

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金）研究成果報告書

平成 2 5 年 5 月 3 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23701042

研究課題名（和文） 遺伝子改変膵がん自然発症マウスからの前癌病変初代細胞の樹立とその悪性化

研究課題名（英文） Establishment of the primary culture of precursor gland in genetical engineering mice

研究代表者

笹島 順平 (SASAJIMA JUNPEI)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：80451467

研究成果の概要（和文）：われわれは遺伝子改変膵がん自然発症マウスの膵がんおよび前癌病変からの腫瘍腺管の分離に成功した。さらにこれを 3 次元培養することにより、分化度に応じた管腔形成を再現することができた。さらに前癌病変由来の腫瘍腺管と膵がん由来の腫瘍腺管を用いて、そのマイクロアレイ発現を網羅的に解析し、発癌を促進するマイクロ RNA15 種、発癌を抑制するマイクロ RNA18 種を同定した。

研究成果の概要（英文）：This study established the methods of isolation of precursor gland from genetical engineering mice. Subject to differentiation of isolated gland, ductal morphology was observed in the three dimension culture system. We detected candidates of micro RNA which accelerate or suppress its carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：前癌病変、膵臓癌、マイクロ RNA、遺伝子改変マウス、3次元培養

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は代表的な難治癌であり、その頻度は我が国の部位別がん死亡数（2009 年）の第 5 位と決して少なくはない。また、これだけ画像診断が発達した現在でも早期発見は極めて困難であり、膵臓癌の予後を改善するためには新規治療法の開発が強く望まれる。しかし、癌治療が分子標的薬の開発により、近年急激に発達している一方で、膵臓癌に対する治療は以前より改善しつつあるものの、他のがんに比べて遅れている状況にある。

このような背景のもと、我々は膵臓癌の発癌過程の解明が早期発見や新規治療の開発につながることを考えた。膵臓癌には様々な遺伝子変異（がん遺伝子）が報告されており、中でも K-ras 遺伝子変異は極めて高頻度で起っていることが報告されている（膵癌患者の

約 90%に認められる)。一方で、この K-ras 遺伝子変異は慢性膵炎や膵管内乳頭状粘液腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN) といった良性疾患でも認められる。慢性膵炎や膵管内乳頭状粘液腫瘍は膵臓癌の発生する危険性が高いと報告されており、これらの事実からこの K-ras 遺伝子変異は膵臓癌の発生過程の初期におこり、後の発癌に重要な役割を示すと考えられている。

癌の発生過程には、癌を引き起こす遺伝子変異（がん遺伝子）が 1 つ 1 つおこることによって、段階を経て発癌にいたるという多段階発癌という概念がある。これは正常な細胞に遺伝子変異がおこることにより、まだ癌ではないが正常でもないという前癌病変となり、ここにさらに遺伝子変異が加わることに

よってはじめて癌となる考え方である。膵臓癌においてもこの概念が当てはまり、膵上皮内腫瘍病変（Pancreatic intraepithelial neoplasm; PanIN）や膵管内乳頭状粘液腫瘍（IPMN）が膵臓癌における前癌病変として考えられている。

この発癌過程に対する概念をマウスに応用することによって、膵自然発癌マウスモデルが開発された。膵臓特異的に前述の **K-ras** 遺伝子変異を引き起こすことによって、ある一定に時期にマウスの膵臓に PanIN が発生する。さらに代表的ながん遺伝子である **p53** 遺伝子の変異を加えることによって膵臓癌が発生する。このモデルを用いることによって、膵臓の発癌過程を研究することが可能となった。

正常な組織ではその構造が正常に維持されているが、発癌過程の進展にともない正常構造が破綻していく。正常構造を維持する能力は分化能とよばれ、発癌過程の進展によって正常構造が維持出来なくなる、すなわちこの分化能を失っていくことは脱分化と言われている。この脱分化の過程をこれらのモデルは正確に反映している。

がん遺伝子は発癌における重要な要因ではあるが、これだけでは発癌過程を説明することはできない。近年、遺伝子の発現を制御するさまざまな因子が注目され、癌においてはこれらの制御機構が破綻していることがわかってきた。とくにマイクロ RNA とよばれる小核酸分子が遺伝子制御に重要であることが次々と報告されており、発癌過程においても重要な役割を担っていると考えられている。

これらの背景のもと、われわれは前癌病変である膵上皮内腫瘍病変（PanIN）では維持されている分化能が発癌の過程で失われることに着目し、この脱分化機構を担う遺伝子制御機構、とくにマイクロ RNA の変化を捉えることによって、癌細胞の分化能を回復させ（分化を誘導する）、悪性度を低下させ、治療につなげることが出来るのではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

