

令和元年6月5日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09398

研究課題名(和文)GNAS遺伝子改変マウスを用いたIPMN発症機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of pathogenic mechanisms of IPMN using GNAS gene modified mousepathogenic mechanisms

研究代表者

大村谷 昌樹 (OHMURAYA, Masaki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60398229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題ではRNF43遺伝子ノックアウトマウスを作製し、解析を行った。RNF43はE3ユビキチンリガーゼをコードしており、Wntシグナル伝達を負に調節する。RNF43 KOマウスはメンデルの法則に従って生まれ、その後の成長にも野生型と比較して、差は認めなかった。RNF43の体細胞変異が大腸がんおよび子宮膜がんの18%以上に見られることから(Nat Genet, 2014)、アゾキシメタン(AOM)とDSSをマウスに投与し(AOM/DSSマウス)、大腸がん発がんに差が見られるか検討を行った結果、腫瘍の増大を認め、RNF43が大腸がんの進展を抑制する働きがあることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPMNではKRAS、GNAS、RNF43遺伝子の変異が重複して見られる。今回はRNF43に関して、そのノックアウトマウスを作製し、単独欠損では膵臓に異常を来さないこと、また大腸がんモデルを用いると、やはりRNF43が腫瘍発生に抑制的に働いていることが明らかとなった。今後はIPMNに関してもその分子メカニズムを解明することで、新たな治療法の開発につながると予想される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, RNF43 gene knockout mice were generated and analyzed. RNF43 encodes an E3 ubiquitin ligase and negatively regulates Wnt signaling. RNF43 KO mice were born according to Mendelian frequency, and there was no difference in their growth as compared to wild. As RNF43 somatic mutations of RNF43 are found in 18% or more of colon cancer and endometrial cancer (Nat Genet, 2014), azoxymethane (AOM) and DSS were administered to mice (AOM / DSS mice) As a result of examining whether there is a difference in cancer carcinogenesis, it was found that the tumor was large and that RNF43 had the function of suppressing the progression of colorectal cancer.

研究分野：消化器病学

キーワード：IPMN RNF43

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 研究の学術的背景

膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm; IPMN) は旺盛な粘液産生を示す腫瘍細胞が膵管内に増殖する腫瘍で、膵管が嚢胞状に拡張し、粘液による機能的閉塞から急性膵炎や慢性膵炎の症状を呈し、進行すると浸潤転移を来して予後不良となる。罹患者は膵管癌 (通常型膵癌) に次いで多く、増加傾向にある。

研究分担者の古川らは IPMN の exome 解析を行い、*KRAS* 変異に加え、GPCR 信号伝達経路に関与する guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating (*Gs*) をコードする *GNAS* の機能亢進型変異と WNT シグナル経路に関与する *RNF43* の機能喪失型変異が特異的に認められることを明らかにした (Sci Rep, 2011)。IPMN にみられる *GNAS* 変異はほぼ例外無く R201H、R201C であり、*Gs* を GTPase 不応性として恒常的に活性化する。*GNAS* 変異は IPMN の比較的初期の病変からも検出され、通常型膵癌や他の膵腫瘍には全く認められない特異的かつ重要な遺伝子異常と考えられている。

そこで、我々は *GNAS* (R201H) 変異が *in vivo* で IPMN を発生するのかを明らかにするため、古川らと共同で膵特異的変異 *GNAS* (R201H) 発現マウスの樹立を行った。

このマウスでは 4 週齢で膵腺房細胞脱落、膵管拡張、線維化を認め、慢性膵炎様の病変を来すが、その後、この病変は消失する。また、このマウスは肉眼的に正常である。

しかし、このマウスと変異 *Kras* (G12D) との二重変異マウスを作成すると、4 週齢頃から著明な腹水の貯留とともに膵臓に嚢胞状腫瘍が発生してくる。この嚢胞状腫瘍は病理学的 (上皮の粘液性異型乳頭状増殖を伴う膵管拡張)、免疫組織学的 (MUC5AC、Protein kinase A (PKA) リン酸化基質蛋白発現の上昇)、生化学的 (cAMP の上昇) な特徴から、ヒト IPMN と極めて類似したモデルマウスとなることが判明した (Oncogene, 2015)。

### 2. 研究の目的

IPMN では *KRAS*、*GNAS*、*RNF43* 変異が重複して見られるが、それらの相互作用は明らかでない。膵特異的変異 *GNAS* 発現マウスでは変異 *GNAS* が細胞内 cAMP の上昇を招くが、本来誘導されるはずのアポトーシスが、変異 *Kras* によりキャンセルされ、IPMN を発症することが示唆され、アポトーシスが IPMN 発症を強く抑制していると考えられる。本研究では、IPMN 発症メカニズム、IPMN 発症過程におけるアポトーシスの役割に関して、もう一つの主役である *Rnf43* に関して、腫瘍発生にどのような効果をもたらすのか、膵臓と大腸 (*RNF43* は高頻度で大腸がんが高発現する (Nat Genet, 2014) ことが既に判明している) に焦点を当てて解析を行う。

### 3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムを用いて、全身で *Rnf43* を欠失したマウス (*Rnf43*<sup>-/-</sup>) を樹立した。*Rnf43*<sup>-/-</sup> マウスはメンデルの法則に従って生まれ、肉眼的な異常は見られなかった。このマウスと膵特異的変異 *GNAS* (R201H) 発現マウスを交配し、膵臓の病変を確認した。

