

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	柴田 理
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 1082 号
学位授与の日付	令和 4 年 9 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Establishment of a pancreatic cancer animal model using the pancreas-targeted hydrodynamic gene delivery method. (膵臓選択的ハイドロダイナミック遺伝子導入法による膵癌モデル動物の確立)
論文審査委員	主査 教授 若井 俊文 副査 教授 西條 康夫 副査 准教授 坂田 純

### 博士論文の要旨

#### 背景と目的

膵癌は予後不良の疾患であり、その 5 年生存率は 9%とあらゆる癌腫の中で最も低く、進行期 で発見されることが多い。その早期診断法の確立、新規治療法の開発は喫緊の課題であるが、これまで有用な膵癌動物モデルが確立されず、病態解明のための in vivo での解析が困難であった。

申請者らはこれまでに、ウイルスベクターや化学物質を使用せずに、水圧で遺伝子・薬物・細胞を臓器・組織内へとデリバリーする方法であるハイドロダイナミック遺伝子導入法 Hydrodynamic gene delivery (HGD) を用いた臓器選択的な遺伝子導入を報告してきた。そして、2017 年には膵臓選択的 HGD 法を開発した。今回、申請者は、この方法を用いて、ヒト膵発癌関連遺伝子を野生型ラットの膵臓に選択的に導入し、ヒト膵癌に近似した病態を呈する膵癌動物モデルを確立し、膵癌の病態解明のための解析を行い上記の課題を解決することを目的として本研究を行った。

#### 方法

野生型ラットを対象として、門脈を一時的に遮断し上腸間膜静脈から Kras、KrasG12D、Myc、Yap などのヒト膵発癌関連遺伝子の発現プラスミド DNA 溶液を単独あるいは組み合わせて導入し、発癌の有無を検証した。得られた組織を用いて、組織学的な分化度の差異、血清学的マーカーの有用性を検証するとともに、発癌に関連する分子シグナル伝達機構の解析を行った。

#### 結果

KrasG12D を導入した個体では、HGD 後 4 週で主膵管内に膵管内上皮腫瘍性病変が発生し、また腺房細胞の導管様細胞への変化 (Acinar-to-ductal metaplasia; ADM) を認めた。5 週時点で ADM の範囲拡大とそれに連続する腺癌と著明な間質増生を認め、浸潤性膵癌へと発展した。KrasG12D と Yap を組み合わせて、2 回導入した個体では最も効率的に発癌し、遺伝子導入後、5 週で 80%に膵癌に近似する膵腫瘍が発生した。HGD 後 8 週以上の長期観察例では、肝転移、皮下転移、播種巣をも認め、組織学的にも悪性度が上昇した。免疫染色では、膵原発巣、転移巣ともに Ki67 陽性細胞数の増加と p53、CK7、CK20 染色で陽性を示し、膵癌及びそ

の転移として矛盾しない所見であった。興味深いことに、KrasG12D と Yap を組み合わせて導入した個体では、KrasG12D 単独導入群と比較して、膵癌細胞の N カドヘリンの発現上昇と E カドヘリンの発現低下による上皮間葉転換を認め、腫瘍細胞の浸潤能・遊走能が亢進していることが推測された。血清学的マーカーとしての CA19-9 の中央値は KrasG12D+Yap 群で 135.5 U/ml と control 群の 75.4 U/ml に比較し上昇した (p=0.013)。ウェスタンブロット法による発癌メカニズムの解析では、KrasG12D 及び Yap の HGD 後、Erk、Akt、TGF $\beta$ 、CTGF の関与するシグナル伝達経路の活性化を認め、ヒト膵癌を模倣した腫瘍形成と、発癌シグナル伝達を認めた。

#### 考察

膵臓は主に腺房細胞、膵管上皮細胞、膵島細胞で構成され、腺房細胞は膵癌の主要な発生母地の一つとして知られている。膵癌では様々な遺伝子異常の蓄積により ADM などの前癌病変が浸潤癌へと進行する多段階発癌仮説が提唱されてきた。Kras の変異はほぼ全例の膵癌で検出され発癌のトリガーとして知られており、変異型 Kras 遺伝子量の増幅により腫瘍発生が促進される。また Yap は変異型 Kras の下流の重要な転写スイッチとして機能し、ADM の誘導と、浸潤性膵管癌への進行に必要とされる。

