

# 膵炎原因遺伝子変異は膵発癌を促進するか

東北大学病院 医学系研究科 消化器病態学分野

池田 未緒

## I 要 旨

本研究では膵特異的 Spink1 欠損を膵癌モデルマウスである KPC マウスへ付加したところ、早期に死亡することが判明した。膵特異的 Spink1 欠損マウスにおいては生後 90 日まで生存することが確認されていたが、血液生化学検査では有意な異常は認めなかった。生後 30 日時点の膵特異的 Spink1 欠損マウス膵組織におけるアミノ酸含有量はコントロールマウスに比較し、低下はみられなかった。ヒト SPINK1 遺伝子のプロモーター領域クローニングにより作成したルシフェラーゼレポーターは既報で SPINK1 誘導が確認されているプレオマイシンにより活性が増加した。樹立したレポーター安定発現細胞でもプレオマイシンによる転写活性化が確認可能であった。膵特異的な変異 Kras 発現と Spink1 欠損は膵腺房細胞の変性・脱落を促進する可能性があり、今後検討を要する。

## II 目 的

膵癌の進展過程では癌細胞と間質細胞、特に膵星細胞との細胞間相互作用が悪性化に深く関与する。膵癌微小環境中の炎症は癌細胞のストレス応答機構活性化代謝リプログラミングを介して増殖や転移を促進する。膵星細胞の産生する細胞外基質やサイトカインは癌細胞の増殖促進のみならず免疫細胞の機能を抑制し、癌細胞の保護に寄与する。遺伝性膵炎は早期から膵炎発作を反復し、発癌リスクが高いことで知られ

ている<sup>1)</sup>。遺伝性膵炎の原因遺伝子の一つである SPINK1 は膵分泌性トリプシンインヒビターをコードするが、全身性に Spink1 を欠損するマウスでは生後早期より膵組織の変性・脱落が進行し、早期に死亡するモデルとなった<sup>2)</sup>。当教室では兵庫医科大学 大村谷教授より Spink1 flox マウスの供与を受け、Pdx-1-Cre マウスとの交配により膵特異的 Spink1 ノックアウトマウスを作出した。本マウスは全身性 Spink1 欠損マウスとは異なり生後 90 日まで生存し、明らかな体重減少などは認めないことを確認している。しかしながら膵実質においては腺房細胞の脱落と線維化が確認され、緩徐な膵線維化を来すモデルマウスであると考えられた。本研究計画では膵特異的に変異 Kras・p53 を発現する膵癌モデルマウス、KPC マウスへ膵特異的 Spink1 ノックアウトを追加し、Spink1 欠損による膵の炎症が癌進展を促進しうるか、また Spink1 欠損が種々の細胞において細胞機能を変化させるか明らかにすることを目的とする。

## III 方 法

### 1 KPC マウスへの Spink1 欠損付加による影響の確認

膵特異的に変異 Kras・p53 を発現する KPC マウスへ Spink1 floxed background を追加し、Spink1 を膵特異的に欠損する KPC マウスを作出した。マウスの生存率・出生後体重の推移を評価した。

## 2 膵特異的 Spink1 欠損マウスの血液生化学・膵組織解析

膵特異的 Spink1 欠損マウスについて、生後 90 日齢で犠牲死させ組織解析・血液生化学データを収集した。

## 3 膵特異的 Spink1 欠損マウスの組織中アミノ酸分析

生後 14 日齢の膵特異的 Spink1 欠損マウス・Spink1 floxed マウス膵組織を用いて、質量分析により含有アミノ酸量の比較を行った。

## 4 SPINK1 発現誘導レポーター細胞の作成

ヒト SPINK1 遺伝子の転写開始点上流約 4kb の配列を pGL4 ベクター (Promega) へクローニングした。既報にて SPINK1 誘導作用が報告されているブレオマイシン処理で SPINK1 発現誘導が確認できるヒト大腸癌細胞株、HCT116 ヘトランスフェクションを行い、安定発現細胞株を樹立してルシフェラーゼアッセイを行った。

## IV 結 果

### 1 KPC マウスへの Spink1 欠損付加による影響の確認

KPC マウスへの Spink1 欠損付加につき、図 1 に示す。膵特異的変異 Kras 発現 Spink1 ノックアウトマウスは生下時より体重増加が不良であり、生後 1 か月までに全数が死亡することを確認した。全身性の Spink1 ノックアウトマウスと類似した表現型であった。

### 2 膵特異的 Spink1 欠損マウスの血液生化学・膵組織解析

生後 90 日齢に達した膵特異的 Spink1 欠損マウス・Spink1 片アレル欠損マウス膵組織を確認したところ、膵特異的 Spink1 欠損マウスにおいて腺房細胞の脱落と線維化を確認した。解析時の血清アミラーゼ値・白血球数・Hb 値を比較したところ、有意な差は認めなかった (図 2)。

