

## 論文の内容の要旨

論文題目 膵癌の発生および進展におけるオートファジーの役割に関する検討  
氏名 今井 光穂

<背景> 膵癌は最も予後の悪い癌の一つである。罹患数はここ 30 年間で 4 倍と増加の一途をたどっているだけでなく、生存率は過去 25 年間で顕著な改善が見られていない。予後の改善のために、より詳細な膵癌の発生および進展のメカニズムの解明が早急に必要である。

ヒト膵癌の大部分は病理組織学的に管状腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma ; PDAC) である。典型的な膵管状腺癌の前癌病変である膵臓上皮内腫瘍性病変 (pancreatic intraepithelial neoplasia ; PanIN) は、正常膵管上皮細胞に *KRAS* などの遺伝子異常が生じることによりを発生する。さらに癌抑制遺伝子 *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* などの遺伝子異常の蓄積や発現異常が加わると、PanIN は、組織学的に PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2, PanIN-3 へと悪性化し、浸潤癌へと進行する多段階発癌に類似した過程を経ると考えられている。

オートファジーは、不要なタンパク質や細胞内小器官などを分解し、再利用する細胞内機構であり、細胞の生存や発生、分化、恒常性の維持に必須である。その過程は、まずオートファゴソームと呼ばれる二重膜が不要なタンパク質やオルガネラを取り囲み、リソソームと結合する。次に結合したリソソームの加水分解酵素の作用により、内部のタンパク質やオルガネラは分解され、分解により生じたアミノ酸やエネルギーは細胞内で再利用される。*Atg5* は、オートファゴソームの伸長に関与する、オートファジーに必須なタンパク質である。

オートファジーと腫瘍との関連に関し様々な報告がある。オートファジーは、腫瘍内が低栄養状態や低酸素などの代謝ストレスに晒されると、自己成分の分解・再利用により腫瘍細胞の生存や悪性化に関与することが示されている。一方で、発癌に関しては、細胞内の不要な細胞内小器官などを分解・隔離する働きを通して、腫瘍発生に抑制的に機能しているという報告もある。

膵癌は代表的な乏血性腫瘍であるため、腫瘍内の癌細胞は、常に低酸素、低栄養状態に曝され

ていると推測される。そうした環境に適応する手段として、オートファジーが利用され、腫瘍の形成及び進展に関与していることが強く疑われる。また、膵癌の大部分に活性型 *KRAS* 遺伝子変異が見られるが、活性型 *Kras* の変異を有する腫瘍は、酸化ストレスの除去や細胞増殖においてオートファジーに依存していることが報告されている。そこで私は、膵腫瘍の発生および進展とオートファジーとの関連を明らかにすることで、オートファジーの機能を調整する薬剤の投与など新しい治療法の開発につながると考え、本研究を行った。

**<結果>** 膵特異的に活性型 *Kras* (*Kras*<sup>G12D</sup>) 変異を発現するマウスでは、ヒトの PanIN の病理所見に酷似した膵前癌病変 (mouse PanIN; mPanIN) を 100% の浸透率で発生するだけでなく、時間の経過とともに mPanIN の悪性が徐々に見られ、一部のマウスに PDAC を生じ、ヒト膵癌を模倣した腫瘍の発生及び進展過程を経ることが報告されている。私は、mPanIN を生じる膵特異的 *Kras*<sup>G12D</sup> ノックインマウスと、オートファジーに必須の遺伝子である *Atg5* 遺伝子のノックアウトマウスを交配し、膵特異的に *Kras*<sup>G12D</sup> を発現し、かつ *Atg5* を欠失したマウスモデルを作製した。このマウスの膵臓に発生する腫瘍を解析することにより、オートファジーと膵腫瘍の関連について検討した。

膵臓の上皮特異的に遺伝子改変を導入するため、胎生期より膵上皮のみに発現する *Ptf1a*(*p48*) 遺伝子のプロモーター下に *Cre recombinase* 遺伝子がノックインされた *p48-Cre* マウスを用いた。この *p48-Cre* マウスと条件的 *Kras*<sup>G12D</sup> ノックイン (*lox-STOP-lox-Kras*<sup>G12D</sup>; *LSL-Kras*<sup>G12D</sup>) マウスを交配させることで、膵特異的に *Kras*<sup>G12D</sup> 変異を導入した。このマウスには exon1 のコドン 12 にグリシンからアスパラギン酸への置換を生じる変異が導入されているが、プロモーター領域に *loxP-STOP-loxP* という配列が挿入されており、*Cre recombinase* が発現する細胞でのみ、*loxP* で挟まれた *STOP* 配列が切り出され、活性型 *Kras* (*Kras*<sup>G12D</sup>) が発現する。また、内在性の *Kras* 遺伝子のプロモーターにより *Kras*<sup>G12D</sup> の発現が調節されることから、生理的レベルでの *Kras* 活性型変異タンパク質が発現すると考えられる。