今回申請者らは、膵臓選択的 HGD 法を用いて野生型ラットに膵癌を 5 週間で発生させることができた。導入する遺伝子の種類や量、組みあわせにより多彩な腫瘍が発生することも明らかとなった。腺房細胞では、KrasG12D の導入により ADM を認め、KrasG12D+Yap を 2 回導入した個体では最も効率的に ADM、その悪性化による膵癌の発生・転移を認め、ヒト膵癌の多段階発癌と同様の変化であった。また今回、Yap が膵癌の発生と進展に重要な役割を担っていることも明らかとなり、その分子メカニズムとして癌細胞における上皮系マーカーである E カドヘリンの発現低下と、間葉系マーカーである N カドヘリンの発現上昇による膵癌細胞の浸潤、転移を促進すると考えられた。このことは、ほかの癌種で、YAP が上皮細胞の細胞接着因子を阻害し間葉系遺伝子の発現を亢進させ、上皮間葉転換を引き起こすことと矛盾しない。なお、Yap 単独導入群では腫瘍性変化を認めず、Kras の変異とそれに引き続く Yap 発現が膵癌進行に関与すると考えられた。

膵臓選択的な HGD により膵癌モデルラットを確立した。手技の簡便性と再現性から、本モデルを用いた発癌メカニズム解析が、新規治療法、早期診断法の開発に寄与できると考える。

#### 審査結果の要旨

水圧で遺伝子・薬物・細胞を臓器・組織内へとデリバリーする方法であるハイドロダイナミック遺伝子導入法 Hydrodynamic gene delivery (HGD) を用いた臓器選択的な遺伝子導入を用いて、ヒト膵発癌関連遺伝子を野生型ラットの膵臓に選択的に導入し、ヒト膵癌に近似した病態を呈する膵癌動物モデルを確立し、膵癌の病態解明のための解析を行った。野生型ラットを対象として、門脈を一時的に遮断し上腸間膜静脈から Kras、KrasG12D、Myc、Yap などのヒト膵発癌関連遺伝子の発現プラスミド DNA 溶液を単独あるいは組み合わせて導入し、発癌の有無を検証した。得られた組織を用いて、組織学的な分化度の差異、血清学的マーカーの有用性を検証するとともに、発癌に関連する分子シグナル伝達機構の解析を行った。

KrasG12D を導入した個体では、HGD 後 4 週で主膵管内に膵管内上皮腫瘍性病変が発生し、また腺房細胞の導管様細胞への変化 (Acinar-to-ductal metaplasia; ADM) を認めた。5 週時点で ADM の範囲拡大とそれに連続する腺癌と著明な間質増生を認め、浸潤性膵癌へと発展した。KrasG12D と Yap を組み合わせて、2 回導入した個体では最も効率的に発癌し、遺伝子導入後、5 週で 80% に膵癌に近似する膵腫瘍が発生した。HGD 後 8 週以上の長期観察例では、肝転移、皮下転移、播種巣をも認め、組織学的にも悪性度が上昇した。免疫染色では、膵原発巣、転移巣ともに Ki67 陽性細胞数の増加と p53、CK7、CK20 染色で陽性を示し、膵癌及びその転移として矛盾しない所見であった。興味深いことに、KrasG12D と Yap を組み合わせて導入した個体では、KrasG12D 単独導入群と比較して、膵癌細胞の N カドヘリンの発現上昇と E カドヘリンの発現低下による上皮

間葉転換を認め、腫瘍細胞の浸潤能・遊走能が亢進していることが推測された。血清学的マーカーとしての CA19-9 の中央値は KrasG12D+Yap 群で 135.5 U/ml と control 群の 75.4 U/ml に比較し上昇した ( $p=0.013$ )。ウェスタンブロット法による発癌メカニズムの解析では、KrasG12D 及び Yap の HGD 後、Erk、Akt、TGF $\beta$ 、CTGF の関与するシグナル伝達経路の活性化を認め、ヒト膵癌を模倣した腫瘍形成と、発癌シグナル伝達を認めた。

膵臓選択的な HGD により膵癌モデルラットを確立し、Molecular Therapy Nucleic Acids に誌上発表しており、学位論文として価値のある研究成果であると判断しました。