**K-ras** 遺伝子変異に加え、**p53** 遺伝子変異などの更なるがん遺伝子の変異が加わることによって、悪性形質を規定する共通経路が誘導されるといわれている。この過程での遺伝子発現制御機構の変化、特にマイクロ RNA の発現変化が脱分化や癌の浸潤能、転移能の獲得の鍵になるという仮説を立てた。**K-ras** 遺伝子変異により細胞増殖が促進されるものの、やがて細胞は老化し、細胞死にいたるが、**p53** 遺伝子変異などのがん遺伝子変異が加わることによって今度は細胞老化が回避され、癌化へと向かう。この癌化へのステッ

プを抑制する機構をマイクロ RNA が少なくともその一部を担っているものと考えた。この仮説が正しければ、前癌病変である膵上皮内腫瘍病変（PanIN）において維持されているマイクロ RNA による遺伝子発現制御機構を操作することによって、逆に発癌を誘導することも可能となりうる。

そこで本研究では、発癌過程を再現した膵自然発癌マウスモデルを用いて、特にマイクロ RNA に注目して、その発癌過程に対する役割を解明することを目的とした。

膵自然発癌マウスは **K-ras** 遺伝子変異を膵臓特異的に発現させることによって生後 12 から 18 週目に前癌病変である膵上皮内腫瘍病変（PanIN）が発生するが、癌の発生には至らない。**K-ras** 遺伝子変異にさらに **p53** 遺伝子変異を加えることによって生後 12 から 18 週目に膵臓癌が発生する。この二つのモデルを前癌病変（PanIN）モデル、膵臓癌モデルとした。これらのマウスモデルそのものに対して、マイクロ RNA による遺伝子発現制御機構を操作することは困難であることから、これらのマウスモデルの膵臓から腫瘍細胞を抽出し、以下の2点を明らかにすべく、研究を行った。

(1). 前癌病変モデルから抽出した膵上皮内腫瘍病変（PanIN）細胞および膵臓癌モデルから抽出した膵臓癌細胞を用いて、そのマイクロ RNA の発現を網羅的に解析し、その発現の違いから、発癌を促進あるいは抑制すると思われるマイクロ RNA を同定する。

(2). 候補となったマイクロ RNA の発現を制御することによって、膵上皮内腫瘍病変（PanIN）細胞が浸潤・転移といった悪性形質を獲得し、膵臓癌へと誘導できるか、あるいは膵臓癌細胞に分化能を再び誘導することによって良性化することができるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1). 膵上皮内腫瘍病変（PanIN）細胞および膵臓癌細胞の分離抽出

前癌病変モデルでは、顕微鏡レベルでは膵臓全体に膵上皮内腫瘍病変（PanIN）が多発することが確認出来るが、肉眼上は明らかな腫瘍として認識することは困難である。膵臓全体をサンプルとした場合、多くの正常細胞・組織が混入する。一方膵臓癌モデルでは肉眼的に癌の確認ができるものの、癌を形成するのは癌細胞のみではなく、線維芽細胞やマクロファージ、血管内皮細胞などの間質を構成する細胞群が混在する。そのため、腫瘍細胞のみを分離抽出する必要がある。そこでコラゲナーゼを用いた方法を用いて、膵上皮内腫瘍病変（PanIN）細胞および膵臓癌細胞

を線管のまま分離開出を行う。

## (2). 分離開出法の基礎的評価

分離開出した腫瘍線管が実際に腫瘍線管を抽出出来ているかを評価する。具体的には①、分離開した腫瘍線管を免疫不全マウスまたは遺伝子変異のない野生型マウスに移植し、腫瘍が形成されるかを評価する。

②、分離開した腫瘍線管の免疫組織学的に染色し、上皮細胞マーカーおよび間質細胞マーカーの発現を評価する。

③、分離開した腫瘍線管を培養し、細胞株を作成し、同様にマウスへの移植を試みる。さらにフローサイトメトリーによる表面抗原解析を行い、上皮細胞マーカーの発現を解析する。

## (3). マイクロ RNA 発現の網羅的解析

分離開出した腫瘍線管を集積し、これからマイクロ RNA を抽出し、マイクロ RNA アレイを行い、マイクロ RNA 発現を網羅的に解析する。膵上皮内腫瘍病変 (PanIN) 細胞と膵臓癌細胞におけるマイクロ RNA の発現を比較し、発癌過程の制御を担うと思われる候補マイクロ RNA を同定する。

## (4). 腫瘍線管の3次元培養法の確立

細胞株の培養は平面のディッシュでなされるが、腫瘍線管は3次元構造体であり、この構造を維持した状態での培養を試みる。具体的にはコラーゲンゲルまたはマトリジェルといった細胞間基質を用いた3次元培養を行う。

## (5). 腫瘍線管におけるマイクロ RNA 発現に制御とその効果の検証

腫瘍線管に対し、レンチウイルスベクターを用いて(3)で同定した候補マイクロ RNA のノックダウンを行う。ノックダウンの効果を定量的 RT-PCR で評価し、ノックダウンの確認ができたなら、ノックダウンした腫瘍線管を(4)の3次元培養法で培養し、その形態を観察する。さらに免疫不全マウスに対し、ノックダウンした腫瘍線管を移植し、腫瘍形成を評価する。さらに組織標本作製し、腫瘍の分化度を評価する。

