

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791291

研究課題名（和文） ヒト膵発癌を再現する遺伝子改変マウスを用いた早期膵癌マーカーの探索と治療法の開発

研究課題名（英文） Chronic pancreatitis triggers factors promoting pancreatic cancer development in genetically engineered mouse model

研究代表者

大村谷 昌樹（OHMURAYA MASAKI）

熊本大学・大学院先導機構・特任助教

研究者番号：60398229

研究成果の概要（和文）：本研究課題では慢性膵炎モデルマウスを樹立し、慢性炎症から癌に移行する過程でどのような現象が起きているのかを明らかにする。（方法）慢性膵炎モデルマウスの樹立には Spink3+/-マウスを用いた。まず CAG プロモーター下にヒト SPINK1 遺伝子をつなぎ（SP1）、マウス ES 細胞の X 染色体に置換してマウスを樹立した。このマウスと Spink3+/-を交配した。（結果）出生直後の Spink3-/-; X; SP1/+では正常な腺房細胞と著しい変性を生じた腺房細胞がモザイク状に混在していた。このマウスは膵全体の萎縮、腺房細胞の脱落、膵実質の線維化が顕著であり、ヒト慢性膵炎を再現していた。さらに拡張した膵管の上皮に過形成が見られ、ヒト膵癌の前癌病変と酷似していた。膵発癌の initiation に必須とされる Egfr、Her2、Ras の異常発現も確認された。

研究成果の概要（英文）：The mutations of serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) are associated with chronic pancreatitis (CP). We previously showed that deletion of Spink3, the mouse homologue of SPINK1, causes pancreatitis-like changes in the mouse. The aim of this study was to rescue the Spink3-/- phenotype by generating Spink3-/- mice with knockin SPINK1. (Methods) We placed CAG-SPINK1 gene (SP1) into X chromosome. X-inactivation is a process whereby one of the two copies of the X chromosome present in female mammals is inactivated. By utilizing X-inactivation, we were able to create mice in which SPINK1 level was partially, but not completely, reduced. The SP1 knockin mice were crossed to Spink3+/- mice. (Results) The pancreas of Spink3-/-XSP1/+ mice at birth contained both normal and degenerated acinar cells, with accumulation of autophagic vacuoles. The Spink3-/-XSP1/+ mice developed pathologic features of human CP, including loss of acinar cells and fibrosis with activated stellate cells. Older mice displayed acinar-ductal metaplasia and prominent expression of proto-oncogenes Egfr, Her2, and Ras. (Conclusions) The results indicate that CP trigger factors promoting pancreatic cancer development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

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、遺伝子改変マウス、慢性膵炎モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

近年、癌発生・進展の分子機構に基づいた診断法や治療法が脚光を集めているが、膵癌においても予後を改善する有効な分子マーカーや分子治療の標的を発見し、早期における発見方法や治療法の開発につなげるのが急務である。膵癌発生・進展の詳細な分子機構の解析が不可欠であるが、そのためにはヒト膵発癌過程を忠実に再現するモデル動物が不可欠である。

膵癌の前癌病変PanIN

膵癌の発生母地については、膵管上皮細胞がその起源として受け入れられ、膵癌発生は *de novo* 型発癌よりも、膵管の過形成から異型過形成を経て膵癌に至るとする段階的発癌説が支持されている。Hruban らは膵管異型上皮病変を膵上皮内腫瘍性病変pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) と定義し、このPanIN を経て浸潤性膵管癌が発生するモデルを提唱している。PanINと浸潤性膵管癌の分子異常を解析すると、異型の高度化に伴ってEGFRやKRAS、INK4A、P53などの遺伝子異常が順に蓄積していくことが知られている。現状では早期の膵癌と診断されても、確実に根治する治療法はなく、“基底膜の破綻のない”後期PanIN (PanIN-3) での発見が望ましい。しかしながら膵臓は画像による診断が容易ではなく、PanINの特異的な分子マーカーの検出が可能であれば膵癌の早期診断が可能となり、治療成績の向上に繋がると考えられる。

