

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09390

研究課題名(和文)膵前癌病変進行の閾値を司るヒストン修飾システムの解明と治療標的化戦略

研究課題名(英文) Analysis of histone modification system that governs the progression of pancreatic oncogenesis

研究代表者

立石 敬介 (TATEISHI, KEISUKE)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20396948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膵発癌機序におけるエピジェネティクス機構の重要性を明らかにすることを目的とした。具体的には遺伝子改変膵癌自然発症マウスとヒストンメチル化酵素のKOマウスとを交配し、ヒストンメチル化酵素Ehmt欠損マウスでは膵癌前駆病変の進行が遅延することを明らかにした。さらにまたEhmtの下流で膵前癌病変進行に重要な役割を持つ分子を解析した。これらのデータはEhmtがマウス膵においてKras遺伝子変異存在下での腫瘍発生に重要な役割を果たしていることを示唆するものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌においては代表的な4つの遺伝子変異がよく知られているが、それらの存在のみが膵前癌病変の進行に必要な十分であるとはいえない。エピジェネティクス修飾は遺伝子発現を調節する機構であり、癌における重要性も明らかになりつつあることから、それらを標的として制御する薬剤も開発されつつある。本研究において膵癌の発生進行に関わるエピジェネティクス修飾機構が明らかにされ、その意義が解明されることによる臨床的有用性は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we sought to unravel the significance of epigenetics regulation in pancreas carcinogenesis. The pancreas-specific KrasG12D mice spontaneously developing pancreatic neoplasms were crossed with the EHMT deficient mice. EHMT deficiency suppressed the malignant progression of pancreatic precancerous lesions under Kras activation, suggesting the significance of histone modification processes regulated by EHMT in pancreatic oncogenesis. In addition, we analyzed the genes responsible for the protumorigenic effects of Ehmt.

研究分野：消化器病学

キーワード：膵癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌の自然史におけるゲノム異常の重要性は言をまたない。膵癌は、*KRAS* 遺伝子の活性型変異に *P16*, *P53*, *SMAD4* などの腫瘍抑制遺伝子の異常が加わる多段階発癌の寄与が考えられ (Hruban et al., Am J Surg Pathol 2001) それは遺伝子改変マウスモデルの交配でヒト膵癌類似の腫瘍発生を再現できることでも裏付けられている (Hingorani et al., Cancer Cell 2003 & 2005; Aguirre et al., Genes Dev 2003; Bardessy et al., PNAS 2006; Ijichi et al., Genes Dev 2006)。ただしこれらのゲノム異常だけでは膵癌の組織学的特性および前癌状態からの進行については説明できないことも知られている。

近年、ゲノム変異とは別に DNA メチル化やヒストン修飾を含めたエピゲノム異常の重要性が明らかになり、その分子標的薬も開発されつつある。本来、がんは不均一で多様な細胞集団であるといわれる。昨今、癌組織中の“癌幹細胞”の存在が提唱されているが、これも癌細胞の heterogeneity から発した概念と想像される。例えば治療抵抗性を引き起こす細胞群に“癌幹細胞性”が関与する、という考えもそのひとつであろう (J Clin Invest. 2010;120(1):41)。これらの癌細胞の多様にエピゲノムの不均一性が関与していると考えられている (Cell 2010;141(1):69)。これまでにエピゲノム修飾因子群の癌における遺伝子異常が次々に報告され (Nat.Rev.Cancer 2010;10:457)、エピゲノム調節の破綻が癌の治療効果にも関わる可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

前検討により、ヒストンメチル化酵素 EHMT が *KRAS* 変異陽性の膵前癌病変からの発癌進展に必須であり、膵癌発症抑止に向けた新規の分子標的候補である可能性を見出した。

EHMT はヒストン H3 の 9 番目リジンをメチル化して下流遺伝子発現を不活化する酵素であり、様々な癌で発現異常が報告されている。ヒト組織において、EHMT の発現は膵前癌病変 PanIN の進行とともに増加することを見出した。その意義を明らかにするため膵特異的に活性化 *Kras* 遺伝子を発現し、かつ *EHMT* 遺伝子を欠損するマウスを理化学研究所の眞貝博士との共同研究にて作製した。これまでに得られた結果では、*EHMT* の欠損は *Kras* 変異による PanIN の形成を有意に抑制し、早期膵前癌病変 early stage PanIN から late stage PanIN への進展を抑制していた。今回の研究では、PanIN 進行に EHMT の果たす分子機序、およびヒト前癌病変進行抑止への標的となる可能性を明らかにすることを目的としている。