## 4. 研究成果

### (1). 膵上皮内腫瘍病変 (PanIN) 細胞および膵臓癌細胞の分離開出

20 週齢の前癌病変モデルマウスの膵臓全体と、20 週齢の膵臓癌モデルマウスの腫瘍部分を取り出し、培養液中でこれを細切し、コラゲ

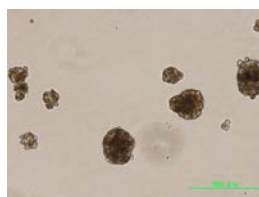


図 1

ナーゼを用いて 37°C で 3 時間溶解した。これにより得られた小組織塊を StemPro hESCSFM 培養液 (ライフテクノロジー社) で培養した。溶解直後は破片状であった組織塊は翌日には球状を呈していた (図 1)。これを腫瘍線管として、以降の実験に使用した。なお野生型マウスの膵臓全体を用いて同様の分離開を試みたが、コラゲナーゼ処理の間に全て分離開し、組織塊は得られなかった。このことから本分離開法は腫瘍線管のみを分離開できるものと思われた。

## (2). 分離開出法の基礎的評価

分離開出した腫瘍線管を免疫不全マウスの皮下に移植したところ、膵臓癌モデルマウスの腫瘍から分離開した腫瘍線管では造腫瘍能を認め、明らかな腫瘍形成を認めた。一方、前癌病変モデルマウスから分離開した腫瘍線管を移植しても肉眼的には腫瘍形成を認めなかったが、顕微鏡的に異型線管を同定することができた。

これらの腫瘍線管を免疫染色およびフローサイトメトリーにて表面抗原を確認したところ、上皮細胞マーカーである EpCAM が陽性であり、上皮系細胞であることが確認された。以上の結果から本分離開法は造腫瘍能をもつ腫瘍線管を特異的に分離開できることが確認された。

## (3). マイクロ RNA 発現の網羅的解析

分離開した腫瘍線管をそのまま培養し、徐々に血清含有培地に変更していくことによって初代細胞培養に成功した。この細胞をマウスに移植すると、腫瘍形成を認めたが、その腫瘍は分化度の混在したものであり、多くが分化能を失っていた。フローサイトメトリーによる表面抗原解析でも EpCAM が一部陰性化しているものがあり、もとの分化度を反映していないと思われた。

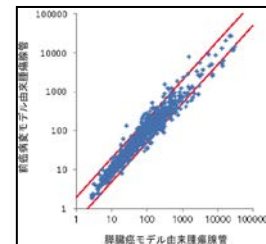


図 2

そのため、マイクロ RNA 発現の解析は分離開直後の腫瘍線管 (摘出後 24 時間後) のみを用いた。

マイクロ RNA アレイの結果 (図 2) 前癌病変由来の腫瘍線管で 2 倍以上発現の高い、発癌を抑制するであろうと思われるマイクロ RNA 候補を 18 種、逆に膵臓癌由来の腫瘍線管で 2 倍以上発現の高い、発癌を促進するであろうマイクロ RNA 候補を 15 種同定した。

## (4). 腫瘍線管の3次元培養法の確立

候補となるマイクロ RNA の発現を抑制することによっておこる変化を観察するために 3

次元培養を試みた。コラーゲンゲルもしくはマトリジェルをあらかじめゲル化させた培養皿に、腫瘍腺管を加えた培養液を含んだコラーゲンもしくはマトリジェルを重ねてゲル化させた後、さらに培養液を上層に加えて培養した。

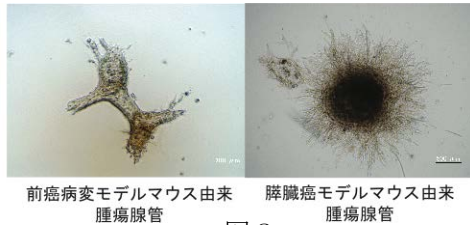


図 3

膵臓癌モデルマウス由来の腫瘍腺管は放射状に無秩序に増殖していったが、前癌病変由来腫瘍腺管は腺管を形成するようにゆっくりと増殖、形態変化していった。本培養法は分離した腫瘍腺管の分化度を評価が可能であると考えた。

#### (5) 腫瘍腺管におけるマイクロ RNA 発現に制御とその効果の検証

レンチウイルスによる標的マイクロ RNA のノックダウンを分離した腫瘍腺管に対して試みた。しかしながら球状を呈した腫瘍腺管に対するノックダウンは感染効率の問題から困難が多く、十分な抑制効果を得ることはかなわなかった。細胞株化により十分なノックダウンは可能になると思われるが、細胞株化は形質を変化させ、本来の分化度が失われている可能性がある。この問題を克服するには腫瘍腺管の形態での培養ではなく、単細胞での培養でかつ分化度を維持できる培養法の開発が求められる。

#### 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)

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

笹島 順平 (SASAJIMA JUNPEI)  
旭川医科大学・大学病院・医員  
研究者番号：80451467