

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591630

研究課題名 (和文)

新規遺伝子改変マウスにおける Wee1 遺伝子の膵発癌への関与とその臨床的意義

研究課題名 (英文) Participation of Wee1 gene to carcinogenesis of the pancreatic cancer in new genetically-modified mouse and clinical implications of Wee1 gene

研究代表者

富永 洋平 (TOMINAGA YOHEI)

九州大学・医学研究院・特任講師

研究者番号：90304823

研究成果の概要 (和文)：我々は、膵癌細胞株を用いて、細胞周期での G2M checkpoint の制御に関与する Wee1 遺伝子の発現解析を行い、正常膵上皮細胞株と比較して、膵癌細胞株において Wee1 遺伝子の発現が増強していることを示した。また、ヒト膵癌切除組織より採取した正常膵組織および癌組織を用いた Wee1 蛋白の発現解析を免疫染色法にて行い、正常膵組織においては Wee1 蛋白発現は認めず、膵癌組織の 25.5% (13/51 例) において発現していることを示した。しかし、膵癌組織において Wee1 (+) 群と Wee1 (-) 群において臨床組織学的特徴の統計学的解析を行ったが、TNM 分類、UICC stage、Histologic grade、Residual tumor category すべての項目において統計的有意差は認められなかった。Wee-1 (+) 群と Wee-1 (-) 群で、Overall survival、Disease free survival の差も認められなかった。以上の結果より、Wee1 遺伝子の膵癌における発現を確認できたが、Wee1 遺伝子単独の発現レベルは、臨床病理学的な所見と相関するものではなく、その機能は、他の分子との相互作用により働くものと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：WEE1 mRNA expression in pancreatic cancer cell lines is higher than that in HPDE cells. Six normal pancreas tissues and 51 PDAC samples were analyzed by immunostaining. We did not find any significant association between WEE1 expression and various clinicopathologic factors in patients with pancreatic cancer. There was no difference in overall survival and disease free survival between WEE1-positive and WEE1-negative groups. Unfortunately, we did not recognize the clinical implications of Wee1 gene to the pancreatic cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓外科学、膵癌、細胞周期

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は癌死の 5 位を占めながら現在でも 100 人中 3 人しか根治しない疾患であり、その治療法および診断法の開発は、社会的要請度・貢献度・緊急性が高い。この膵癌の治療向上のためにも発癌のメカニズムを明らかにすることは、重要である。膵癌の発癌には、遺伝的不安定性が関与していることがヒトの膵癌組織や培養細胞の研究結果により示されている。特に Wee1 蛋白質が、細胞周期での G2M checkpoint の制御に関与し、Wee1 遺伝子の欠損する細胞では、G2M checkpoint を欠き、遺伝的安定性を失うことが示されている。Wee1 ノックアウトマウスは、胎生の 3.5 日で DNA の複製が完全に終了する前に M 期に移行するため、DNA 鎖の切断及び遺伝的安定性を失い、アポトーシスに至る。更にノックアウトマウスから作製した培養細胞の実験で Wee1  $-/-$  細胞では G2M checkpoint が、失われることを示した。以上の事象より、G2M checkpoint に関与する Wee1 遺伝子は、膵癌の発癌に深く関わっており、新規の膵癌におけるがん抑制遺伝子の可能性がある。さらには、膵癌の診断、治療効果予測、治療効果判定の新規の指標、または、治療標的としての可能性も秘めており、今後の解析が期待されている。

## 2. 研究の目的

膵臓に特異的にノックアウトをもたらず、Pdx1-cre トランスジェニックマウスと、既に我々が作製した Wee1 コンディショナルマウスを交配し、膵臓特異的に Wee1 を欠失したマウスを作製する。本検討により、膵発癌過程における Wee1 遺伝子の役割を明らかにする。さらに、手術標本を用いて、ヒト膵癌組織を対象に Wee1 遺伝子の発現解析を行い、ヒト膵発癌における Wee1 遺伝子の関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Wee1 co/co Pdx1-Tg マウスの作製

Wee1 co/co マウスと Pdx1-Tg マウスを交配し、Wee1 co/+ Pdx1-Tg マウスを得る。次いで、数ペアの Wee1 co/+

Pdx1-Tg マウス同士を交配し、Wee1 co/co Pdx1-Tg マウスとコントロール用の Wee1 +/+ Pdx1-Tg マウスを作製する。作成したマウスの膵臓及びコントロール用の臓器より、ゲノム DNA を抽出し、Wee1 遺伝子が膵臓で特異的に欠損するかを確認する。

(2) Wee1 co/co Pdx1-Tg マウスの膵臓の状態の肉眼的、病理学的観察

6 カ月から 1 年令の数匹のマウスを使用して、膵臓を摘出し、HE 染色で、前癌病変 (PanINs) の有無を確認する。膵腫瘍が発生した組織の RNA 及び蛋白質を、qRT-PCR 法、ノーザンブロット法、ウェスタンブロット法などにより、Wee1 遺伝子の有無、及び他の膵臓の発がんに関与する分子群を解析し、Wee1 遺伝子欠損の場合の発がんのメカニズムを解析する。

