

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17009

研究課題名（和文）GNAS経路からみた膵管内乳頭粘液性腫瘍関連膵癌のバイオマーカーと治療標的の探索

研究課題名（英文）Exploration of biomarkers and therapeutic targets for pancreatic ductal papillary mucinous tumor-associated pancreatic cancer from the GNAS pathway

研究代表者

河端 秀賢（Kawabata, Hidemasa）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50548691

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）は乳頭状増殖と豊富な粘液産生による嚢胞状構造を特徴とする膵臓癌の前癌病変であるが、これらの形態学的な特性や浸潤癌への進展に関わる機構は未解明である。今回の解析において、IPMNにとって重要な癌遺伝子であるGNASは、Notchの抑制を介してKRAS経路にブレーキをかけ、癌遺伝子でありながら腫瘍抑制的な機能的側面を有すると考えられた。GNAS経路を標的とする膵腫瘍の薬物治療の開発において重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓癌の前がん病変であるIPMNにおける癌遺伝子KRASとGNASの解析を行うことで、今までにない新たなGNAS経路を標的とする膵臓癌薬物治療の開発につながる可能性がある。今後も解析を進めていきたい。

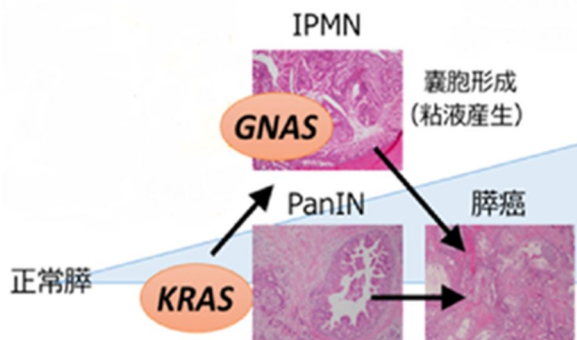
研究成果の概要（英文）：Intraductal papillary mucinous tumor (IPMN) is a precancerous lesion of pancreatic cancer characterized by a cyst-like structure due to papillary growth and abundant mucus production, but its morphological characteristics and mechanisms involved in its progression to invasive cancer are unknown. In this analysis, GNAS, an important oncogene for IPMN, acts as a brake on the KRAS pathway through the suppression of Notch, and is considered to have a functional aspect of tumor suppression even though it is an oncogene. It was considered important in the development of drug therapies for pancreatic tumors that target the GNAS pathway.

研究分野：膵臓癌

キーワード：IPMN 膵臓癌 GNAS KRAS

1. 研究開始当初の背景

膵癌の前駆病変として、膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) と膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) が重要である。IPMN の多くは多発病変を有し、膵癌の危険因子とされているが、その悪性化機構の全容解明には至っていない。これら前駆病変の発生には、がん遺伝子である *KRAS* の変異が共通してみられる。一方で、*GNAS* 変異は IPMN に特徴的なドライバー遺伝子である。*GNAS* 遺伝子は 20 番染色体長腕の複合遺伝子座 (20q13.32) に局在し、GTP 結合蛋白である G 蛋白刺激性 サブユニット (*Gαs*) をコードする。*Gαs* の活性化により細胞内 cAMP 産生が上昇し、これによって cAMP 依存性 A キナーゼ (protein kinase A ; PKA) が活性化される。PKA はセリン・スレオニンキナーゼであり、cAMP response element binding (CREB) や extracellular signal-regulated kinase (ERK) 等の基質をリン酸化することにより、転写調節を行う。我々は、遺伝子改変マウスモデルを用い同変異が *KRAS* シグナルと協調して IPMN の発生を促すことを証明したが (Nat Cell Biol 2018)、ヒト膵腫瘍において浸潤・転移能などの悪性度に関わる経路をどのように制御するか十分に理解されていなかった。



KRAS は最強のがん遺伝子であり、*BRAF* や *PIK3CA* 遺伝子とは相互排他的である。しかし、*KRAS* と *GNAS* 変異が同時にみられる場合が多いのは何故か？この疑問に取り組むべく、研究代表者は以下のふたつの可能性を考えた。

