

研究報告書
令和3年度：A課題

2023年5月15日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 群馬大学生体調節研究所

住所 群馬県前橋市昭和町 3-39-15

研究者氏名 藤谷与士夫

(研究課題)

膵ランゲルハンス島を起源とするあらたな膵癌発症機構の解明

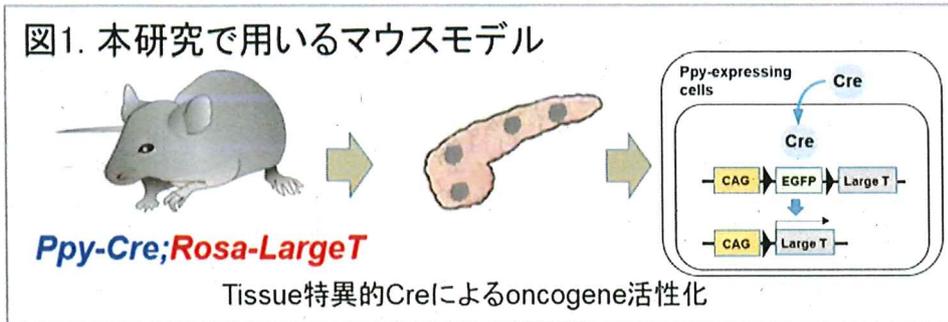
令和4年3月31日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

[研究の目的]

膵癌は早期発見が困難な癌種であり、本邦における5年生存率は7%と他の癌に比べて極端に低い。膵臓は腺房細胞、膵管細胞そして膵ランゲルハンス島（内分泌細胞）の3つのコンパートメントから成るが、膵癌は腺房細胞を origin として ADM (acino-ductal metaplasia) を経て発生すると現在は考えられている。本研究では、我々が他の目的の実験の過程で偶然に開発した、膵ランゲルハンス島に存在する内分泌細胞の一つである PP 細胞を起源として悪性度の高い膵癌を発生するユニークな動物モデルを分子レベルで解析することで、これまでの膵癌の腺房由来仮説に一石を投じたい。

[研究の方法]

膵ランゲルハンス島（膵島）にはインスリンを産生する β 細胞、グルカゴンを分泌する α 細胞、ソマトスタチンを産生する δ 細胞に加えて pancreatic polypeptide (PP) を産生する PP 細胞が存在する。PP 細胞の機能解析を施行すべく、PP 細胞の細胞株作成を試みた。図1に示す *Ppy-Cre; Rosa26-LargeT* マウス、すなわち PP 細胞の特徴的遺伝子 *Ppy* が活性化された細胞に細胞不死化に頻用される oncogene の SV40 LargeT を発現させることにより、PPoma を



誘導しようと試みた。予想に反して、マウスには膵内分泌腫瘍ではなく、膵腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma: PDAC) と考えられる病変が3週令以降に出現

した。①本モデルに発症する膵癌病変の特徴づけを各種分子マーカーを用いて行うとともに、PP細胞から膵癌 (PDAC: duct 系列) への運命転換が生じることを組織学的解析, 移植実験, RNA sequencing により検証する。

[研究結果および考察]

(課題1) *Ppy-Cre; Rosa26^{LargeT/tdTomato}* マウスの病理組織学的解析

Ppy-Cre; Rosa26^{LargeT} マウスの平均生存日数は4.7週であり、解析したマウスで7週令以上生存した個体は認められなかった。体重、血糖値が対照群マウスよりも有意に低値を示し、4週令では膵臓の多くは異常な導管構造と、腫瘍および間質組織によって占有されており、分化した膵島や腺房細胞量が著明に低下していることから、内分泌機能・外分泌機能の低下による低栄養が死因として最も可能性が高いと考えられた。この点に関しては生化学的検査によって今後明らかにしたい。病理学的所見として最も特徴的な点は、2週令位から異常な導管様構造が膵島から直接進展するように見えることである。SV40Large T 抗原は本来 PP 細胞が位置する膵島周辺部に発現し、この Large T 発現細胞が増殖しながら膵島から突出・進展して異常な膵管構造を形成したものと考えられた (図2)。

