、京都大学ウイルス研究所の影山龍一郎教授よりいただいた。これと *LSL-Kras^{G12D/+}*、*Tgfbr2^{fl/fl}* の各ラインを交配し、*Nestin-creERT2;Tgfbr2^{fl/fl}* マウス (NF) と *LSL-Kras^{G12D/+};Tgfbr2^{fl/fl}* マウス



目的の *Nestin-creERT2;LSL-Kras^{G12D/+}; Tgfbr2^{fl/fl}* マウス(NKF)を得た(図 1)。また、これと並行して *Nestin-creERT2;LSL-Kras^{G12D/+}* マウス(NK)も作製した。

2) *Nestin-creERT2;LSL-Kras^{G12D/+}; Tgfbr2^{fl/fl}* マウス成熟期におけるタモキシフェン投与による表現型の解析

上記 NKF マウス、NF マウス及び NK マウスが生後 8 週齢以降の成熟期に達したときにタモキシフェン 200 mg/kg の腹腔内投与を 3 日間連続で行い、遺伝子改変を誘導した。

タモキシフェン誘導後 10 週経過した時点で各マウスを安楽死させ、その表現型を解析した。

マウスの解剖時の肉眼所見では、NF マウス及び NK マウスでは特に異常を認めず、NKF マウスでは膵頭部に結節を認めるもの、皮膚に腫瘍を認めるもの、胃噴門部に腫瘍を認めるものが存在した。脳には肉眼的には粗大な異常を認めなかった。

H&E 染色にて膵、胃～食道、皮膚の組織像を観察したところ、NF マウスには明らかな異常はみられなかったのに対し、NK マウスでは、膵臓のごく一部に low grade の前癌病変 mPanIN(mouse pancreatic intraepithelial neoplasm)様病変を認めた。一方、NKF マウスでは、11 匹の解析中 8 匹において mPanIN～DAC までの病変を認めた (73%)。先行する全膵臓腫瘍化モデルに比べ、腫瘍の出現は非常に focal であり、acinar-ductal metaplasia は目立たなかった。また、腫瘍は分化型の ductal adenocarcinoma であり、間質の増生も伴い、ヒトの膵癌組織をよく近似した像を呈していた。

この膵腫瘍についてアルシアンブルー染色を施行したところ、NK マウスの mPanIN 様病変、NKF マウスの mPanIN 様病変～DAC いずれも青色の染色性を示し、腺管からの粘液の産生が証明された。さらに各種免疫染色を施行し、CK-19 陽性ということから ductal phenotype であることが証明された。ヒト膵癌と同様にリン酸化 ERK が核内に強く染色され、MAPK カスケードの活性化が mPanIN の段階から見られ、DAC ではそれがより顕著であった。また膵癌の早期発癌過程でみられる Notch シグナルの活性化が、Hes1 の核内染色によりこのマウスモデルでも示された。以上から、ヒトの膵癌の発癌過程に関与すると考えられる分子の挙動も本モデルにおいて同様に見られ、本モデルは、Adult-onset であり、かつ focal に腫瘍が発生してくるという状況も併せ、ヒトの膵発癌過程をよく模倣していると考えられた。

また NKF マウスでは、皮膚腫瘍

(squamous cell carcinoma) を 5/11 に認め (45%)、胃噴門部には粘膜下層に主座をおく adenosquamous carcinoma 様の腫瘍を 6/11 (55%) に認め、このデザインでは膵外の表現型も示すことがわかった。

3) *Nestin-creERT2;ROSA26r* マウス成熟期におけるタモキシフェン投与による Nestin 陽性細胞の検出

ROSA26r マウスは、Mt. Sinai School of Medicine の Phillip Soriano 博士からいただいた。これを *Nestin-creERT2* マウスと交配し、*Nestin-creERT2;ROSA26r* マウス(NR)を得た。NR マウスに対し、その生後 8 週齢以降の成熟期にタモキシフェンを同様に投与し、その 1 週後に安楽死させ、膵臓、胃噴門部、皮膚及び脳における Nestin 陽性細胞の分布を X-gal 染色にて解析した。Nestin 陽性細胞は、膵臓では膵臓の一断面全体のうちごく僅かの腺房細胞及びランゲルハンス氏島内の内分泌細胞に認められたのみであり、今回の観察範囲内では腺管細胞における明らかな発現は認められなかった。既報にあるように間質(血管壁)に陽性細胞が見られた。一方、胃噴門部においては胃食道接合部の角化上皮に陽性となり、また皮膚では毛根部に陽性となった。脳では subventricular zone に既報通り陽性となった。この検討はまだ繰り返す必要がある、またタモキシフェンによる誘導後の経時的な変化の追跡も加えることが必要と考えている。

4) ヒト及びマウス膵癌組織における Nestin 発現の解析

当院における膵癌手術検体及び NKF、NK マウス、そして先行の全膵臓腫瘍化マウスの膵臓組織を用いて Nestin の免疫染色を行った。抗体の特性にもよる可能性があるが、マウス組織においては腫瘍上皮における Nestin の染色性はほぼ陰性という結果であり、血管内皮での陽性が目立った。ヒト膵癌組織では膵臓上皮での染色性も強く、膵癌細胞はほぼ全て陽性となる結果となった。非癌部の内分泌細胞での染色性が弱かった。

In vitro の研究では、Nestin は癌細胞の浸潤性を上げる作用があるという報告もあり、今回のマウス膵癌ではまだ発現が弱かったものの、癌の進展に伴い Nestin の発現が増強してくるという可能性もあるかもしれない。

以上をまとめると、成熟期の膵臓の Nestin 陽性細胞に Kras の活性型変異と TGF-beta シグナルのブロックが生じると、その細胞を起源とし、ヒトの膵癌発癌過程をよく模倣した focal な発癌が生じ、ヒト膵癌同様の間質の増生を伴った分化型 ductal adenocarcinoma

が生じることがわかり、Nestin 陽性細胞が膵癌の起源細胞となり得ることが証明された。

膵臓の Nestin 陽性細胞の性質については、更なる詳細な検討を要する。従来 Nestin は前駆細胞に発現すると報告されてきた。今回成熟期のワンポイントでの検討では、その数は膵臓内にごく僅かしか存在せず、ただし腺房細胞やランゲルハンス氏島内にも陽性となり、やはり完全に分化する前の状態の細胞なのであると推測する。さらなる検討により膵癌幹細胞の性質にもアプローチできると考える。

また Nestin は膵臓以外にも発現するため、その分布に従って膵外の表現型も呈する。したがって、本モデルは膵癌の発癌過程の検討には非常に適していると考えられるが、膵癌の自然経過全体の検討の上では、膵外病変が予後等に影響する可能性を考慮する必要がある。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

伊地知秀明 遺伝子改変マウスを用いた膵癌起源細胞へのアプローチ、第18回浜名湖シンポジウム、新浜松、12月25-26日、2010

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊地知 秀明 (IJICHI Hideaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70463841

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：