

膵がんの早期診断マーカーの探索

名古屋市立大学大学院医学研究科

分子毒性学分野 助教

深町勝巳

膵がんは早期発見が最も難しいがんのひとつであり、予後不良な難治がんである。膵がんの克服には、早期病変を発見して治療を開始することが必須である。しかしながら、現在、血清診断・画像診断を含め早期発見を可能にする有効な診断方法はない。早期診断のためには、簡便に健康診断での侵襲性の少ない血液検査で行う発症前診断を行える、より感度の高い簡便な早期診断を可能とする血清診断マーカーの開発が必要である。

本研究では、難治がんである膵がんの早期診断マーカーを探索することを目的とした。血清診断マーカーの開発のためには、膵がんの初期病変から膵がんに至るまで経時的に観察、サンプル採取が可能な動物モデルが必要である。我々は、Cre/loxP システムを用いたヒト活性型 Ras トランスジェニックラットにおいて、化学発がんでは発生させることが困難な、膵管がんを発生させる方法を開発してきた。これまでにハムスターにニトロソアミンの一種である化学発がん物質 (BOP, N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine) を投与して膵管がんを発生させるモデルが利用されてきたが、ハムスターの遺伝情報の不足のため遺伝子発現解析は容易ではなかった。ラットはゲノムプロジェクトも完了し、遺伝情報が豊富にあり、アレイ解析等の利用も容易である。このモデルにおいては初期病変 (PanIN) からがんに至るまでのヒトに極めて類似した種々の段階の病変を発生させることが可能であり、ヒトでは困難な早期病変の採取が可能である。既に N-ERC をはじめとする診断マーカーの候補となりうるいくつかの遺伝子をマイクロアレイにより同定している。N-ERC はヒト膵管がんが発現しており、有用なマーカーとなることが期待される。

本研究では、我々の開発した活性型 Ras トランスジェニックラット膵管がんモデルを用いて膵管がんの血清診断法を開発し、その知見に基づきヒトの膵管がんを早期のステージに診断できる血清診断システム確立のための基礎的な研究を行った。Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AxCANCre) を、ras トランスジェニックラットの総胆管から膵管内に注入することによって膵管がんを発生させ、これら腫瘍性病変の発生したラットにおいて発現変化するタンパクを同定することにより、ヒトに応用可能な膵がんの診断マーカーの開発を行うための基礎的な研究を行った。

アデノウイルスの E1 領域を欠き自己増幅能がない AxCANCre を E1 遺伝子をもつ HEK293 細胞に感染させ増幅させた。細胞を回収し凍結融解の後、AxCANCre を含む上清より、限外濾過により AxCANCre を精製した。精製したウイルス液を段階希釈し、それぞれ HEK293 細胞に感染させ、抗アデノウイルス抗体により感染細胞を染色することにより力価を測定した。膵がんを発生させるため、精製した AxCANCre (6×10^8 ifu/rat) を活性型 Ras トランスジェニックラットの膵臓に感染させ、膵臓においてのみ活性型 Ras を発現させた。AxCANCre はラットを開腹し、総胆管経由で膵管に注入した。AxCANCre 注入後、4 週後に屠殺解剖を行い、膵組織のマクロ撮影、採取を行った。発生した膵がんは、病理解析の結果、間質の豊富な膵管がんであり、ヒト膵管がんの組織と極めて類似していた。腫瘍性病変は他の臓器にはなかった。

採取した組織を用いプロテオミクス解析を行い、ヒト膵がんが発現するタンパクがこのモデルにおいて検出されるか検討した。膵管がんと、その周囲の正常部位とを比較し発現量の異なるタンパクを LC-MS/MS 解析により同定することを試みた。採取した膵臓をホルマリン固定し、病理標本を作製した。ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックより、 $10 \mu\text{m}$ の厚さに薄切スライド標本を作製し、がん部・がん周囲の正常部組織を顕微鏡下にてそれぞれ分取した。分取した組織よりタンパク溶解液にてタンパク溶液を調整した。溶液中のタンパクはトリプシンにて消化した。トリプシンにて前処理し乾燥させたサンプルは、iTRAQ 試薬でがん部・非がん部をそれぞれラベルした。ラベルしたサンプルは混合し、イオン交換クロマトグラフにより精製した。精製したサンプルは、LC-MS/MS 解析による発現量の異なるタンパクの同定に用いた。

LC-MS/MS 解析により同定されたペプチドより、94 種のタンパクががん部・がん周囲の正常部で共に検出、同定された。その内、膵がんが発現上昇している 30 個のタンパクを同定できた。中でも、21 個はヒト膵がんが発現亢進していると報告があるものだった。

以上より、本ラット膵がんモデルはヒトと同様の生物学的特性を示すことが確認され、本モデルを用いればヒト膵がんの診断マーカーを検索可能なことが示唆された。動物モデルでは、早期膵がんのサンプルを容易に得ることが可能なため、特に早期診断のためのマーカーの検索に応用可能なことが期待される。膵がんが発現上昇していると新規に同定された 9 個のタンパクについて、今後、診断マーカーとなり得るか検討を行いたい。