- *GNAS* は *KRAS* シグナルに対して抑制的に働く
- *KRAS* と *GNAS* 変異の組み合わせによって腫瘍の悪性度が異なる

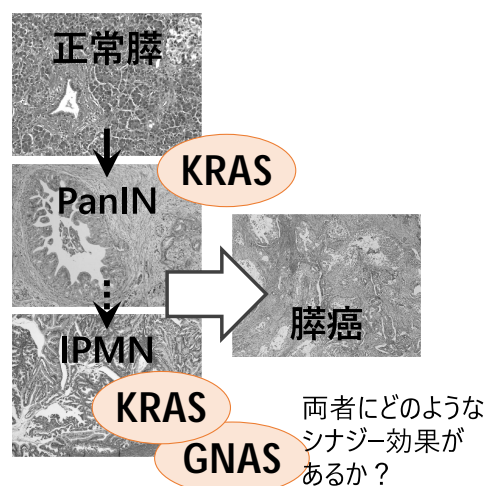
IPMN の多くが低悪性腫瘍であることを考えると、*GNAS* 変異は *KRAS* シグナルと協調して IPMN の初期発生を担う一方、浸潤・転移能など過度な暴走にブレーキをかけている可能性がある。大規模なコホートにおいて、*GNAS* 変異を有する膵癌は全体の 5-10% 程度を占めるが、このような膵癌では、そのブレーキが破綻するか、独立した経路が活性化している可能性があると考え、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、患者由来のヒト膵初代培養系を用いて、*GNAS* 変異によって誘導される分子経路を特定することである。まず、同変異を有する初代細胞を用いて、ゲノム編集の応用により *GNAS* 変異が増殖や浸潤などの悪性形質に関わる分子経路に及ぼす影響を調べる。次に、代表的な *KRAS* シグナルの下流分子に与える影響を生化学的に明らかにする。得られた結果は、新規バイオマーカーや治療標的分子の発見に役立ち、膵癌患者の診断や治療個別化に貢献できる意義がある。

IPMN が膵癌に比べ悪性度が低いことを考えると、*GNAS* 変異が *KRAS* シグナルに起因する強力な浸潤・転移能を抑制している可能性も考えられる。そのような抑制的なシグナル、さらに悪性化の過程でそれが解除される仕組みを明らかにすれば、膵癌治療のヒントが得られることを期待した。

膵癌前駆病変と発癌ルート



過去に *GNAS* は脳や皮膚組織において、癌抑制的に機能することも報告されている。そこで研究代表者は、*GNAS* 変異がヒト膵癌の進展経路をどのように調節するかを明らかにし、

GNAS 変異が関与する分子経路を特定する目標を設定した。このようなアプローチによって得られる情報は、患者のサーベイランスに有用な新規バイオマーカーや、IPMN 関連膵癌の薬理学的な脆弱性を紐解き、膵癌に対する個別化治療に役立つことが期待される。

3. 研究の方法

1) 変異型 GNAS を標的としたゲノム編集株の作製

IPMN 関連膵癌の切除材料より樹立した GNAS R201H 変異を有する患者由来細胞を用い、GNAS R201H 特異的な guide RNA を組み込んだ pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 プラスミド (Addgene #62988) と野生型 GNAS 配列を有するドナー用一本鎖鋳型 DNA をエレクトロポレーション法により導入した。Puromycin 耐性クローンより限界希釈法及び Digital PCR により GNAS 野生型細胞をスクリーニングし、取得した亜株をサンガー法にて確認した。またこのゲノム編集に伴って生ずる PKA や CREB などの代表的な GNAS 下流分子のリン酸化を Western blotting 法により評価した。

2) 細胞及び組織形態、増殖・浸潤能の評価

上記細胞を用いて、血清含有培地を用いた Monolayer 培養、無血清培地（希釈した 2% マトリゲル、2% BSA、1x Insulin-Transferrin-Selenium、10 μ M ROCK 阻害剤を添加）を用いた Matrigel overlay 法によるオルガノイド培養を行った。また NOD-SCID マウスへの皮下移植により Xenograft を作成した。これらの形態と増殖能（Sulforhodamine B assay、CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay 及び腫瘍体積量や Ki-67 標識率）を評価し、Scratch assay による細胞遊走能、Transwell を用いた invasion assay による浸潤能の評価を行った。

3) ムチン組成とその機能の評価

GNAS 変異の有無によるムチンファミリー組成変化を RT-PCR 法、免疫組織染色により評価した。MUC2 及び MUC5B に対してノックダウン亜株を作製し、形態・増殖・浸潤能に対する影響を評価した。

4) GNAS 変異のシグナル経路の同定

上記細胞より RNA を精製し、AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit を用いた RNA 発現解析を行った（Thermo-Fisher Scientific 社製 Ion GeneStudio S5 System を使用した）。Molecular Signature Database より取得した 4 つの Gene set (hallmark, GO, KEGG, REACTOME; curated gene set, ver.7.4) を用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析を行った。Western blotting 法及び qRT-PCR 法により、KRAS 関連分子の活性化及び Epithelial-mesenchymal transition (EMT) 関連遺伝子の発現を調べた。変化の見られた分子については阻害剤を使用し、細胞形質を 2) で述べた方法で評価した。

