

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293282

研究課題名(和文) 膵発生マスター遺伝子Pdx1に着目した膵癌モデルマウスの解析とその治療的応用

研究課題名(英文) The newly invented murine pancreatic cancer model associated with pancreatic developmental master gene Pdx1

研究代表者

増井 俊彦 (Masui, Toshihiko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20452352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、変異型K-Ras/p53 発現膵癌マウスモデルと誘導性Pdx1 ノックアウトを組み合わせる事による膵癌における膵発生マスター遺伝子Pdx1 の機能解明を目標とした。膵癌マウスにおいてpdx1を外分泌特異的にノックアウトすると、想定されていた現象とは逆に癌進展が早くなるという結果が得られた。詳細に解析するところの癌進展は単にpdx1がノックアウトされた細胞のみならず、ノックアウトされていない細胞でも進展が見られ、K-RAS/p53変異が起こっていない細胞でも癌化が見られるという驚くべき結果が得られた。引き続きこの非自律的増殖をきたす因子を検索中である。

研究成果の概要(英文)：In this project, we tried to elucidate the function of pancreatic developmental master gene Pdx1 in the pancreatic carcinogenesis, since there are many common characteristics in the behavior of the cancer cells and of the developmental cells. We knockout pdx1 expression in the genetic manipulated murine pancreatic cancer model and found an exaggeration of the tumor development contrary to our preliminary results. Surprisingly, this phenomenon was observed not only in the knockout cells with K-ras or p53 mutations but also in the genetically normal cells, which indicates the non-autonomous development of cancer cells from normal tissue. We are now seeking the factors inducing this non-autonomous development.

研究分野：膵臓外科学

キーワード：膵発癌 非自律的増殖

1. 研究開始当初の背景

癌における細胞の挙動は成体臓器の細胞よりはむしろ胎生臓器形成期のそれに似ている。すなわち、臓器形成機構の解析を目指した発生学の知見が、癌をはじめ組織再生や炎症といった研究分野の発展に貢献し、実際にこの観点から多くの報告がある。

Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) は、ノックアウトマウスにおいて膵が形成されないことから膵発生のマスター遺伝子と位置付けられている。Pdx1 は発生初期の全ての膵細胞で発現しているが、臓器形成過程で次第に内分泌細胞系譜に偏った発現パターンをとり、成体細胞ではインスリン、GLUT2 等の発現調節を行う。ヒト Pdx1 変異は若年発症糖尿病 4 型 (MODY4) を発症する事から、これまでの研究は主として内分泌組織における機能解析が行われて来た。しかしながら、外分泌細胞系譜にも低レベルながらも Pdx1 発現が見られ、胎生期 Pdx1 が外分泌組織の増殖、維持に必須であることがわかってきた。

これまで臨床標本を用いた解析結果から、PanIN から浸潤癌に至る Sequence モデルが提唱されているが、この中には Pdx1 を始めとする胎生期遺伝子の再発現や炎症など癌の initiation/promotion に関わり得る機構の意義が明確には示されていない。申請者らはヒトの進行膵癌組織に Pdx1 の発現が見られることを初めて見だし、Pdx1 発現が予後不良因子であることを明らかにした。これらの臨床事実より Pdx1 発現が遷延している状況が癌の悪性を反映することがわかってきたが、一方、発癌そのものにおける Pdx1 発現の重要性はこれまでに明らかにされておらず、既存の発癌因子と言われる k-ras/p53 以外に発癌に関与する因子の一つとしての pdx1 の役割を解明することは膵癌の発癌過程の解明において大きな意義を持つ。

2. 研究の目的

本研究では、上記臨床事実と発生研究の知見から導かれた仮説をマウス膵癌モデルで検証し、発癌から進行転移にいたるまでの一連の過程における Pdx1 の機能解明を目指す。膵癌における Pdx1 の役割が明らかになれば、Pdx1 発現を治療標的とした新たな戦略を構築することも想定できる。

3. 研究の方法

膵癌モデルマウスにおける Pdx1 の役割の解明。

マウス発癌モデルにおける Pdx1 の発現解析および、pdx1 ノックアウトマウスと pdx1 トランスジェニックマウスにおける発癌への関与をマイクロアレイを用いて検討する。