また、*Rnf43* と大腸がんの関係が指摘されていることから、大腸がん発がんモデル (AOM/DSS モデル) を用いて、腫瘍形成にどのような影響を及ぼすのか、検討を行った。

### 4. 研究成果

*GNAS* (R201H); *Kras* (G12D) マウスは生後 4-5 週齢で著明な腹水の貯留とともに膵臓に嚢胞状腫瘍が発生してきたが、*GNAS* (R201H); *Rnf43*<sup>-/-</sup> では 3 ヶ月齢まで解析を行い、膵腫瘍の形成は確認出来なかった。さらに長期間の経過観察が必要で、本課題が終了後も引き続き研究を続ける計画である。

*Rnf43*<sup>-/-</sup> マウスは野生型マウスの腸管オルガノイド培養を行ったが、差が見られなかった。次に、アゾキシメタン (AOM) と DSS をマウスに投与し (AOM/DSS マウス)、大腸がん発がんに差が見られるか検討を行った結果、腫瘍の増大を認め、*RNF43* が大腸がんの進展を抑制する働きがあることが判明した。つまり、ヒト大腸がんで見られる *RNF43* の変異は WNT シグナルの活性化を促進し、腫瘍増大を促進している可能性が示唆された (文献 4)。

今後は IPMN に関してもその分子メカニズムを解明することで、新たな治療法の開発につながると予想される。

### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 16 件、すべて査読あり)

1. Necroptosis of Intestinal Epithelial Cells Induces Type 3 Innate Lymphoid Cell-Dependent Lethal Ileitis. Shindo R, Ohmuraya M, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Deguchi Y, Yamazaki S, Nishina T, Yoshimoto T, Kakuta S, Koike M, Uchiyama Y, Konishi H, Kiyama H, Mikami T, Moriwaki K, Araki K, Nakano H. iScience. 2019 May 14;15:536-551. doi: 10.1016/j.isci.2019.05.011.
2. A Subset of Mesotheliomas With Improved Survival Occurring in Carriers of BAP1 and Other Germline Mutations. Pastorino S, Yoshikawa Y, Pass HI, Emi M, Nasu M, Pagano I, Takinishi Y, Yamamoto R, Minaai M, Hashimoto-Tamaoki T, Ohmuraya M, Goto K, Goparaju C, Sarin KY, Tanji M, Bononi A, Napolitano A, Gaudino G, Hesdorffer M, Yang H, Carbone M. J Clin Oncol. 2018 Oct 30;JCO2018790352. doi: 10.1200/JCO.2018.79.0352.
3. Inhibition of 15-PGDH causes *Kras*-driven tumor expansion through prostaglandin E2-ALDH1 signaling in the pancreas. Arima K, Ohmuraya M, Miyake K, Koiwa M, Uchiyama T, Izumi D, Gao

- F, Yonemura A, Bu L, Okabe H, Imai K, Hashimoto D, Baba Y, Chikamoto A, Yamashita YI, Furukawa T, Araki K, Baba H, Ishimoto T. *Oncogene*. 2019 Feb;38(8):1211-1224. doi: 10.1038/s41388-018-0510-y. Epub 2018 Sep 24.
4. Impact of loss-of-function mutations at the RNF43 locus on colorectal cancer development and progression. Eto T, Miyake K, Nosho K, Ohmuraya M, Imamura Y, Arima K, Kanno S, Fu L, Kiyozumi Y, Izumi D, Sugihara H, Hiyoshi Y, Miyamoto Y, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Furukawa T, Araki K, Baba H, Ishimoto T. *J Pathol*. 2018 Aug;245(4):445-455. doi: 10.1002/path.5098. Epub 2018 Jun 20.

その他 12 件

〔学会発表〕(計 5 件)

国際学会

1. Masaki Ohmuraya. “Cell Death in Pancreatitis” Australia-Japan Meeting on Cell Death. 22-23, May, 2018, Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of Tokyo.
2. Masaki Ohmuraya. “The Roles of Cathepsin B, D, and L during Acute and Chronic Pancreatitis in Mice” The Joint Conference of the 47<sup>th</sup> annual meeting of the Japan Pancreas Society, the 20<sup>th</sup> meeting of the International Association of Pancreatology and the 6<sup>th</sup> meeting of the Asian Oceanic Pancreatic Association. 4-7, Aug, 2016, Sendai International Center

国内学会

1. 大村谷昌樹、橋爪慎介、岩間英明、今坂舞. 膵腺房細胞におけるカテプシン、リソソーム-オートファジー系と膵炎発症の関わり. 第 26 回 若手膵臓研究会. 2018 年 10 月 31 日生田神社会館(神戸市)
2. 大村谷昌樹、今中応亘. 膵、肝臓発生における Beclin 1; Becn1. の機能解析. 第 24 回 若手膵臓研究会. 2016 年 11 月 2 日、生田神社会館(神戸市)
3. 大村谷昌樹. ネクロプトーシスと遺伝性膵炎. 第 25 回 Cell Death 学会学術集会. 2016 年 9 月 9-10 日. 品川区立総合区民会館

〔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:古川 徹

ローマ字氏名:FURUKAWA, Toru

所属研究機関名:東北大学

部局名:医学系研究科

職名:教授

研究者番号(8桁):30282122

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。