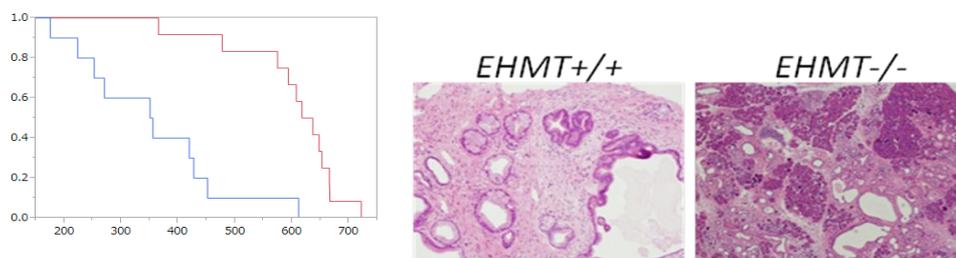
3. 研究の方法

膵前癌病変進行における EHMT 活性の意義と分子機構については、まずは *Ehmt* KO マウスと膵癌モデルマウスの交配による表現型解析を基盤とする。EHMT の阻害薬も膵癌モデルマウスに投与し効果を確認する。PanIN 病変特異的な RNA を用いた網羅的発現アレイデータから、EHMT の下流で PanIN 進行に関わるマーカー分子を探索し、評価・検討する。さらにはヒト PanIN 検体での発現解析も行い、合わせて抽出したマーカーとしての有用性も評価する。

4. 研究成果

膵前癌病変悪性化における EHMT の役割の解析

P48Cre:Kras^{G12D} マウスは *p48* プロモーター下で恒常的活性型 *Kras* 遺伝子を発現することで、生後早期から PanIN 病変を呈し、一年以上の経過で膵癌に進展することから、ヒト膵癌発生機序を模倣するマウスとして知られる。このマウスと数種類のクロマチン制御因子の KO マウスとを交配し膵癌発生進展への過程を検討した結果、ヒストンメチル化酵素 *Ehmt* 欠損マウスでは膵癌前駆病変の進行が遅延することが明らかとなった（下図右）。通常の *Ehmt* 存在下では生後早期より metaplasia から early stage の PanIN 形成を呈し、生後一年までには late stage の PanIN、さらに一年以上経過すると膵癌を発症し死亡するマウスが出現、その生存日数中央値は 353 日であった。一方で *Ehmt* 欠損マウスでは metaplasia と early PanIN 病変は見られるが late stage PanIN 以降の病変が形成されず、生存日数中央値は 602 日と、ほぼ通常の野生型マウスと同様であった（下図左）。



