

令和元年6月10日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06803

研究課題名（和文）新規治療開発を目指した膵癌におけるHes1の機能解析

研究課題名（英文）The role of Hes1 in pancreatic tumorigenesis

研究代表者

西川 義浩（Nishikawa, Yoshihiro）

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：80802785

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：膵病変においては、膵前癌病変から膵癌に至るまでHes1の幅広い発現を認めることが知られてきたものの、その役割は不明であった。今回我々は、Hes1が膵癌形成のinitiationにおいて必須の役割を果たすことを明らかにした。Hes1は膵前癌病変の進展において、Sox9の発現制御が重要である可能性が示唆された。更には、新規Hes1阻害剤による膵癌細胞株の増殖抑制効果も確認し、Hes1が膵癌の新規治療標的となり得る可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は本邦における悪性腫瘍死亡原因の第5位を占め、未だに5年生存率が10%に満たない最難治癌であり、予後改善・新規治療薬の開発には、その病態解明が必須である。切除不能膵癌の化学療法の選択肢は未だに少なく、化学療法を行っても生存中央日数は1年に満たない。Hes1がその選択肢の一つになることができれば、膵癌の予後改善の寄与することが可能と考える。

研究成果の概要（英文）：During tumorigenesis, Hes1 starts to be expressed from precancerous lesions to pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), however, the role of Hes1 in pancreatic tumorigenesis was not fully elucidated. In the present study, we demonstrated that Hes1 gene deletion dramatically suppressed the formation of pancreatic lesions in mice. We provide evidence that Hes1 plays essential roles in multiple steps of PDAC initiation by regulating Sox9 expression. The antitumor effect of a novel Hes1 inhibitor on pancreatic cancer cells in vitro and in vivo suggests that Hes1 could be a new preventive or therapeutic target for PDAC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：膵癌 Hes1

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

1. 研究開始当初の背景

膵癌は本邦における悪性腫瘍死亡原因の第5位を占め、未だに5年生存率が10%に満たない最難治癌である。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。

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は報告され、重要な役割を果たしている可能性が示唆されるものの、その役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、膵の発生過程において重要な役割を果たす Hes1 に着目し、膵癌形成における Hes1 の役割の解明、成体膵の維持における Hes1 の役割の解明、膵病変形成後の Hes1 の役割の解明、Hes1 をターゲットとした膵癌治療の可能性の検討、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膵癌形成における Hes1 の役割の解明

Hes1 の全身ノックアウトマウスは胎生致死であるため、タモキシフェン誘導下に成体膵腺房細胞に遺伝子改変可能な、*Elastase1-CreERT2* マウスを用いた。同マウスと、Cre 誘導下に変異 *Kras* を導入可能な *LSL-Kras^{G12D}* マウスを交配することで、膵前癌病変モデルマウスを、さらに Cre 誘導下に変異 *p53* を導入可能な *LSL-p53^{R172H}* マウスを掛け合わせることで膵癌モデルマウスを作成した。それぞれのマウスに、Cre 誘導下に *Hes1* をノックアウト可能な *Hes1 flox* マウスを掛け合わせ、膵病変の形成における Hes1 の機能解析を行う。

(2) 成体膵の維持における Hes1 の役割の解明

Flp/Frt システムと Cre/LoxP システムを用いて、タモキシフェン誘導下に成体膵全体で *Hes1* をノックアウト可能なマウス (*Pdx1-Flp; Rosa26-FSF-CreERT2; Hes1 flox/flox*) を作製する。同マウスを解析することで、成体膵の維持における Hes1 の機能解析を行う。

(3) 膵病変形成後の Hes1 の役割の解明

Flp/Frt システムを用いて、膵癌マウスモデル (*Pdx1-Flp; FSF-Kras^{G12D}; Trp53^{frt/frt}*) を作製する。また、Cre/LoxP システムを用いて、Flp/Frt システムの存在下かつタモキシフェン誘導下の任意の時期に *Hes1* をノックアウト可能な、*Rosa26-FSF-CreERT2; Hes1 flox/flox* マウスを作成する。同マウスを交配させることにより、膵癌形成後に *Hes1* をノックアウトすることが可能なマウスの系を確立する。

