

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16711

研究課題名（和文）成体膵の恒常性の維持および膵癌形成におけるELF3の機能解析

研究課題名（英文）The role of ELF3 in homeostasis and tumorigenesis of pancreas

研究代表者

西川 義浩（Nishikawa, Yoshihiro）

神戸大学・医学研究科・特別研究員（PD）

研究者番号：80802785

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト膵癌の解析では、ELF3が前癌病変から進行膵癌に至るまで幅広く発現し、ELF3が高発現するほど予後不良であることより、ELF3が腫瘍促進的に働くことが示唆された。一方で、膵癌マウスモデルを用いた検討では、ELF3のノックアウトにより低分化な腫瘍が形成され、ELF3のノックアウトが脱分化を引き起こす、すなわちELF3が腫瘍抑制的に働いていることが示唆された。これらの結果からELF3の膵癌における役割が腫瘍形成の段階によって変化する可能性が考えられた。

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。ELF3の膵癌における役割の詳細は不明であったが、本研究でその病態形成の一端を担うことを明らかにすることが出来た。詳細な病態解明や新規治療法開発には更なる検討が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：We confirmed broad expression of ELF3 from precancerous lesion to advanced pancreatic cancer in human specimen. The inverse correlation of ELF3 expression and prognosis was also confirmed. These results suggest that ELF3 plays pro-tumor role in pancreatic cancer. On the other hand, ELF3 deletion promoted poorly differentiated cancer in pancreatic cancer mouse model. ELF3 deletion promoted de-differentiation of cancer, therefore, it is suggested that ELF3 plays anti-tumor role in pancreatic cancer. Taken together, ELF3 may play anti-tumor and pro-tumor roles in pancreatic cancer depending on the context of pancreatic tumor.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：膵癌 ELF3

## 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。

*ELF3* 遺伝子は ETS ファミリーに属する転写因子の一つである。正常組織においては、細胞周期、分化、増殖、アポトーシスのコントロールなどを行っていると考えられているが、近年各種癌における発現の異常が報告され、注目されている (Sizemore GM et al. Nat Rev Cancer. 2017)。申請者はこれまで行ってきた膵癌研究において、*HES1* 遺伝子が膵発癌において重要な役割を果たしていることを明らかにし、報告してきた (Y. Nishikawa et al. J Biol Chem. 2018, Y. Nishikawa et al. Oncogene. 2019)。申請者はこれまでに、ヒト膵癌検体を用いた検討にて、*ELF3* が *HES1* の発現と強い相関関係を示すことを明らかにした。膵癌は、前癌病変 (ADM, PanIN) を経て進行癌に至ることが知られている。膵癌組織の免疫化学染色による *ELF3* の発現を評価したところ、正常膵では発現が低いものの、膵前癌病変から進行癌に至るまで強く発現することを確認した。

上記の結果より、*ELF3* が、膵癌形成に関与する可能性が考えられた。しかしながら、これまでに膵癌における *ELF3* の具体的な機能解析はなされておらず、その役割は不明であった。また、正常膵の発生・維持における *ELF3* が果たす役割も不明であり、併せて評価が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト膵癌における *ELF3* 発現の臨床的意義の検討、マウスモデルを用いた、正常膵の発生・維持において *Elf3* が果たす役割の解明、膵癌形成において果たす *Elf3* が果たす役割の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト膵癌における *ELF3* 発現の臨床的意義の検討

ヒト膵癌の標本を用いた *ELF3* の免疫組織化学染色によるタンパク発現およびヒト膵癌データベースにおける *ELF3* の mRNA の発現と、臨床データとの関連性の検討を行い、*ELF3* の発現パターンの臨床的意義に関して検討する。