また、同様の方法で、膵特異的にオートファジーに必須な *Atg5* 遺伝子をノックアウトするため、*Atg5* 遺伝子のエクソンを *loxP* で挟んだ遺伝子座をもつ条件的 *Atg5* ノックアウトマウス (*Atg5*<sup>flox</sup> マウス) を使用した (図 1)。

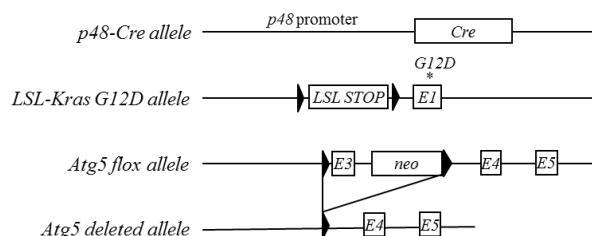


図 1: 使用した遺伝子改変マウスモデル

### 1. 膵前癌病変の発生とオートファジー

まず、膵特異的に *Kras*<sup>G12D</sup> を発現するマウス (*p48-Cre*<sup>+/+</sup>; *LSL-Kras*<sup>G12D</sup><sup>+/+</sup>; PK) と、*Kras*<sup>G12D</sup> を発現し、かつ *Atg5* が欠損したマウス (*p48-Cre*<sup>+/+</sup>; *LSL-Kras*<sup>G12D</sup><sup>+/+</sup>; *Atg5*<sup>flox/flox</sup>; PKAA) の膵

臓の表現型解析を行った。PK マウスでは、生後約 8 週より (Acinar ductal metaplasia/ mouse PanIN; ADM/mPanIN) の形成が始まり、その後徐々に ADM や mPanIN の範囲が拡大し、約 6 ヶ月で膵臓のほぼ全体が mPanIN に占められた。それに対して PKAA マウスでは、4 週頃より腺房細胞から導管様細胞への変化 (ADM) が始まり、5-6 週でその範囲は急速に進行し、8 週齢ですでに膵臓ほぼ全体に広がった (図 2)。すなわち、活性型 *Kras* 遺伝子の変異を持つ全てのマウスの膵臓に mPanIN が見られたが、*Atg5* の欠損によりその発生が著明に早期化することが明らかとなった。

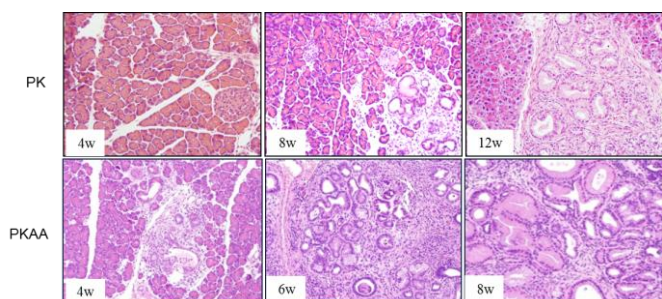


図 2: PK および PKAA マウス膵組織

## 2. 膵前癌病変の悪性化とオートファジー

8 ヶ月齢での PK および PKAA マウスの mPanIN の異型度を、Hingorani らの評価方法に準じて評価した。両群とも、8 ヶ月齢においては、mPanIN への変化を膵臓の大部分 (95%以上) に認めた。PK マウスの膵臓の約 90%以上はグレードの低い PanIN-1 (PanIN-1A : 56%、PanIN-1B : 35%) 病変に占められており、わずかに PanIN-2 (6%) 病変への進行が見られた。しかし、PanIN-3 以上の高い悪性度の病変への進行は確認されなかった。一方、PKAA マウスでは、PK マウスと比較し、より早期に mPanIN が発生するため進行も早いと予測したが、8 ヶ月齢での mPanIN の異型度は PK マウスと有意な差はなく、異型の強い mPanIN (mPanIN-3) への進行は認めなかった (図 3)。すなわち、*Atg5* の欠損は活性型 *Kras* による mPanIN の発生を著明に促進するが、mPanIN の異型度の進行は促進しないと考えられた。また、両群のマウスの膵臓は 95%以上が mPanIN 様病変に変化しているものの、癌化はほとんど確認できなかった (18 ヶ月の経過で癌発生個体数と全個体数の比: PK 0/11、PKAA 1/26)。