膵前癌病変の metaplasia 進行における EHMT の役割の解析

- a. ヒト組織において正常膵から metaplasia 病変、各 grade の PanIN、最終的な膵癌病変に至る過程での *Ehmt* の発現について、当科における膵癌手術検体の癌部および周囲の組織を用いて免疫染色によって評価した。組織染色の結果から、その発現は metaplasia から前癌病変への悪性度が進行するにつれ増加する傾向を呈することが明らかとなり、本分子の役割の重要性を示唆していた。
- b. *P48Cre:Kras^{G12D} Ehmt* 野生型あるいは *Ehmt* 欠損マウスの膵 metaplasia 病変において、特徴的細胞系譜マーカーとして知られている *Sox9*, *Mint*, *Ck19*, *Amylase* などについて、定量的 RT-PCR とそれぞれの抗体による免疫染色を用いて調べた。これにより両者の metaplasia の質的差異の有無を明らかにし、その後の PanIN 進行の違いの原因を探索した。
既報で示されている通り *P48Cre:Kras^{G12D} Ehmt* 野生型マウスの膵 metaplasia 病変では膵腺房細胞のマーカーである *amylase* と上皮系マーカーである *Ck19* などの発現が相互排他的となっていた。一方で *P48Cre:Kras^{G12D}:Ehmt* 欠損マウスの膵 metaplasia 病変は、出現数自体は *Ehmt* 野生型マウスに比べて有意に減少がみられたものの、上記のマーカーの相互排他的な発現変化は同様にみられていた。このことは metaplasia の分化転換が *Ehmt* 欠損によって完全に阻害されるわけではないことを示唆しており、他の分子発現の違いが示唆された。
- c. 上記のことから *P48Cre:Kras^{G12D} Ehmt* 野生型あるいは *Ehmt* 欠損マウスの膵組織を用いてその網羅的 RNA 発現プロファイルを比較することで、表現型の違いに寄与する分子群を解析した。その結果、*Ehmt* 欠損により発現が上昇する約 590 遺伝子、低下する約 170 遺伝子を抽出した。定量的 RTPCR や免疫染色によるバリデーションを行い、有意な遺伝子変化を解析中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- 1) Sano M, Ijichi H, Takahashi R, Miyabayashi K, Fujiwara H, Yamada T, Kato H, Nakatsuka T, Tanaka Y, Tateishi K, Morishita Y, Moses HL, Isayama H, Koike K. Blocking CXCLs-CXCR2 axis in tumor-stromal interactions contributes to survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma through reduced cell invasion/migration and a shift of immune-inflammatory microenvironment. *Oncogenesis*. 2019 Jan 18;8(2):8. doi: 10.1038/s41389-018-0117-8. PubMed PMID: 30659170.
- 2) Saito K, Isayama H, Nakai Y, Takahara N, Ishigaki K, Takeda T, Hakuta R, Saito T, Uchino R, Kishikawa T, Hamada T, Mizuno S, Sasaki T, Kogure H, Matsubara S, Yamamoto N, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Koike K. A phase II trial of gemcitabine, S-1 and LV combination (GSL) therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Invest New Drugs*. 2018 Nov 9. doi: 10.1007/s10637-018-0691-9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30411217.
- 3) Fujiwara H, Tateishi K, Kato H, Nakatsuka T, Yamamoto K, Tanaka Y, Ijichi H, Takahara N, Mizuno S, Kogure H, Matsubara S, Nakai Y, Koike K. Isocitrate dehydrogenase 1 mutation sensitizes intrahepatic cholangiocarcinoma to the BET inhibitor JQ1. *Cancer Sci*. 2018 Nov;109(11):3602-3610. doi: 10.1111/cas.13784. Epub 2018 Sep 17. PMID:30156013
- 4) Saito K, Isayama H, Sakamoto Y, Nakai Y, Ishigaki K, Tanaka M, Watadani T, Arita J, Takahara N, Mizuno S, Kogure H, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Hasegawa K, Fukayama M, Kokudo N, Koike K. A phase II trial of gemcitabine, S-1 and LV combination (GSL) neoadjuvant chemotherapy for patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer. *Med Oncol*. 2018 May 30;35(7):100. doi: 10.1007/s12032-018-1158-8. PubMed PMID: 29846849.
- 5) Mizuno S, Isayama H, Nakai Y, Yoshikawa T, Ishigaki K, Matsubara S, Yamamoto N, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Hayashi N, Koike K. Prevalence of Pancreatic Cystic Lesions Is Associated With Diabetes Mellitus and Obesity: An Analysis of 5296 individuals Who Underwent a Preventive Medical Examination. *Pancreas*. 2017Jul;46(6):801-805. PubMed PMID: 28609369. doi: 10.1097/MPA.0000000000000833.
- 6) 立石敬介 2018 医学のあゆみ 266 巻 11 号 BET 阻害剤への期待:クロマチンリーダー標的化戦略によるヒト病態制御 BET inhibitor offers a promising strategy targeting “chromatin Reader” for human diseases
- 7) 立石敬介, 山本恵介, 小池和彦 2016 日本膵臓学会誌 膵臓 2016;31(1):69-75 膵がんの発生進展を制御するエピゲノム修飾酵素

〔学会発表〕(計4件)

- 1) Tateishi K, 4th Cross-strait and World Chinese Microbial Ecology Summit, 7th West-strait Holistic Integrative Digestive Digestive Forum, Advances of treatment for pancreatic cancer in Tokyo University Hospital Xiamen, China 2018/6/23
- 2) 佐野誠, 伊地知秀明, 立石敬介, 多田稔, 小池和彦 Blocking CXCLs-CXCR2 axis in

tumor-stromal interaction contributes to the survival in a mouse model of pancreatic cancer 第 77 回日本癌学会学術集会 2018/09/27 大阪

- 3) 佐野誠,伊地知秀明,立石敬介,多田稔,伊佐山浩通,小池和彦 膵癌における CXCLs/CXCR2 阻害は癌免疫環境を修飾し生存に寄与する第 49 回日本膵臓学会大会 2018/06/29 和歌山
- 4) Tateishi K, Yamamoto K, Fujiwara H, Kato H, Ijichi H, Kogure H, Nakai Y, Tada M, Shinkai Y and Koike K *Impact of histone methylase G9a on pancreatic carcinogenesis* The48th Annual Meeting of the American Pancreatic Association 2017/11/8-11 11/9 PRESENTATION San Diego, CA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中井 陽介
ローマ字氏名：NAKAI YOUSUKE
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：准教授
研究者番号 (8 桁)：80466755

研究分担者氏名：水野 卓
ローマ字氏名：MIZUNO SUGURU
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号 (8 桁)：30771050

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：