(3) 癌切除バルク組織を用いたヒト膵癌組織における Wee1 遺伝子 mRNA 相対定量解析

当研究室にストックしてあるそれぞれ 50 検体以上の膵癌組織と正常膵組織のバルク組織から total RNA をキアゲンの組織用 RNA 抽出キットを用いて抽出した。Wee1 遺伝子 mRNA 発現を quantitative real time RT-PCR にて行った。

(4) マイクロダイセクションサンプルにおける mRNA 相対定量解析

切除後即時に液体窒素にて凍結保存した手術切除組織を Palm 社の LMPC (laser microdissection & pressure catapulting system) を用いてマイクロダイセクションを行った。RNA 抽出は PicoPure TM RNA isolation kit にて行い、その quality を Bioanalyzer にて評価後、Wee1 遺伝子 mRNA の相対的定量解析を行った。

(5) ヒト膵癌細胞・初代培養膵管上皮細胞を用いた RNAi 等による機能解析

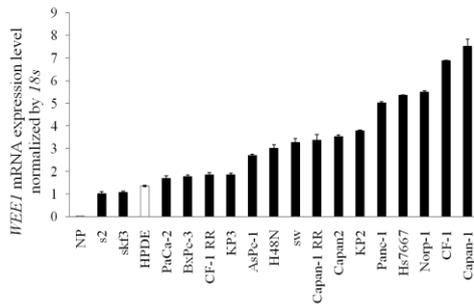
Wee1 遺伝子をターゲットにした siRNA 作成し、初代培養膵管上皮細胞に導入することにより、抑制実験を行い、その機能を解析する。また、腫瘍形成性を評価するため NOG マウス (新規免疫不全マウス) を用いて、移植実験をおこなう。

## 4. 研究成果

(1) 膵癌細胞株を用いて、Wee-1 遺伝子発現を解析した。正常膵上皮細胞株に

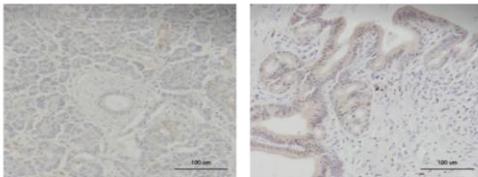
比べて、膵癌細胞株において Wee-1 遺伝子発現は増強していた。

WE E1 expression in pancreatic cancer cell lines



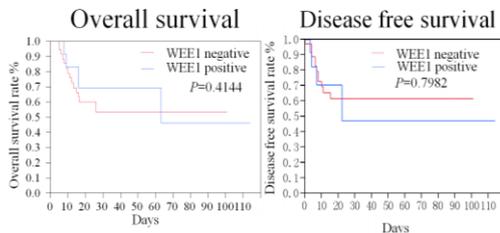
(2) 癌切除バルク組織より正常膵部位と癌組織部位を採取し、Wee-1 の免疫組織染色を行った。正常膵組織は Wee-1 の発現は認められなかった。一方、癌組織の Wee-1 蛋白発現は全染色サンプル数 51 例のうち 13 例 (25.5%) において Wee-1 発現を認めた。

WE E1 negative staining in normal pancreatic duct WE E1 positive staining in PDAC samples



(3) Wee-1 発現と膵癌の臨床組織学的所見の統計学的を評価を行ったが、統計学的優位差は認めなかった。

(4) Wee-1 (+) 群と Wee-1 (-) 群で、Overall survival、Disease free survival の差も認められなかった。



以上のように、膵癌組織における Wee-1 蛋白の発現の解析を行ったが、それ単独の発現レベルだけでは、膵癌における Wee-1 遺伝子の重要性を示唆する結果は認められなかった。

Relationship between WE E1 expression and various clinicopathologic factors in patients with pancreatic caner (n=51)

Characteristics	WE E1 expression		P
	Positive (n=13, 25.5%)	Negative (n=38, 74.5%)	
Age			0.9396
≥65 y	7	20	
<65 y	6	18	
Sex			0.5528
Male	7	24	
Female	6	14	
pT category			0.0386
pT1/pT2	4	3	
pT3/pT4	9	35	
pN category			0.6129
pN0	4	9	
pN1	9	29	
UICC stage			0.118
1	3	2	
2	10	33	
3/4	0	3	
Histologic grade			0.3412
G1	3	3	
G2	2	7	
G3	8	28	
Residual tumor category			0.5399
R0	11	27	
R1	2	9	
R2	0	2	
lymphatic invasion			0.4225
ly0/1	11	28	
ly2/3	2	10	
vascular invasion			0.1588
v0/1	12	28	
v2/3	1	10	
Recurrence			0.396
+	10	33	
-	3	5	

## 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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富永 洋平 (TOMINAGA YOHEI)

九州大学・医学研究院・特任講師

研究者番号：90304823

(2)研究分担者

永井 英司 (NAGAI EISHI)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30264021

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)

九州大学・医学研究院・客員助教

研究者番号：20452708

(3)連携研究者

なし