### (2) 正常膵の発生・ホメオスタシスの維持における *ELF3* の役割の検討

Cre/LoxP システムを用いて、膵臓特異的に Cre を発動する *Pdx1-Cre* マウスと、*Elf3* を conditional ノックアウト可能な *Elf3<sup>lox/lox</sup>* マウスとを掛け合わせ、*Pdx1-Cre;Elf3<sup>lox/lox</sup>* マウスを作成する。同マウスを解析することで、膵臓の発生・維持における *Elf3* の機能解析を行う。

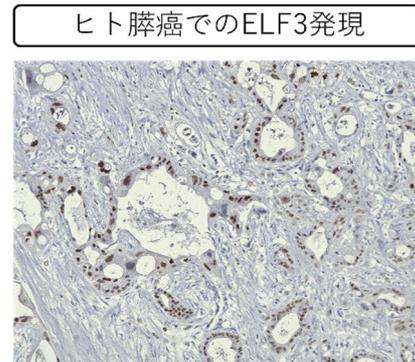
### (3) 膵癌形成において果たす *Elf3* が果たす役割の解明

膵臓特異的に変異 *Kras* 遺伝子、変異 *p53* 遺伝子を導入することで膵癌を形成する膵癌モデルマウス (*Pdx1-Cre;Kras<sup>G12D/wt</sup>;p53<sup>R172H/wt</sup>*) (以下、KPC マウス)を作成しと *Elf3* conditional ノックアウトマウス (*Elf3<sup>lox/lox</sup>*) と掛け合わせ (*Pdx1-Cre;Kras<sup>G12D/wt</sup>;p53<sup>R172H/wt</sup>;Elf3<sup>lox/lox</sup>*)、同マウスとコントロールマウスを比較することで、膵癌形成における *Elf3* の役割を解析する。

#### 4. 研究成果

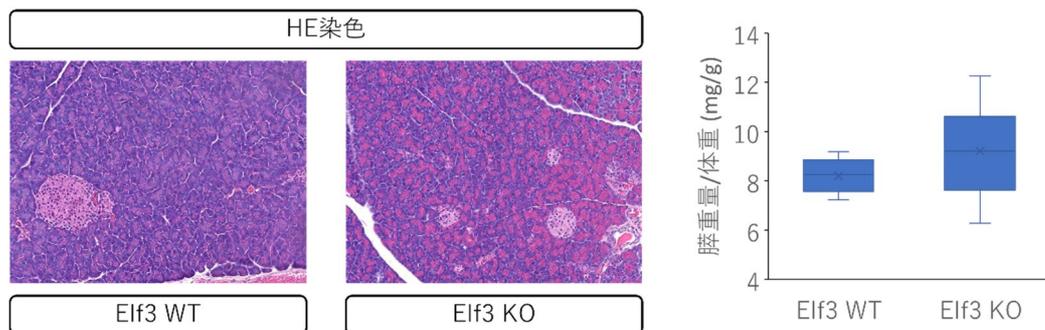
##### (1) ヒト膵癌において ELF3 の発現と高いほど予後不良である

ヒト膵癌検体を用いた免疫組織学的な検討では、多くの膵癌において ELF3 の発現を認めた(下図)。データベースを用いた mRNA の発現と予後の検討では、ELF3 mRNA の発現が高いほど膵癌の予後が悪い傾向を確認でき、ELF3 が膵癌において重要な役割を果たしていることが示唆された。



##### (2) *Elf3* は正常膵の発生および維持において重要な役割を果たしていない

膵臓特異的に *Elf3* をノックアウト可能なマウスモデル (*Pdx1-Cre;Elf3<sup>lox/lox</sup>*) を作成し、正常膵の発生・ホメオスタシスの維持における ELF3 の役割の検討を行った。*Elf3* ノックアウトマウスは、正常に発生し、膵臓に明らかな形態異常は認めなかった。また体重にも差はなく、膵重量の体重に占める割合に関しても差は認めない、すなわち全身・膵臓の発達に影響はないと考えられた(下図)、更に長期観察も行ったが、同様に明らかな異常はやはり認めなかった。