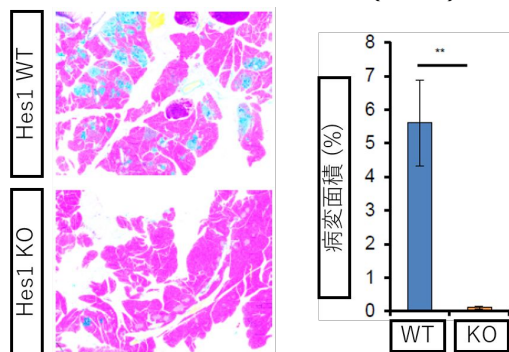
(4) Hes1 をターゲットとした膵癌治療の可能性の検討

Hes1 の阻害が各種のヒト膵癌細胞株に与える影響について、*in vitro* および *in vivo* にて検討する。

4. 研究成果

(1) 膵癌形成の initiation において Hes1 は必須の役割を果たす

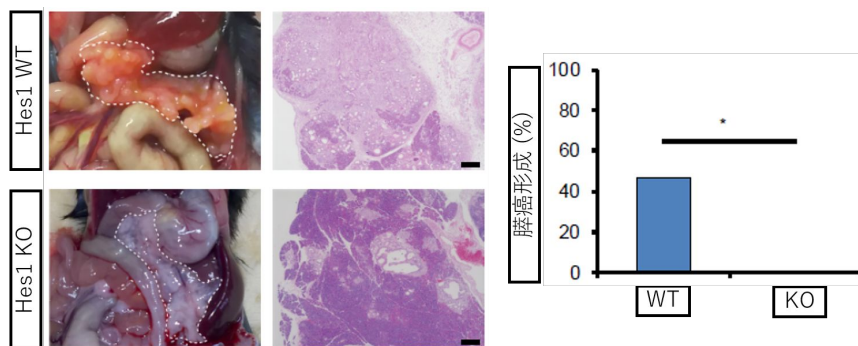
前癌病変を形成するモデルマウス (*Elastase1-CreERT2; LSL-Kras^{G12D}*) を作成し、さらに *Hes1 flox* マウスを交配することにより、*Elastase1-CreERT2; LSL-Kras^{G12D}; Hes1 flox* マウスを作成し、前癌病変形成における Hes1 の役割に関して解析した。4週齢のマウスのタモキシフェンを投与し、6か月後に解析したところ、Hes1 のノックアウトにより、前癌病変の形成が著明に抑制されることが明らかとなった (下図)。



更には、膵癌を形成するモデルマウス (*Elastase1-CreERT2; LSL-Kras^{G12D}; LSL-p53^{R172H}*) を作成し、さらに *Hes1 flox* マウスを交配することにより、*Elastase1-CreERT2; LSL-Kras^{G12D}; LSL-p53^{R172H}; Hes1 flox* マウスを作成し、膵癌形成における Hes1 の役割に関して解

析した。4週齢のマウスのタモキシフェンを投与し、2か月後に解析したところ、Hes1のノックアウトにより、膵癌形成が完全に抑制された(下図)。

これらの結果より、膵癌形成の initiation において、Hes1 が極めて重要な役割を果たすことが明らかとなった。



(2) Hes1 は ADM から PanIN への進展に必要である

前癌病変モデルマウスと Hes1 flox マウスを交配した *Elastase1-CreERT2; LSL-Kras^{G12D}; Hes1 flox* マウスを使用し、Hes1 が膵癌形成のどの段階で重要であるかを評価した。炎症モデルとして、セルレインを投与し、その後の変化を詳細に評価したところ、Hes1 をノックアウトすると、ADM へは進展するものの、そこから PanIN への進展が抑制されることが判明した。更に、上記マウスにレポーター遺伝子を導入し、lineage tracing の手法を用いて検討したところ、変異 Kras の導入と Hes1 のノックアウトがなされた腺房細胞は ADM を経由して、再度腺房細胞に戻ることが明らかとなった。

(3) Hes1 は Sox9 の発現制御を行うことで膵病変の進展に寄与する

上記の膵癌形成の段階で、その分子学的なメカニズムの解明を図った。ADM の形成には Hes1 の有無が影響を与えることはなく、この段階で膵組織の各種 RNA の発現を定量的 PCR にて評価した。結果、Hes1 をノックアウトすると、膵病変の形成に重要とされる Sox9 の発現が落ちていくことが判明した。In vitro の実験においても、Hes1 の発現と Sox9 の発現の連動を確認でき、Hes1 の膵病変形成において、Sox9 の発現制御が重要である可能性が示唆された。