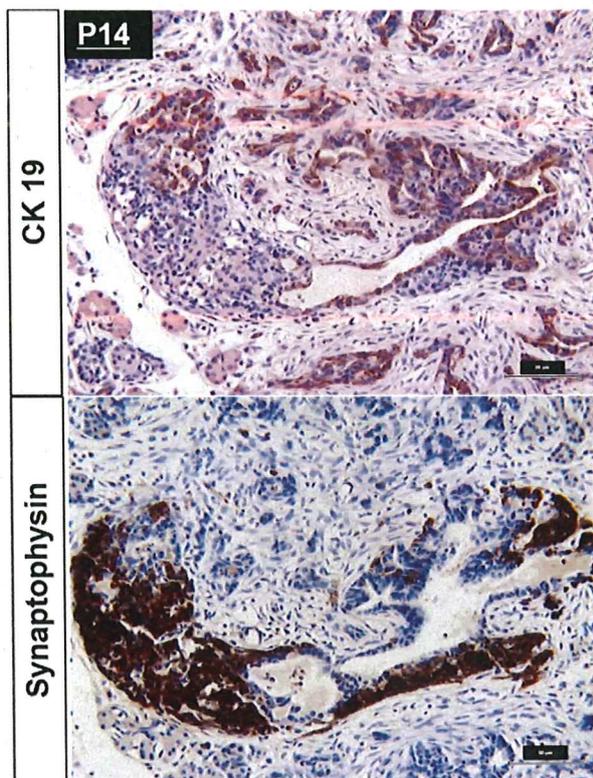


図2 膵島から異常な導管構造が直接進展する

ったことから *Ppy* 発現細胞から由来するものと考えられた。

(課題2) *Ppy-Cre; Rosa26^{LargeT/tdTomato}* マウス膵島の athymic mice への移植実験
Ppy-Cre; Rosa26^{LargeT/tdTomato} マウスは3週令以内に膵腺癌を発症することが示唆されたが、癌であることの検証法の一つとして、免疫不全マウスへの移植実験を行った。生後7日目の膵島を単離したのち、athymic mice の皮下に移植したところ、一か月以内に tumor が発生した。図3に示すように *Ppy-Cre; Rosa26^{LargeT/tdTomato}* マウス膵島は腺管構造を有する CK-19 陽性の典型的な PDAC を発症することか示された。また、この PDAC は Tomato 陽性であ