これまでの遺伝子改変膵腫瘍モデルマウスの問題点

癌発生過程に関与する分子異常を動物モデルを用いて再現し、それが原因としてあるいは付加的に作用するかどうかを明らかにする試みが相次いで報告され、膵腫瘍モデルマウ

スもいくつか報告されている。しかし、これらマウスの大きな問題点は、遺伝子変異が生殖細胞ですでに起きており、遺伝子変異がPanINの早期から順に蓄積されていく膵発癌過程が再現されていない点である。そのためか、ヒトで見られる浸潤性膵管癌ではなく、腺房細胞癌や肉腫様腫瘍が多く見られる。

遺伝性慢性膵炎と膵癌

慢性炎症が癌の発生原因であることはよく知られているが、慢性膵炎患者でも健常人と比較して約10倍の頻度で膵癌を発症する。特に遺伝性慢性膵炎患者では幼少期から急性膵炎発作を繰り返すため、膵発癌の頻度が約53倍と著しく高い。現在知られている遺伝性膵炎の原因遺伝子はカチオニックトリプシノーゲン (PRSS1) とそのインヒビターである膵臓分泌性トリプシンインヒビター (serine protease inhibitor Kazal type 1; SPINK1) である。SPINK1 は膵内で異所性に活性化したトリプシンを阻害することにより、膵臓を自己消化 (いわゆる膵炎) から守る役割を担っていると考えられている。そこで我々は“SPINK1が欠損すると膵炎が発症するのか?”という仮説を検証する目的でSPINK1のマウスホモログSpink3の欠損マウスを樹立した (Ohmuraya M. Gastroenterology 2005)。Spink3ホモ欠損マウスは正常に生まれくるが、出生直後から膵腺房細胞に過剰なオートファジー (自食作用) が誘導され、massiveな膵腺房細胞死が起き、膵外分泌機能不全により生後1週間で死亡する。膵内でのトリプシンの生成 (Ohmuraya M. Pancreas 2006) は、過剰に誘導されるオートファジーによるものであった (Hashimoto D, Ohmuraya M. JCB 2008, Ohmuraya M. Autophagy 2008)。

2. 研究の目的

遺伝性慢性膵炎患者が高率に膵癌を発症する点に着目し、遺伝子改変慢性膵炎マウスを用いて、よりヒト膵癌に近い発癌マウス (PanIN→膵癌) を樹立し、膵発癌に関わる分子異常の解析に加え、膵癌の早期発見や分子治療の標的となる蛋白を特定する。さらに慢性炎症を抑制し、膵癌発症を遅らせる新たな方法など、臨床応用を目指すことを目的とする。

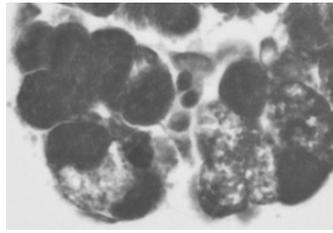
3. 研究の方法

CAG プロモーター下にヒト *SPINK1* 遺伝子のイントロンの一部を除いたミニ遺伝子をつなぎ (SP1)、マウス ES 細胞の X 染色体に置換してマウス (X^{SP1} マウス) を樹立した。

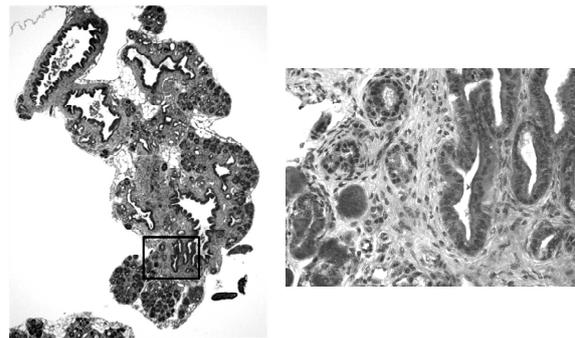
哺乳類の性染色体である X 染色体が、1 本を除いて、残りの X 染色体で遺伝子発現が抑制されることを X 染色体の不活性化という。 X^{SP1} マウスはオス (YX^{SP1}) と X 染色体の両方にトランスジーンが挿入されたメス ($X^{SP1/SP1}$) ではすべての細胞で *SPINK1* 遺伝子が発現するが、片方に挿入されたメス ($X^{SP1/+}$) では約半数の細胞でのみ *SPINK1* 遺伝子が発現するはずである。このマウスと *Spink3*^{+/-} マウスを交配した。

