

TFF1 ノックアウトマウスを用いた新規膵発癌マウスモデルの開発

名古屋大学大学院医学系研究科
腫瘍外科 助教 山口淳平

1. 研究の背景・目的

膵癌は難治性の悪性疾患であり、患者全体の5年生存率は約5%と推定されている。膵癌の予後を改善するためには、膵発癌機構の解明および再発進行膵癌に対する新たな治療戦略の開発が必須である。

Trefoil Factor Family (TFF) は主に消化管上皮で発現する粘液産生関連分泌型タンパクであり、3つのサブタイプが存在する。その役割は消化管粘膜の再生に関するものとされてきたが、近年、TFFは癌抑制因子として作用しているとする報告が散見され注目されている(1)。TFF1は胃粘膜上皮に発現しており、TFF1KOマウスの胃粘膜にはhigh grade dysplasiaが発生するとされ(2)、TFF1は胃癌抑制因子として作用していることが示唆されている。膵癌の前癌病変として、Pancreatic Intraepithelial Neoplasm (PanIN) および Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN) の存在が指摘されている。我々はこれまでの研究で、これらの前がん病変にTFF1が過剰に発現していることを突き止めた。一方、浸潤性膵管癌においてはこのTFF1の発現が失われている。これらの結果は、TFF1が膵前癌病変において腫瘍抑制因子として作用しており、またTFF1発現喪失が浸潤癌の発生につながることを示唆している。

KRAS 遺伝子の変異は膵癌の9割以上で認められる、膵癌発生の最も重要なドライバ遺伝子の一つである。KRAS 変異は膵癌化過程の比較的早期に起こる遺伝子異常と考えられ、PanINやIPMNなどの前癌病変においてもその変異が報告されている。遺伝子改変マウスモデルを用いた研究では、膵特異的にKRAS/G12D変異を導入するとPanINが発生するが、悪性腫瘍はほとんど発生しない(3)。つまりKRAS変異で引き起こされる前癌病変は何らかの癌抑制因子によって悪性転化を制御されている状態であることが示唆される。実際、KRAS変異マウスがさらにp53、INK4A、TGF β などの癌抑制遺伝子を欠損すると膵癌が発生することが報告されており(4,5)、これを裏付けている。これらの事から、膵前癌病変で発現しているTFF1もまた、KRASによる膵癌過程を制御する膵癌抑制因子であることが推察される。

本研究の目的は、TFF1 が膵発癌過程において癌抑制遺伝子として作用する機序を解明することであり、また TFF1 の腫瘍抑制効果を膵癌治療に活用する方法を模索することである。

2. 研究の対象ならびに方法

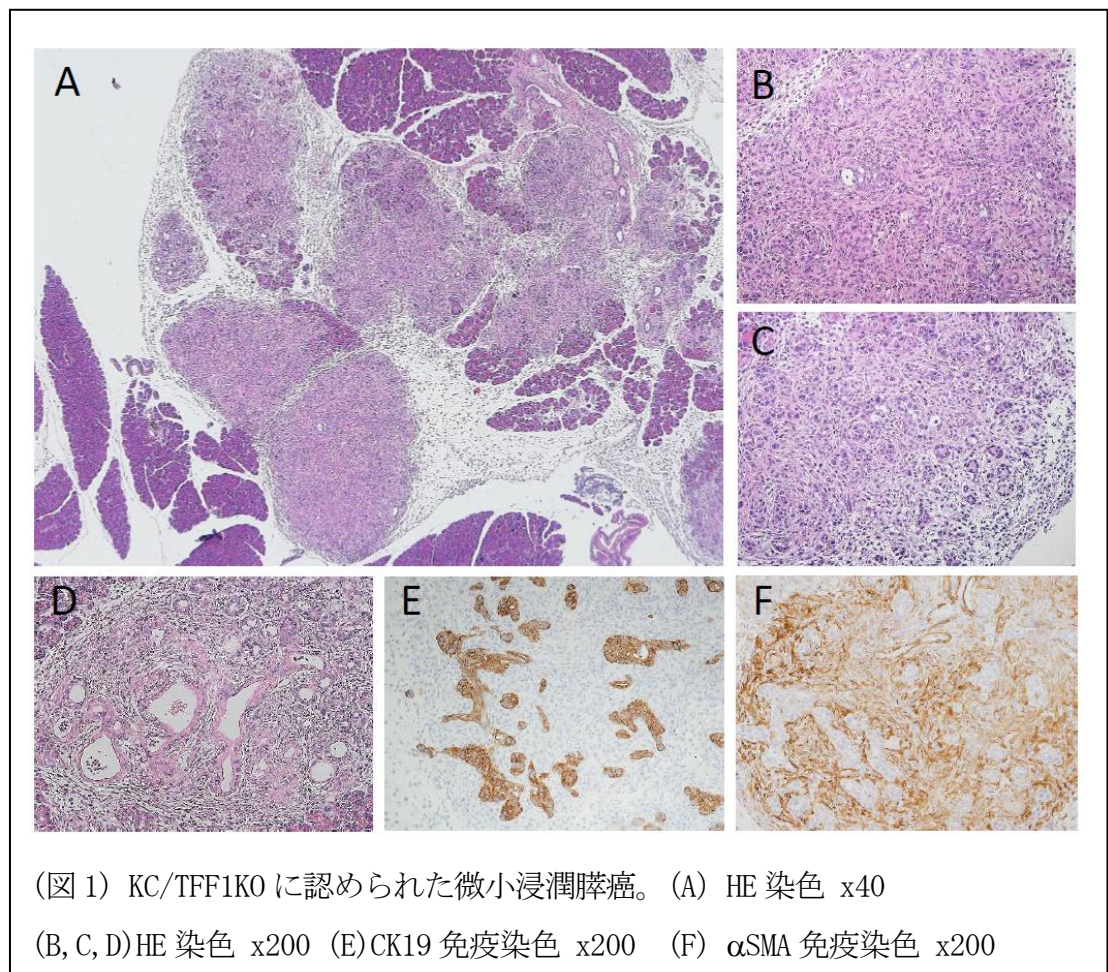
遺伝子改変マウスモデルを用いて TFF1 の抗腫瘍効果を検討した。TFF1 ノックアウトマウス (TFF1KO)、KRAS 変異マウス (LSL-KRAS^{G12D})、Pdx1-Cre マウスを交配して Pdx1Cre/KRAS/TFF1KO マウスを作成し、遺伝子変異を導入した。このマウスでは全組織において TFF1 が欠損すると同時に、膵臓および十二指腸では Cre-loxP システムの作用で KRAS 変異が発現する。Pdx1Cre/KRAS (KC) マウス、TFF1KO マウス、Pdx1Cre/KRAS/TFF1KO (KC/TFF1KO) マウスを月齢 3, 6, 12 において sacrifice し、膵臓標本作製して腫瘍性病変の有無、性状などを比較検討し、また免疫染色により腫瘍性病変の分子学的特徴を検討した。