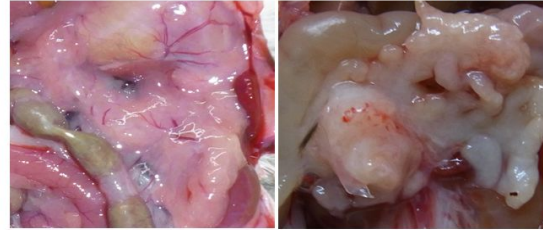
pdx1 コントロールによる膵癌治療に向けた基礎的研究

マウス発癌モデルにおいて pdx1 ノックダウンを起こし得るモデルの構築につなげる。

4. 研究成果

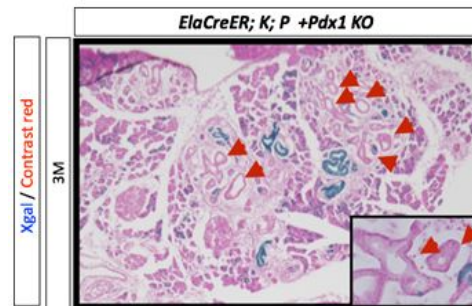
前述の臨床標本における解析結果では pdx1 発現と腫瘍悪性度が正の相関を持っていたこと、および preliminary な解析では pdx1 ノックアウトにて PanIN が消失することが観察されたことからさらに解析を進めたところ ElastaseCreER;Kras/p53+Pdx1KO マウスでは予想に反して下図のように 4 か月後における腫瘍進展が著明であった。

ElastaseCreER;Kras^{p53}* ElastaseCreER;Kras^{p53}*+Pdx1KO



4 months after tamoxifen injection

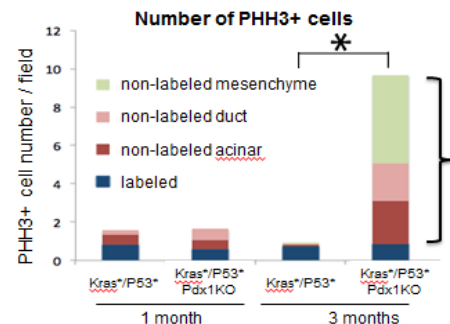
腫瘍を詳しく解析すると、驚くべきことに腫瘍形成細胞はすべて青く染まる xgal 陽性細胞というわけではなかった。すなわち、外分泌特異的に腫瘍遺伝子を発現させ、かつ、Pdx1 をノックアウトされた細胞であれば Xgal 陽性となるはずであるが、陰性細胞、すなわち正常細胞においても形態変化をきたし、腫瘍の一部を構成していた。



一方、pdx1 ノックアウトマウスではない通常の膵癌モデルではこのような現象は見られなかった。

すなわち、Pdx1 が低下することによるストレスで、周囲細胞の非自律的増殖をきたすというあらたな仮説を立てるに至った。

実際、増殖細胞に染色される PHH3 陽性度合いを調べると pdx1 をノックアウトしたマウスでの腫瘍ではラベルされていない、すなわちノックアウトされていない細胞での陽性率がラベルされている細胞より有意に多く、(下図)K-RAS/p53 変異および pdx1 ノック



アウト細胞が周囲の正常細胞に影響を与え増殖する、という細胞の非自律的増殖の仮説を

示唆する結果が得られた。

同腫瘍に対して、Pdx1 ノックアウトすることがどのような影響を与えているか、マイクロアレイを行って比較することによりどのような因子が非自律性増殖に影響するか、細胞非自律的腫瘍化を担う責任分子の同定を目指している。候補シグナルを阻害するマウス実験を行い、その意義を明らかにすることで、新たな治療戦略構築に貢献し得る。

これらは膵癌における腫瘍進展の新しい概念を生み出す画期的な研究といえ、上記諸成果を論文にまとめつつ、引き続いての研究を進めているところである。

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 11 件) 全て査読有り

Masui T, Doi R, Kawaguchi Y, Sato A, Nakano K, Ito T, Anazawa T, Takaori K, Uemoto S. Concurrent gemcitabine+S-1 neoadjuvant chemotherapy contributes to the improved survival of patients with small borderline-resectable pancreatic cancer tumors. *Surg Today*. 2016 Feb 9. Masui T, Kubota T, Aoki K, Nakanishi Y, Miyamoto T, Nagata J, Morino K, Fukugaki A, Takamura M, Sugimoto S, Onuma H, Tokuka A Long-term survival after resection of pancreatic ductal adenocarcinoma with para-aortic lymph node metastasis: case report *World Journal of Surgical Oncology* 2013, 11:195

Hale MA, Swift GH, Hoang CQ, Deering TG, Masui T, Lee YK, Xue J, MacDonald RJ. The nuclear hormone receptor family member NR5A2 controls aspects of multipotent progenitor cell formation and acinar differentiation during pancreatic organogenesis. *Development*. 2014 Aug;141(16):3123-33. doi: 10.1242/dev.109405

Meng F, Takaori K, Ito T, Masui T, Kawaguchi M, Kawaguchi Y, Uemoto S. Expression of SOX9 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Pancreas*. 2014 Jan;43(1):7-14. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182a70b2f.

