

研 究 報 告 書
2019 年度：A 課題

令和 3 年 3 月 3 1 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 国立大学法人神戸大学

住 所 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1

研究者氏名 西 川 義 浩



(研究課題)

膵癌の維持・進展において Hes1 が果たす役割の解明

令和 2 年 3 月 1 2 日付助成金交付のあった標記 A 課題について研究が終了致しましたので
ご報告いたします。

【要旨】

膵癌は予後不良な最難治癌である。KRAS 遺伝子変異を高率に認め、膵癌の病態形成において重要な役割を担うと考えられているが、その詳細は未だ不明な点が多い。申請者らは、Notch シグナリングの重要な下流因子である Hes1 に着目し、膵癌の病態形成における役割を、治療標的としての可能性に着目しながら *in vivo*・*in vitro* の実験系を用いて検討した。膵癌における Hes1 の詳細な役割の解明には更なる検討が必要と考えられる。

【背景・目的】

膵癌は本邦における悪性腫瘍死亡原因の第 4 位を占める最難治癌である。膵癌は多数の遺伝子異常の蓄積により、化生性変化 (ADM; acinar-to-ductal metaplasia)、膵前癌病変 (PanIN; pancreatic intraepithelial neoplasia) を経て多段階に浸潤癌へと至ることが知られている。なかでも KRAS 遺伝子変異は膵癌の形成・進展において極めて重要な役割を担うと考えられているが、その詳細な分子メカニズムには未だ不明な点が多い。

申請者らは、Notch シグナルの下流分子 Hes1 が膵前癌病変 (ADM・PanIN) から膵浸潤癌に至るまで幅広く発現していることに着目し、膵癌形成における Hes1 の役割について解析を行ってきた。その結果、①膵上皮細胞において KRAS 遺伝子変異の導入が Hes1 の発現を誘導すること、②変異 KRAS/TP53 遺伝子を用いた膵癌マウスモデルにおいて、Hes1 遺伝子の

ノックアウトにより膵癌の形成が抑制されることを確認し、Hes1 が KRAS 遺伝子変異による膵癌の initiation において重要な役割を担うことを明らかにした(1)。さらに膵発癌における Hes1 の重要性から、その阻害が治療標的となり得るのではないかと考え、新規 Hes1 阻害剤を上杉志成教授(京都大学)と共同開発し、報告した(2)。

これら知見を応用し、本研究では新たな遺伝子改変技術を用い、形成された膵癌における Hes1 の阻害がその維持や進展に与える効果を解析し、Hes1 が膵癌の治療標的となり得るかどうかについて検討することを目的とする。

【方法】

1. 膵癌の維持・進展における Hes1 の機能解析 (*in vivo*)

Dual recombinase システム (Flp/Frt システムと Cre/LoxP システムを組み合わせた遺伝子組み換えシステム)を用いて、任意の時期にタモキシフェン誘導下に Hes1 のノックアウトが可能な膵癌マウスモデル (Pdx1-Flp;FSF-KrasG12D;Trp53frt/frt;Rosa26-FSF-CreERT2;Hes1^{lox/flox})を作成する。同マウスにおいて、膵癌形成後に Hes1 をノックアウトし、その後の病変の変化を組織学的に評価し、膵癌の維持・進展における Hes1 の役割を解析する。

2. 膵癌における Hes1 の機能解析 (*in vitro*)

上記膵癌マウスモデルにおいて形成された膵癌から cell line を樹立する。作成した cell line に対して水酸化タモキシフェンを投与することで *in vitro* で Hes1 をノックアウトする。膵癌細胞株に与える Hes1 の役割を解析する。作成した膵癌細胞株の Hes1 野生型、ノックアウトの両方から RNA を抽出し、RNA シークエンスによる解析を行い、どのようなメカニズムであるかの検討を行う。

【結果】

1. マウスモデルにおいて Hes1 のノックアウトは膵癌・膵癌前癌病変の進行を促進する

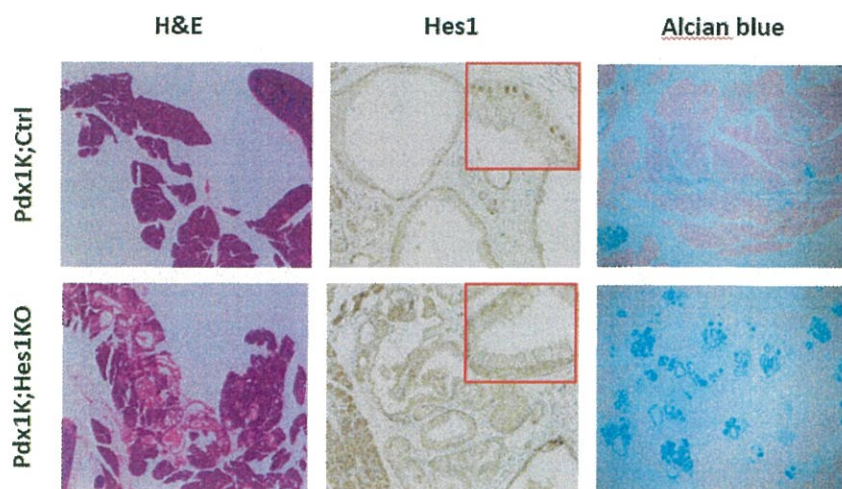
上記の dual recombinase システムを用いて、膵癌の前癌病変とされる PanIN において、Hes1 の役割につき検討した。PanIN 形成後のマウスにタモキシフェンを投与し膵特異的に Hes1 をノックアウトしたマウスと、Hes1 野生型マウスについて、比較検討を行った。Hes1 ノックアウトマウスにおいて、PanIN の占める割合は Hes1 野生型マウスに比べて有意に高く、Hes1 が PanIN の進行に対し抑制的に働いている可能性が示唆された(図 1)。