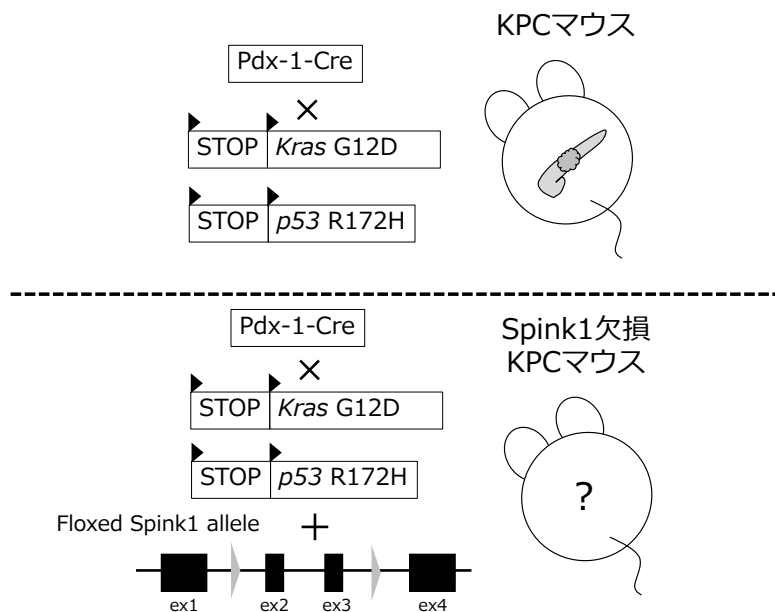


図 1 KPCマウスへのSpink1欠損付加模式図

### 3 膵特異的 Spink1 欠損マウスの組織中アミノ酸分画解析

膵特異的な Spink1 欠損が膵組織中のアミノ酸組成に与える影響を評価するため、30 日齢

のマウス膵組織の含有アミノ酸分画を比較した。(図 3)。Spink1 floxed mouse と比べ、膵組織中含有アミノ酸で明らかな低下を示すものは認めなかった。

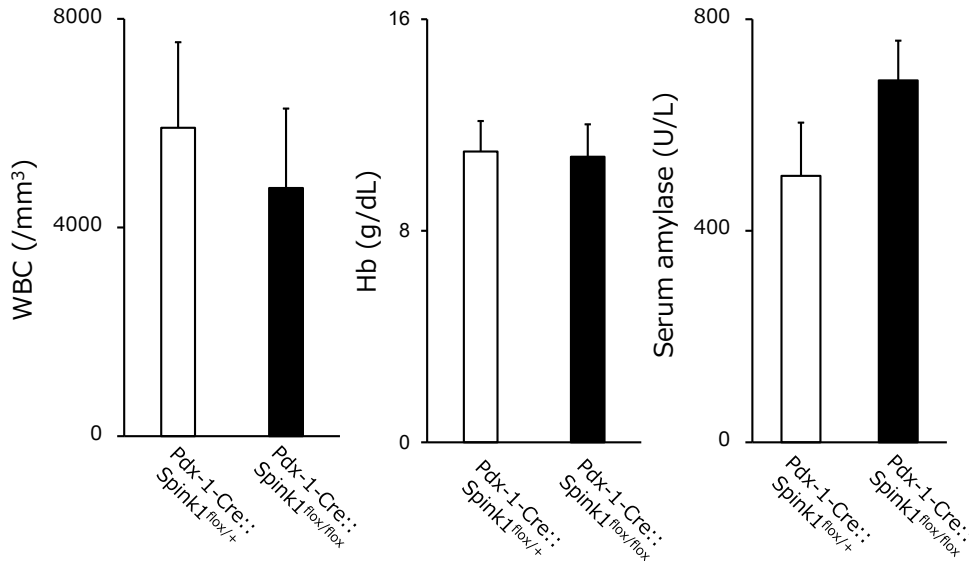


図 2 生後90日齢の膵特異的Spink1片アレル欠損マウス・膵特異的Spink1ノックアウトマウスにおける血液生化学所見 (N=7-8)