Hori T, Takaori K, Kawaguchi M, Ogawa K, Masui T, Ishii T, Nagata H, Narita M, Kodama Y, Uza N, Uemoto S. Non-functioning pancreatic neuroendocrine tumor accompanied with multiple liver metastases:

remorseful case and literature review. *JOP*. 2014 Nov 28;15(6):622-5. doi: 10.6092/1590-8577/2861N

Sawai Y, Kodama Y, Shimizu T, Ota Y, Maruno T, Eso Y, Kurita A, Shiokawa M, Tsuji Y, Uza N, Matsumoto Y, Masui T, Uemoto S, Marusawa H, Chiba T. Activation-Induced Cytidine Deaminase Contributes to Pancreatic Tumorigenesis by Inducing Tumor-Related Gene Mutations. *Cancer Res*. 2015 Aug 15;75(16):3292-301. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3028. Epub 2015 Jun 25.

Okumura S, Kaido T, Hamaguchi Y, Fujimoto Y, Masui T, Mizumoto M, Hammad A, Mori A, Takaori K, Uemoto S. Impact of preoperative quality as well as quantity of skeletal muscle on survival after resection of pancreatic cancer. *Surgery*. 2015 Jun;157(6):1088-98. doi: 10.1016/j.surg.2015.02.002. Epub 2015 Mar 19.

Hori T, Masui T, Kaido T, Ogawa K, Yasuchika K, Yagi S, Seo S, Takaori K, Mizumoto M, Iida T, Fujimoto Y, Uemoto S. Laparoscopic Distal Pancreatectomy with or without Preservation of the Spleen for Solid Pseudopapillary Neoplasm. *Case Rep Surg*. 2015;2015:487639. doi: 10.1155/2015/487639. Epub 2015 Oct 26.

Kou T, Kanai M, Yamamoto M, Xue P, Mori Y, Kudo Y, Kurita A, Uza N, Kodama Y, Asada M, Kawaguchi M, Masui T, Mizumoto M, Yazumi S, Matsumoto S, Takaori K, Morita S, Muto M, Uemoto S, Chiba T. Prognostic model for survival based on readily available pretreatment factors in patients with advanced pancreatic cancer receiving palliative chemotherapy. *Int J Clin Oncol*. 2016 Feb;21(1):118-25. doi: 10.1007/s10147-015-0864-x. Epub 2015 Jun 28.

Kodama S, Nakano Y, Hirata K, Furuyama K, Horiguchi M, Kuhara T, Masui T, Kawaguchi M, Gannon M, Wright CV, Uemoto S, Kawaguchi Y. Diabetes Caused by Elastase-Cre-Mediated Pdx1 Inactivation in Mice. *Sci Rep*. 2016 Feb 18;6:21211. doi: 10.1038/srep21211
Hori T, Masui T, Kaido T, Ogawa K, Yasuchika K, Yagi S, Seo S, Takaori K, Mizumoto M, Iida T, Fujimoto Y,

Uemoto S. Laparoscopic Distal Pancreatectomy with or without Preservation of the Spleen for Solid Pseudopapillary Neoplasm. "Case Rep Surg. 2015;2015:487639. doi:10.1155/2015/487639. Epub 2015 Oct 26.

〔学会発表〕(計 20 件)

T. Masui, R. Doi, Y. Kawaguchi, M. Mizumoto, Y. Iwanaga, M. Kawaguchi, K. Takaori, S. Uemoto Prognostic factors for patients with borderline resectable pancreatic cancer after neoadjuvant chemotherapy 47th Annual Pancreas Club, Orland, Florida 05172013

増井俊彦、水本雅己、川口道也、岩永康裕、高折恭一、上本伸二 Borederline resectable 膵癌に対する術前 GEM/S1 療法の成績 第 25 回肝胆膵外科学会定期集会 2013 年 6 月 12-14 日、宇都宮市、栃木

増井俊彦、水本雅己、川口道也、岩永康裕、高折恭一、上本伸二 再発形式から見た膵内分泌腫瘍に対するリンパ節郭清の妥当性 第 68 回消化器外科学会総会 2013 年 7 月 17-19 日、宮崎市、宮崎県

増井俊彦、水本雅己、川口道也、岩永康裕、高折恭一、上本伸二 再発形式からみた術前化学放射線療法の照射野の検討 第 44 回膵臓学会大会 2013 年 7 月 25-26 日、仙台市、宮城県

増井俊彦、水本雅己、川口道也、岩永康裕、高折恭一、上本伸二 非機能性神経内分泌腫瘍に対する再発因子の検討 第 40 回日本膵切研究会 2013 年 8 月 30-31 日、高松市、香川県