(課題3) Large T 応答性に *Ppy* 発現細胞から膵腺癌発症にいたる遺伝子発現変化の解析

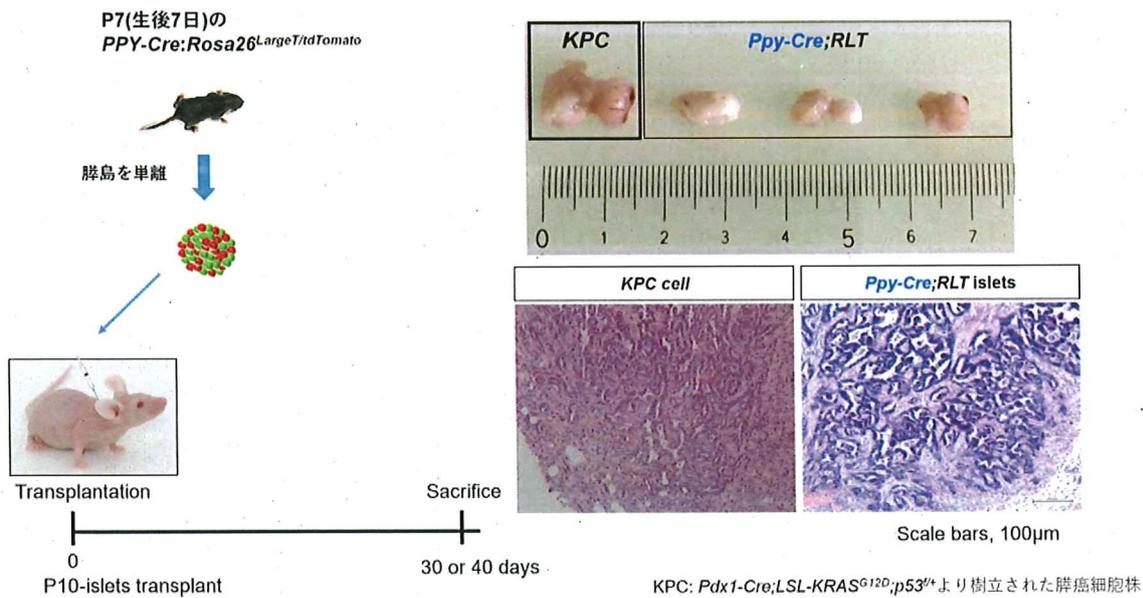


図3 *PPY-Cre;Rosa26^{LargeT/tdTomato}*マウスのathymic miceへの移植は膵腺癌を発症させる

Ppy 発現細胞において Large T を活性化することにより、どのような遺伝子発現プロファイルの変化を誘導することにより膵腺癌を誘導したのかを分子レベルで明らかにするため、*Ppy-Cre;Rosa26^{tdTomato}* マウスおよび *Ppy-Cre;Rosa26^{LargeT/tdTomato}* マウスそれぞれより tomato 陽性細胞を FACS を用いて sorting した。続いて RNA から cDNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq を行ない変動遺伝子の同定を試みた。その結果、発現変動遺伝子として 1362 個の遺伝子が発現変動することが観察された。その中には *Ppy*, *Gcg*, *Pyy*, 等の膵内分泌細胞の発現の低下, *Krt19*(CK-19)等の導管細胞マーカーの上昇, がん抑制遺伝子プロモーターの hypermethylation を誘導することが知られる *DNMT1* の上昇, reprogramming 遺伝子として知られる *mycL1*, *sox2* の発現上昇が観察された。図5の右上には、文献上 PDAC との関連性が報告されている遺伝子が多数リストアップされた。また、pathway 解析からは、pepti