次に、膵癌形成後のマウスにタモキシフェンを投与し膵特異的に Hes1 をノックアウトしたところ、PanIN における結果と同様に、Hes1 ノックアウトマウスにおいて膵癌の占める割合が有意に多く、Hes1 が膵癌の進展に対し抑制的に働いている可能性が示唆された。

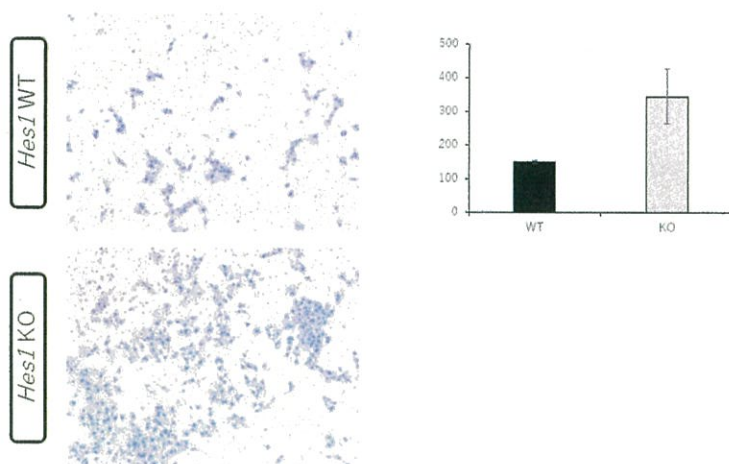
2. 膵癌における Hes1 の機能解析 (*in vitro*)

上記マウスモデルから作成した cell line に対し水酸化タモキシフェンを投与し、Hes1 ノックアウト膵癌細胞株を作成した。Scratch assay, invasion assay を用いて Hes1 野生型細胞株と遊走能・浸潤能の差異を検討した。Hes1 ノックアウト膵癌細胞株において、遊走能・浸潤能の亢進を認めた(図 2)。

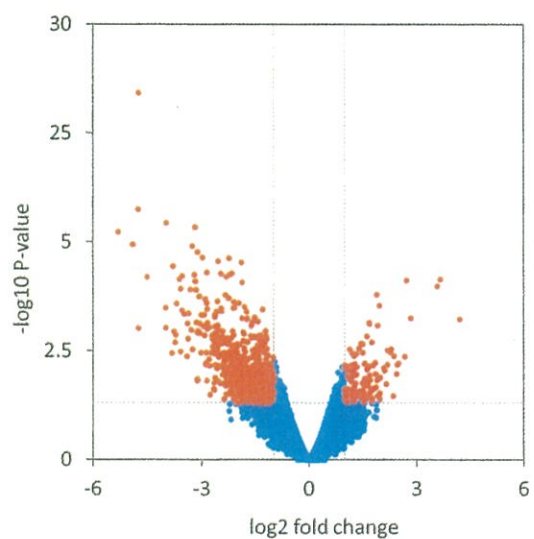
更に RNA シークエンス解析を行ったところ、膵癌において悪性度に関連するいくつかの遺伝子の発現上昇を確認した(図 3)。



(図 1) Hes1 ノックアウトおよび野生型における PanIN 形成の評価



(図 2) Invasion assay



(図 3) RNA シーケンス解析 (Volcano plot)

【考察】

我々はこれまで、Hes1 が膵前癌病変の形成において、腫瘍促進的に働くこと、膵癌細胞株において Hes1 の阻害が抗腫瘍効果を発揮することを示し、報告してきた(1, 2)。また一般に、Hes1 は幹細胞性、転移、抗癌剤抵抗性などに関わるとされ、腫瘍促進的に働くと考えられている(3)。我々はこれらの所見より、Hes1 が膵癌の維持・進展においても重要な役割を果たすと考え、また、治療標的としての可能性を念頭に今回の研究を行った。

しかしながら、膵癌マウスモデルの検討では予想に反し、Hes1 のノックアウトにより腫瘍形成が促進するという結果となった。更に、膵癌モデルマウスから樹立した膵癌細胞株において、Hes1 の有無が細胞増殖能に与える影響を検討したところ、マウスモデルの結果同様、Hes1 のノックアウトが腫瘍増殖を促進するという結果であった。

今回の結果は、これまでの我々の結果および一般的な Hes1 の機能とは相反する結果であった。我々は今回の結果との乖離の原因の探求を行うため、RNA シークエンス解析から得られた結果などを用いて、更なる解析を進めている。

【結語】

膵癌は予後不良な疾患であり、その病態解明および新規治療法の開発が求められている。我々は膵癌における Hes1 の機能を明らかにする事を目標に今後も研究を継続していく予定である。

【参考文献】

1. Nishikawa Y, Kodama Y, Shiokawa M, Matsumori T, Marui S, Kuriyama K, et al. Hes1 plays an essential role in Kras-driven pancreatic tumorigenesis. *Oncogene*. 2019; 38(22):4283-96.
2. Perron A, Nishikawa Y, Iwata J, Shimojo H, Takaya J, Kobayashi K, et al. Small-molecule screening yields a compound that inhibits the cancer-associated transcription factor Hes1 via the PHB2 chaperone. *The Journal of biological chemistry*. 2018; 293(21):8285-94.
3. Liu ZH, Dai XM, Du B. Hes1: A Key Role in Stemness, Metastasis and Multidrug Resistance. *Cancer Biol Ther*. 2015:0.

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、研究助成のご支援を賜りました公益財団法人がん研究振興財団に深く感謝申し上げます。