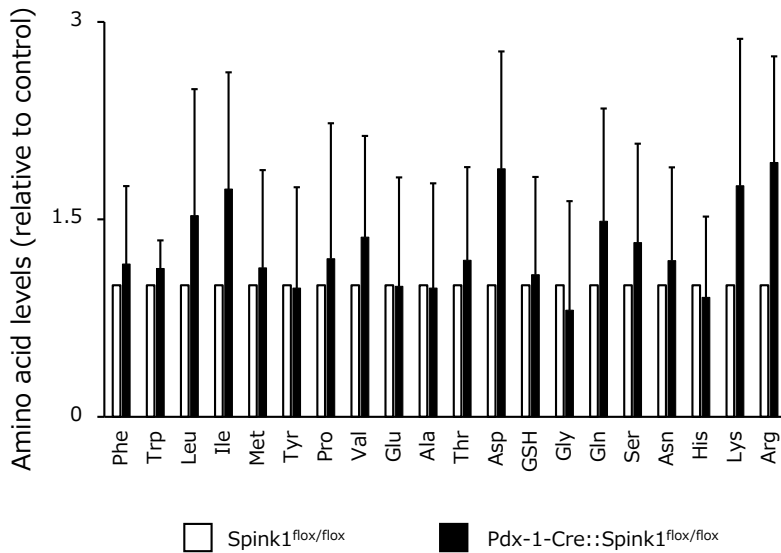


図 3 生後30日時点のSpink1 floxedマウスに対する膵特異的Spink1ノックアウトマウス膵組織(N=2)のアミノ酸含有比

#### 4 Spink1 発現誘導レポーター細胞の作成

SPINK1 遺伝子の転写開始点上流約 4kb のレポータープラスミドを transient transfection した HCT116 細胞をブレオマイシン 50  $\mu$ g/ml で処理したところ、レポーター活性の上昇が認められた (図 4)。本レポーターベクターを安定発現する細胞株をネオマイシンによるセクションで樹立し、ホタルルシフェラーゼ活性を評価したところ活性上昇を確認可能であった。

### V 考 査

膵特異的な Spink1 欠損マウスに変異 Kras 発現を付加することにより、早期に死亡する表現型となることを確認した。このような表現型は全身性の Spink1 欠損マウスや膵特異的変異 Kras 発現に酸化ストレス応答の制御因子、Keap1 欠損を付加したマウス<sup>3)</sup>と類似してい

る。変異 Kras による膵発癌を促進する以前に膵組織の広範な変性が起こっている可能性があり、解析時期を早めて組織所見を確認する予定である。膵特異的 Spink1 ノックアウトマウスにおいては血液生化学検査で生後 3 か月まで大きな異常をきたさないことが確認できたため、より長期間の飼育で膵内外分泌機能不全を生じるか評価することとする。膵組織の含有アミノ酸分画では大きな異常は見られなかったが、より長期間飼育後の変化を確認するとともに、ヒト慢性膵炎症例の血清検体で変化がみられるか、膵外分泌機能との相関が確認できるか評価を予定している。ヒト SPINK1 遺伝子プロモーター領域のクローニングによりレポーター細胞の樹立が可能であり、SPINK1 を高発現する膵由来の細胞株を用いて新たなレポーター細胞株樹立・SPINK1 誘導剤のスクリーニング基盤確立を進める。

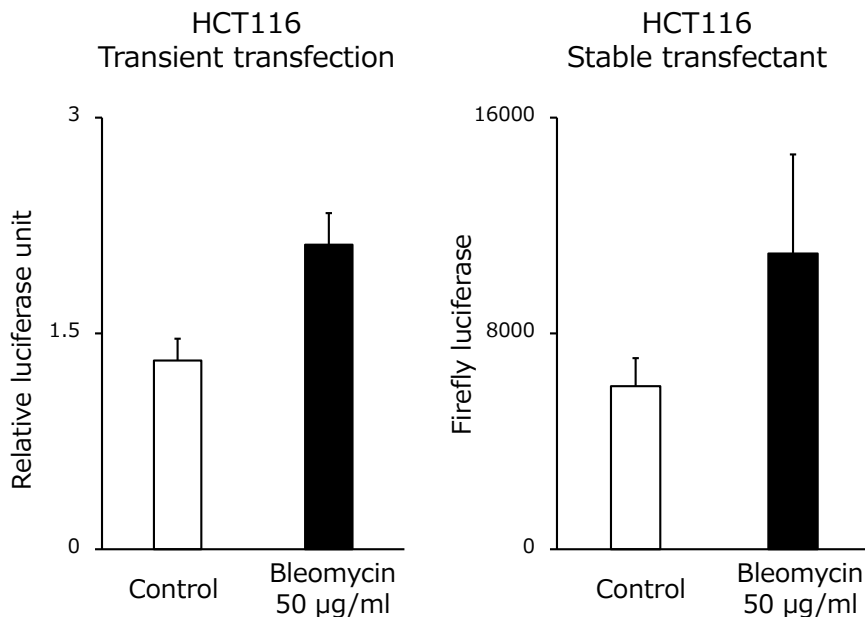


図 4 HCT116細胞を用いたレポーターアッセイ：Transient transfectionはdual luciferase アッセイにて (N=4)、安定発現細胞株はFirefly luciferase活性測定により評価 (N=6)

## VI 結 語

膵特異的 Spink1 ノックアウトは単独ではマイルドな膵線維化モデルであるが、他遺伝子の改変により致死的な表現型となりうる。膵発癌の初期段階における Kras と Spink1 の関連につき、さらに検討を進める。

### 参考文献

- 1) Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Whitcomb DC. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(6): 442-446.
- 2) Autophagic cell death of pancreatic acinar cells in serine protease inhibitor Kazal type 3-deficient mice. Ohmuraya M, Hirota M, Araki M, Mizushima N, Matsui M, Mizumoto T, Haruna K, Kume S, Takeya M, Ogawa M, Araki K, Yamamura K. *Gastroenterology.* 2005; 129: 696-705.
- 3) Simultaneous K-ras activation and Keap1 deletion cause atrophy of pancreatic parenchyma. Hamada S, Shimosegawa T, Taguchi K, Nabeshima T, Yamamoto M, Masamune A. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2018; 314: G65-G74.