T. Masui, S. Uemoto Surgical treatment of the patients with liver metastases of pancreatic neuroendocrine tumors ENETS 11th annual conference, 2014/3/5-7, Barcelona, Spain

増井俊彦、水本雅己、川口道也、岩永康裕、高折恭一、上本伸二 切除率から見た膵内分泌腫瘍肝転移の治療成績 第 114 回外科学会総会、2014 年 4 月 3 日、京都市、京都

T. Masui, M. Mizumoto, Y. Iwanaga, K. Takaori, S. Uemoto Pathological factors predicting recurrence of the non-functioning pancreatic NET 第 26 回肝胆膵外科学会定期集会 2014 年 6 月 11-13 日、和歌山市、和歌山

増井俊彦、水本雅己、岩永康裕、川口道也、高折恭一、上本伸二 Borderline Resectable 浸潤性膵管癌に対する術前化

学療法への適応 第 69 回消化器外科学会総会 2014 年 7 月 16-18 日、郡山市、福島

増井俊彦、水本雅己、岩永康裕、川口道也、高折恭一、上本伸二 膵

MANEC のガイドラインへの展開 第 45 回膵臓学会大会 2014 年 7 月 11-12 日、北九州市、福岡

増井俊彦、高折恭一、佐藤朝日、上本伸二 腹腔鏡膵体尾部切除術の術後回復に対する有用性の検討 第 41 回膵切研究会 2014 年 8 月 22 日-23 日、文京区、東京

増井俊彦、佐藤朝日、水本雅己、川口道也、岩永康裕、高折恭一、上本伸二 PNET 肝転移長期生存例における血管内治療の役割 第 2 回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会、2014 年 9 月 20 日、文京区、東京

増井俊彦、松本繁巳 京都大学における神経内分泌腫瘍への取り組み ~ 診断から治療まで ~ 第 52 回癌治療学会学術集会 2014 年 8 月 28 日-30 日、横浜市、神奈川県

増井俊彦、佐藤朝日、水本雅己、川口道也、岩永康裕、高折恭一、上本伸二 膵臓の厚さから見た腹腔鏡下膵体尾部切除におけるステープラー使用の安全性 第 27 回日本内視鏡外科学会総会 2014 年 10 月 2 日-4 日、盛岡市、岩手

T. Masui, A. Sato, K. Takaori, S. Uemoto Pathological factors affecting recurrence of the non-functioning pancreatic NET ENETS 12th annual conference, 2015/3/12-14, Barcelona, Spain

増井俊彦、佐藤朝日、水本雅己、川口道也、岩永康裕、高折恭一、上本伸二 膵頭部癌 R0 を達成するための膵切離線の設定の工夫 第 115 回外科学会総会、2015 年 4 月 16-18 日、名古屋市、愛知

増井俊彦、佐藤朝日、伊藤達雄、高折恭一、上本伸二 膵神経内分泌腫瘍の治療 ~ 外科の立場から 第 27 回日本内分泌外科学会総会、2015 年 5 月 28 - 29 日、福島市、福島

T. Masui, K. Takaori, A. Sato, M. Mizumoto and S. Uemoto An indication of DP-CAR to the pancreatic body/tail cancer 第 27 回肝胆膵外科学会定期集会 2015 年 6 月 11-13 日、港区、東京

増井俊彦、佐藤朝日、松本繁巳、児玉裕三、柴田登志也、高折恭一、上本伸二 肝転移症例に対する血管内治療を中心とした集学的治療 第 46 回膵臓学会大会 2015 年 6 月 19-20 日、名古屋市 名古屋 増井俊彦、佐藤朝日、水本雅己、岩永康裕、高折恭一、上本伸二 リンパ節転移部位から見た非機能性膵内分泌腫

瘍の適切な郭清範囲の検討 第70
回消化器外科学会総会 2015年7月
16-18日、浜松市、静岡

〔図書〕(計3件)

増井俊彦、上本伸二 術前術後化学療法 9 膵内分泌腫瘍 雑誌：消化器外科 2014年4月、第37巻第4号 482-493

増井俊彦、高折恭一、上本伸二 膵NET肝転移の治療戦略 - 切除/TACE/肝移植の適応について - 雑誌：胆と膵 Vol 35 (7) 657-662

増井俊彦、上本伸二 膵内分泌腫瘍の診断・治療の新展開 13. 膵内分泌腫瘍の肝転移に対する血管内治療の有用性 雑誌：胆と膵 Vol 36 (6)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増井 俊彦 (MASUI TOSHIHIKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号： 20452352

(2) 研究分担者

上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号： 40252449

(3) 連携研究者

川口 義弥 (KAWAGUCHI YOSHIYA)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号： 60359792