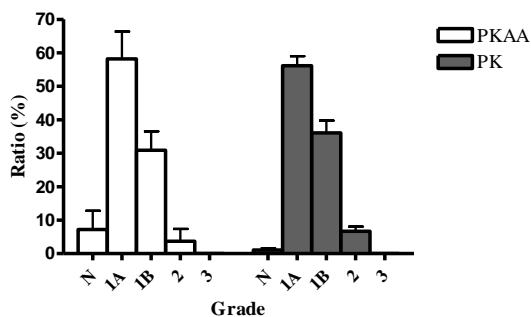


図 3: 8 ヶ月齢における mPanIN のグレード

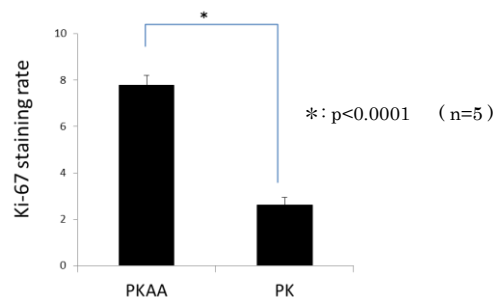


図 4: 生後 4 週齢における Ki-67 陽性核の割合

## 3. オートファジーの機能不全による膵前癌病変の早期化

PKAA マウスは PK マウスと比べて mPanIN の発生が早期化し、生後 4-5 週齢で変化が観察

されたため、まず、PKAA マウスの膵臓において mPanIN への変化がみられる直前の生後 4 週齢における膵臓の細胞増殖を Ki-67 染色にて検討した。4 週齢の PK および PKAA マウスの膵臓はヘマトキシリン・エオジン染色では形態変化は認められないが、Ki-67 陽性細胞の全体の核の数に占める割合は、PK マウスで約 3%であったのに対し、PKAA マウスでは約 8%と、PKAA マウスの膵臓は PK マウスに比べ、Ki-67 陽性細胞の割合が有意に高率であり、細胞増殖が亢進していることが確認された ( $p < 0.00001$ ) (図 4)。また、PKAA マウスの比較的初期の mPanIN においても Ki-67 が強陽性であり、細胞増殖の亢進が示唆された。細胞増殖の亢進の一因として、ERK の活性化の状態を免疫染色及びウェスタンブロット法で確認した。ERK は、Ras-MAPK 経路により活性化し、活性化した ERK は細胞増殖に関与しているとされている。発生初期の mPanIN での p-ERK の発現を、PKAA マウスでは、mPanIN に変化した領域の 50%以上に認めたが、PK マウスでは mPanIN の約 10%に認めるのみであった。また、mPanIN に変化後の 6-8 ヶ月齢のマウスの膵臓においても、PKAA マウスの mPanIN の方が PK マウスよりも p-ERK の発現が上昇していることを免疫染色で確認した。

オートファジーの機能不全は、異常ミトコンドリアを分解できず、活性酸素 (Reactive Oxygen Species; ROS) を蓄積し、ROS の蓄積は DNA 傷害につながる要素を持つ。そこで、mPanIN の発生との関係を ROS の指標とされる 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) や DNA 傷害を  $\gamma$ -H2A histone family, member X ( $\gamma$ -H2AX) を用いて確認した。結果、特に PKAA マウスの ADM/mPanIN の形成直前および発生初期の mPanIN において発現が上昇していることが明らかとなった。

#### 4. 膵前癌病変の癌化とオートファジー

膵前癌病変の発生は 100%の浸透率で膵臓全体に観察されるにも関わらず、癌化が見られない。6 ヶ月齢での PK および PKAA マウスの膵組織は、両群とも大部分が ADM や mPanIN に変化しているが、mPanIN 組織における Ki-67 陽性細胞は PK、PKAA マウスともに少なく、細胞増殖の亢進が維持されていなかった。そこで、この細胞増殖の低下の原因を明らかにするため、細胞老化について検討を行った。細胞老化のマーカーである (Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase; SA- $\beta$ -gal) 染色を行なったところ、両群共に、mPanIN 組織において SA- $\beta$ -gal が強陽性を示し、細胞老化が亢進していることが示唆された。

<考察> 本研究では、*Kras*<sup>G12D</sup>変異を持つ膵癌とオートファジーとの関係に関して検討を行った。*Kras* 変異を持つ膵癌モデルマウスを使用し、*Atg5* のノックアウトによりオートファジーを抑制したところ、オートファジーが機能するマウスと比較し、早期に膵前癌病変を形成した。しかしながら *Atg5* の欠損は、悪性を促進しなかったことから、オートファジーは *Kras* 変異により生じる膵前癌病変の発生を抑制するが、悪性は抑制しないことが示唆された。前癌病変の形成の早期化の原因として、オートファジーの抑制と *Kras* 変異により ERK が早期に活性化し、細胞増殖が亢進すること、および、活性酸素の蓄積から DNA 傷害が惹起されることが考えられた。また、オートファジーの欠損により、*Kras* 変異によって膵前癌病変の後期に誘導される細胞老化を抑制できないために、前癌病変の悪性を促進しない可能性が考えられた。