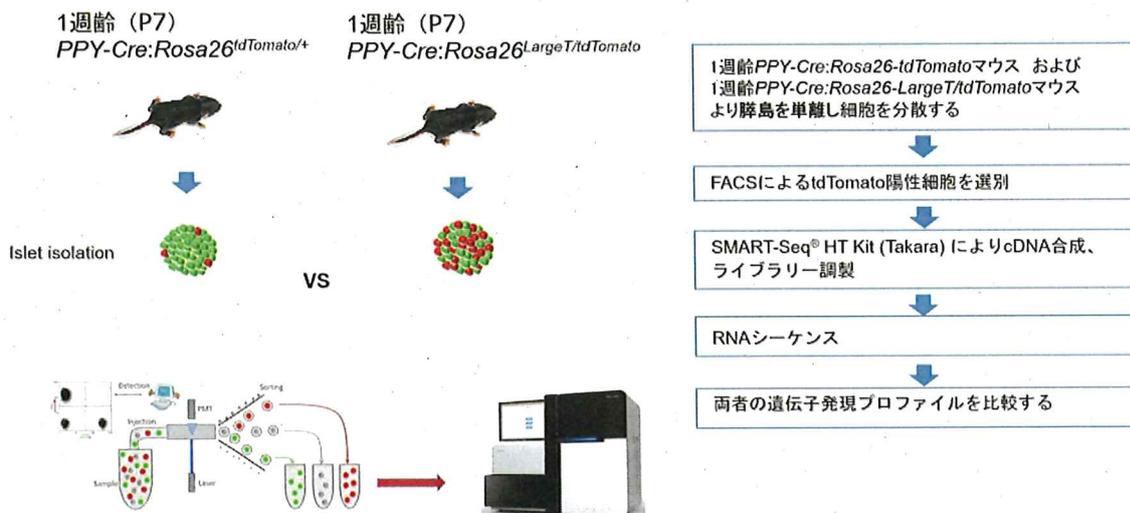


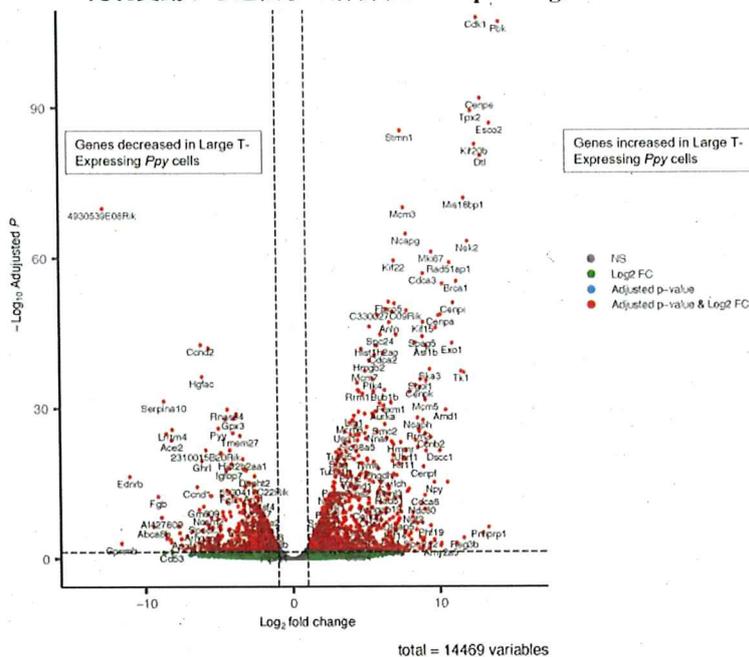
図4 *Ppy*遺伝子発現細胞にLargeTを活性化することにより発現変動する遺伝子を同定する試み (RNAseq)

de secretion, peptide transport 等の分泌に関する pathway が低下し, DNA replication, DNA re pair など細胞増殖に関するものが上昇する pathway として上位に enrich されていた。

以上の結果から膵内分泌細胞から癌細胞(PDAC)への分化転換が誘導されていることが gene signature の観点からも強く示唆された。

[成果の結論]

図5 Ppy発現細胞にLarge Tを活性化することにより発現変動する遺伝子の解析(RNA sequencing)



Ppy-Cre; Rosa26^{LargeT/tdTomato} マウスにおいて、*LargeT*を活性化することにより、*Ppy*発現細胞という内分泌細胞から、確かにPDACが発症することが、病理形態学的解析、遺伝子発現プロファイルの両面から検証された。内分泌細胞(膵島細胞)から由来する膵腺癌モデルはこれまで報告が無く、膵癌の新奇発症経路の存在を提示すると共に、膵癌のoriginの相違によるオーダーメイド治療の開発に今後寄与するものと考えられる。

[今後の展望]

(1)今回解析した *Ppy* 発現細胞からの膵癌の発症は *Large T* の発現が胎生期から始まっているため、adultで活性化した場合には結果が異なる可能性がある。そこで *Ppy-CreERT2* マウスを用いて10週令において *LargeT*を誘導的に活性化したところ、膵癌ではなくneuroendocrine tumor (NET)が発症した。このことから、*Ppy*発現細胞からの膵癌の発症は時期特異的に起こる現象であることが判明した。今後、どの時期の *Ppy* 発現細胞が *LargeT*に感受性があり、膵癌を発症するsusceptibilityを有するのかを *Ppy-CreERT2* マウスを用いて明確にしてゆきたい。

(1)今回解析した *Ppy* 発現細胞からの膵癌の発症は *Large T*

(2)今回行ったRNA sequencingから、*Ppy*発現細胞からの膵癌の発症に伴い変動する遺伝子群が多数明らかになった。これまでdepositされている膵癌のマウスモデル(*Ptf1a-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; p53^{f/f}*)やヒト膵癌のRNA sequencing解析結果と比較することにより、われわれの *Ppy* 発現内分泌細胞から発症する膵癌の特異的マーカー遺伝子セットを複数同定したい。それを用いてヒトの膵癌においても、同様の発症経路が存在するのかどうかの検証を行いたい。

[学会発表]

- Ofejiro B. Pereyeら「Genetically induced immortalization of Ppy-expressing cells results in pancreatic ductal adenocarcinoma」第100回日本生理学会シンポジウム 京都 2023年3月
- 藤谷与士夫 「PP細胞から切り拓く膵島研究の新展開 ～膵癌との関係について～」第66回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム 鹿児島 2023年5月

[謝辞]

本研究の遂行を御支援していただきました公益財団法人がん研究振興財団に心より御礼を申し上げます。質の高い論文発表に向けてさらに解析を深めてゆきたいと考えております