また、膵癌培養細胞に対して siRNA を transfection し、in vitro における TFF1 欠損の効果を検討した。ヒト膵癌培養細胞株 (panc1, PK9) を対象とし、検討項目は細胞増殖能 (MTT assay, BrdU assay)、細胞浸潤能 (Boyden chamber assay) を行った。浸潤能の評価とともに SNAIL などの EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) 関連マーカーの推移も検討し、TFF1 と EMT の関係についても評価した。

3. 研究結果

(1) 遺伝子改変マウスモデルの検討

対象群として TFF1KO マウスを月齢 12 か月まで経過観察したが、明らかな疾病の兆候は認められず、また月齢 12 か月における膵臓には病理学的に腫瘍性病変を認めなかった。KC マウスの膵臓には月齢 6 か月の時点で PanIN の発生を認めたが、悪性腫瘍の発生は認められなかった (n=5)。免疫組織染色を施行したところ、正常膵組織には TFF1 の発現を認めなかったが、PanIN には著名な TFF1 発現が認められた。一方、月齢 6 か月の KC/TFF1KO マウス (n=5) の膵臓には KC マウスと比較して広範囲に PanIN の発生が認められ、またその腫瘍細胞は免疫染色で EMT マーカーである SNAIL に陽性を示した。さらに KC/TFF1KO マウスには微小浸潤膵癌の発生を認め (n=4/5)、組織学的には低分化腺癌に相当すると考えられ、 α SMA 陽性癌関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblast: CAF) の著明な増生を伴っていた (図 1)。



それぞれのマウスを月齢 12 か月まで経過観察したところ、KC マウスには悪性腫瘍の発生は認められなかった (n=0/9)。一方、KC/TFF1KO の膵臓では 6 か月齢と同様の微小浸潤膵癌の多発を認めた (n=4/5) 他、多発肝転移を伴う浸潤性膵管癌の発生も認めた (n=1/5)。これらの結果、TFF1 は浸潤癌の発生を抑制する癌抑制遺伝子として作用していることを示唆している。

(2) 膵癌培養細胞株における TFF1 抑制の効果の検討

ヒト培養膵癌細胞株 (panc1, PK9) に対して TFF1siRNA を transfection しその効果を検討した。TFF1siRNA 群は control 群に比べて浸潤能が増強しており、また SNAIL の発現が亢進した。また E カドヘリン発現の減弱と N カドヘリン発現の増強を認め、TFF1 抑制が癌細胞に EMT を惹起することが示唆された。

4. 考察

TFF1 が癌抑制遺伝子であるという指摘はあるものの、それを明確に示した根拠はこれ

までに示されていない。今回我々は TFF1 が膵発癌を抑制している事実を、自然発癌マウスモデルを用いて明らかにした。またその作用機序として、TFF1 は細胞の EMT を抑制することがマウスモデルからも培養細胞実験からも示された。これらの結果は、膵発癌過程の新たな機序を示している。すなわち KRAS 変異による膵発癌は、一旦は TFF1 発現によって抑制される (PanIN における TFF1 発現) が、この TFF1 が失われると前癌細胞は浸潤癌細胞となり、浸潤性膵管癌が発生することが示された。今後は更なる TFF1 の作用機序の解明と、膵癌治療に対する応用方法を検討する必要があると考える。

5. 文献

1. Yamaguchi J, Mino-Kenudson M, Liss AS, Chowdhury S, Wang TC, Castillo CF, Lillemoe KD, Warshaw AL, Thayer SP: Loss of Trefoil Factor 2 From Pancreatic Duct Glands Promotes Formation of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms in Mice. *Gastroenterology* 151 (6): 1232-1244, 2016.
2. Soutto M, Belkhiri A, Piazuelo MB, Schneider BG, Peng D, Jiang A, Washington MK, Kokoye Y, Crowe SE, Zaika A, Correa P, Peek RM Jr, El-Rifai W: Loss of TFF1 is associated with activation of NF-kappaB-mediated inflammation and gastric neoplasia in mice and humans. *J Clin Invest* 121 (5): 1753-1767, 2011.
3. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson D: A. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4 (6): 437-450, 2003.
4. Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS, DePinho RA: Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 17(24):3112-3126, 2003.
5. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Fujitani Y, Fujitani S, Wright CV, Moses HL: Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev* 20 (22): 3147-3160, 2006.