4. 研究成果

Spink3^{-/-} YX^{SP1} および *Spink3*^{-/-} $X^{SP1/SP1}$ マウスは野生型と差が見られず、ヒト *SPINK1* がマウス *Spink3* を代償することが示された。出生直後の *Spink3*^{-/-} $X^{SP1/+}$ マウスでは正常な腺房細胞と著しい変性を生じた腺房細胞がモザイク状に混在しており、X 染色体の不活性化によって *SPINK1* が on の細胞と off の細胞が混在していることが確認された。



このマウスは軽度の成長障害を示し、8週齢では膵臓全体の萎縮が見られた。この膵臓では全体に腺房細胞の脱落と膵実質の繊維化、膵管の拡張が顕著であった。



(ヒトでは小葉間の線維化と膵実質 (腺房) の減少が見られると、慢性膵炎と診断 (確診) することができる。)

拡張した膵管の上皮には過形成が見られ、ヒト膵癌の前癌病変とされるPanINと酷似していた。さらにTGF- β 及び膵星細胞のマーカである α SMA, desminの過剰発現が確認された。

まとめ

8週齢の*Spink3*^{-/-} $X^{SP1/+}$ マウスでは腺房細胞の脱落、過剰な線維化が観察され、ヒト慢性膵炎に極めて近い病理像を呈していた。また同時期ですでにヒト膵癌の前癌病変とされるPanINに類似した病理像とEGFRやTGF- β の過剰発現が見られ、これまでに報告のない、慢性膵炎から前癌病変への移行を再現するモデルとなり得ると考えられた。

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 5 件)

1. Ohmuraya M, Sugano A, Hirota M, Takaoka Y, Yamamura K. Role of Intrapancreatic SPINK1/Spink3 Expression in the Development of Pancreatitis. *Front Physiol.* 2012;3:126. (査読有)
 2. Ohmuraya M, Yamamura K. Roles of serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) in pancreatic diseases. *Exp Anim.* 2011;60(5):433-44. (査読有)
 3. Ida S, Ohmuraya M, Hirota M, Ozaki N, Hiramatsu S, Uehara H, Takamori H, Araki K, Baba H, Yamamura K. Chronic pancreatitis in mice by treatment with choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Exp Anim.* 2010;59(4):421-9. (査読有)
 4. Wang J, Ohmuraya M, Suyama K, Hirota M, Ozaki N, Baba H, Nakagata N, Araki K, Yamamura K. Relationship of strain-dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of Prss1 and Spink3 expression. *Lab Invest.* 2010 May;90(5):654-64. (査読有)
 5. Romac JM, Ohmuraya M, Bittner C, Majeed MF, Vigna SR, Que J, Fee BE, Wartmann T, Yamamura K, Liddle RA. Transgenic expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor-1 rescues SPINK3-deficient mice and restores a normal pancreatic phenotype. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 Apr;298(4):G518-24. (査読有)
2. 大村谷昌樹、Serine protease inhibitor Kazal type 1 activates the mammalian target of rapamycin. 第 69 会日本癌学会、平成 22 年 9 月 23 日 大阪市、大阪国際会議場
 3. Masaki Ohmuraya, Pancreatic acinar cell death pathways. 第 14 回国際膵臓学会、第 41 回日本膵臓学会大会、平成 22 年 7 月 12 日、福岡市、福岡国際会議場
 4. Masaki Ohmuraya, A Mouse Line Expressing *Spink3*-Driven Cre Recombinase in acute pancreatitis. THE 42st MEETING OF EPC in Stockholm, 2010 June 18, Stockholm, Sweden

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村谷 昌樹 (OHMURAYA MASAKI)
熊本大学・大学院先端機構・特任助教
研究者番号：60398229

[学会発表] (計 4 件)

1. 大村谷昌樹、X 染色体不活性化による遺伝子改変慢性膵炎モデルマウスの樹立、第 42 回日本膵臓学会 平成 23 年 7 月 30 日、弘前市、ホテルニューキャッスル