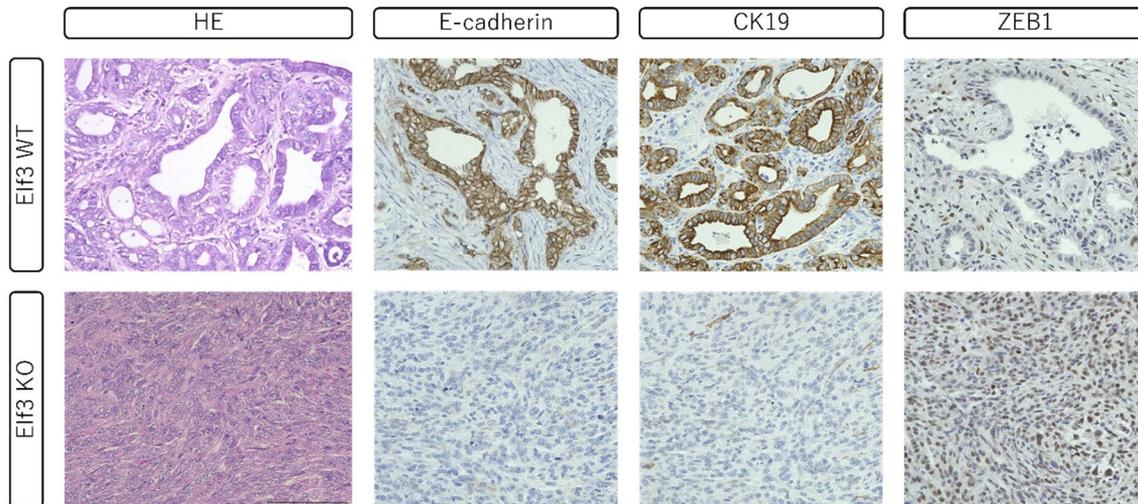


また、炎症モデルにおいても、明らかな差異は認めず、ELF3 は膵臓の発生、ホメオスタシスの維持においては、重要な役割を果たしていないと考えられた。

##### (3) *Elf3* のノックアウトにより低分化な膵癌が形成される

*Elf3* ノックアウト KPC マウスにおいて形成された膵癌を解析したところ、*Elf3* 野生型 KPC マウスと比較して、間質成分の乏しい低分化な腫瘍が形成された(下図 HE 染色)。上皮マーカーである、E-cadherin や CK19 による免疫組織学検査を行ったところ、*Elf3* 野生型マウスは高発現を認められるものの、*Elf3* ノックアウトでは発現の消失を認めた(下図、E-cadherin、CK19 染色)。統計学的に確認すると、有意に *Elf3* ノックアウトマウスで未分化型腫瘍ができることが確認できた ( $P < 0.05$ )。そのため、*Elf3* は膵癌において分化度の維

持に必要で、ノックアウトにより脱分化が誘導されることが示唆された。



次に、それぞれの膵癌から細胞株を樹立し、RNA シーケンスによる解析を行ったところ、上皮間葉転換 (EMT) の亢進を認めた。再度マウス膵癌組織の免疫組織染色でも確認したところ、ZEB1 を始めとした EMT マーカーが Elf3 ノックアウトで亢進することが確認された(上図、ZEB1 染色)。

今回の研究により、ヒト膵癌のデータでは ELF3 が腫瘍促進的な役割を果たすと考えられた。一方で、マウス膵癌モデルを用いた検討では逆に Elf3 のノックアウトにより分化度の低い膵癌が形成され EMT が亢進するという、むしろ逆の結果となった。ELF3 に着目する経緯となった HES1 も腫瘍形成の段階によって腫瘍形成促進的・抑制的の両方向に作用することを我々は明らかにしている (現在論文投稿中)。ELF3 の膵癌における役割も腫瘍形成の段階によって変化する可能性が考えられ、さらなる検討が必要である。当初は ELF3 が腫瘍促進的に働いていることを想定して研究を開始したため、方針を修正する必要が生じたが、今後も研究を継続し、その詳細を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------