(4) Hes1 は膵炎後の再生に関わる

Flp/Frt システムと Cre/LoxP システムを用いて、タモキシフェン誘導下に成体膵全体で Hes1 をノックアウト可能なマウス (*Pdx1-Flp; Rosa26-FSF-CreERT2; Hes1 flox/flox*) を作製する。同マウスを長期観察行なったが、膵臓の形態およびマウスの発育に明らかな変化は認めなかった。炎症時における影響を検討するために、同マウスに炎症を惹起させるセルレインを投与し、評価した。結果、Hes1 のノックアウトマウスで、膵炎後に膵臓の萎縮を認めた。我々は以前の検討により、腺房細胞での Hes1 のノックアウトは膵炎の影響を受けないことを明らかにしており、腺管細胞での Hes1 ノックアウトが重要である可能性が示唆された。

(5) Hes1 阻害剤は膵癌細胞の増殖を抑制する

Hes1 を阻害する化合物(京都大学物質細胞統合システム拠点・科学研究所との共同研究)が各種ヒト膵癌細胞株に与える得橋について検討した。MIA PaCa-2 細胞、PANC-1 細胞を用い、in vitro で Hes1 阻害剤が細胞増殖に与える影響を、MTS assay にて評価した。Hes1 阻害剤は膵癌細胞株の増殖を濃度依存性に抑制することが明らかとなった。更に、免疫不全マウス(ヌードマウス)にヒト膵癌細胞株を皮下移植し、Hes1 阻害剤の投与を行った。結果、in vivo においても Hes1 阻害剤が膵癌細胞の腫瘍増殖を抑制することが明らかとなった。腫瘍臓器を組織学的に評価したが、明らかな変化は認めなかった。

これらの結果から、Hes1 は膵癌形成において極めて重要な役割を果たすことが明らかとなり、Hes1 阻害剤の結果からも Hes1 の阻害が膵癌の新しい治療標的となり得る可能性が示唆された。一方で、Hes1 の膵癌の維持・進展における役割の検討は行えず、また、Hes1 の阻害が膵臓のホメオスタシスの維持に影響を及ぼす可能性もあり、今後さらなる検討が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Nishikawa Y, Kodama Y, Shiokawa M, Matsumori T, Marui S, Kuriyama K, Kuwada T, Sogabe Y, Kakiuchi N, Tomono T, Mima A, Morita T, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Uza N, Uesugi M, Kageyama R, Chiba T, Seno H. Hes1 plays an essential role in Kras-driven pancreatic tumorigenesis. *Oncogene*. 2019 May;38(22):4283-4296. doi:

10.1038/s41388-019-0718-5. Epub 2019 Jan 31.

Perron A, Nishikawa Y, Iwata J, Shimojo H, Takaya J, Kobayashi K, Imayoshi I, Mbenza NM, Takenoya M, Kageyama R, Kodama Y, Uesugi M. Small-molecule screening yields a compound that inhibits the cancer-associated transcription factor Hes1 via the PHB2 chaperone. J Biol Chem. 2018 May 25;293(21):8285-8294. doi: 10.1074/jbc.RA118.002316. Epub 2018 Mar 9.

〔学会発表〕(計3件)

Nishikawa Y, Kodama Y, Okada H, Kuwada T, Marui S, Morita T, Matsumori T, Tomono T, Yamauchi Y, Shiokawa M, Uza N, Seno H. HES1 PLAYS AN ESSENTIAL ROLE IN THE INITIATION OF PANCREATIC CANCER FORMATION BY REGULATING ACINAR-DUCTAL REPROGRAMMING. Digestive Disease Week USA 2018年6月

西川義浩、児玉裕三、山内 雄揮、津田 喬之、妹尾浩 膵癌形成における Hes1 の機能解析 第76回日本癌学会総会 横浜 2017年9月

西川義浩、児玉裕三、栗田威、丸井彩子、曾我部裕子、森田敏広、垣内伸之、美馬淳志、松森友昭、友野輝子、上田樹、津田喬之、山内雄揮、佐久間洋二郎、栗山勝利、丸野貴久、塩川雅広、宇座徳光、妹尾浩 Hes1 KO は膵癌マウスモデルにおいて膵発癌を抑制する 第48回日本膵臓病学会大会 京都 2017年7月

〔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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号5

(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。