4. 研究成果

GNAS 変異を有する IPMN 細胞は、GNAS 野生型と比較し、PKA、CREB 及び vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) のリン酸化の程度が強く、変異型 GNAS による古典的 PKA 経路の活性化が確認された。オルガノイド培養や Xenograft では、GNAS 変異型細胞でのみ粘液貯留を反映した泡状に膨らんだ特徴的な形態がみられ、一方 GNAS 野生型細胞は、充実性の集塊を呈した。GNAS 野生型細胞の増殖速度は GNAS 変異型細胞と比較して有意に速いことが明らかとなった。さらに、Xenograft における腫瘍体積量及び Ki-67 標識率からも、GNAS 野生型細胞の腫瘍増殖が速いことが示唆された。

GNAS 変異型及び野生型細胞から得られた遺伝子発現プロファイルを用いて GSEA 解析を行った結果、変異型 GNAS が HALLMARK セットにおける KRAS シグナリング群との拮抗的な関連を有することが示唆された。また、EMT に関与する転写因子群が GNAS 野生型細胞におい

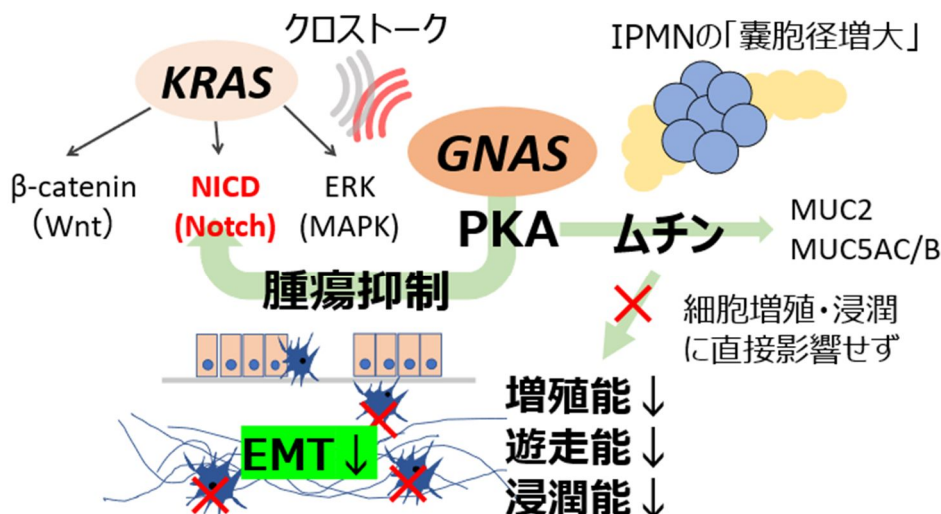
て高発現していた。また、Western blotting 法により、代表的な KRAS 関連経路を検証したところ、GNAS 変異型細胞において、ERK のリン酸化及び核内 カテニンの発現が GNAS 野生型細胞に比較して亢進していることが確認された。このことから、同変異が ERK や WNT シグナルの活性化において KRAS と相乗的に働くことが示唆された。

続いて、GNAS 変異による EMT 転写因子群の発現低下というパラドキシカルと思われる作用のメカニズムに迫るべく、EMT に関わる分子のなかでも TGF- β とともに重要な役割を果たすと考えられている Notch シグナル経路に焦点を絞った。Whole cell lysate 及び核内タンパクを用いた Western blotting 法によって、GNAS 変異型細胞では野生型細胞と比較して、同経路の活性化指標とされる Notch intercellular domain(NICD) の核内発現が顕著に増加することが明らかとなった。この変化が cAMP-PKA 経路に依存するか否かを確認するために、GNAS 変異型へ PKA 阻害剤を添加したところ、24 時間後に核内 NICD 発現が顕著に増加した。さらに、Notch シグナル下流遺伝子の発現も、H89 添加により上昇したことから変異型 GNAS は PKA 依存的に Notch 経路を抑制することが示唆された。

次に、GNAS の変異獲得が膵癌細胞の運動/浸潤能に及ぼす影響を解析した。Scratch assay により評価した結果、変異型 GNAS の野生型へのゲノム編集により細胞遊走能の上昇が確認された。また、Invasion assay の結果より GNAS 変異型細胞は野生型細胞と比較して、浸潤能が低いことが明らかとなった。さらに、GNAS 変異型細胞は PKA 阻害剤の添加により浸潤能増加を認め、EMT 関連遺伝子 BMP2 及び CALD1 の発現上昇に裏付けられる細胞挙動を呈した。一方、GNAS 野生型細胞に Notch 阻害剤を添加すると、浸潤能低下が見られた。

最後に、GNAS 変異とムチン産生の関連を調べるため、分泌型ムチンである MUC1、MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6 の mRNA 発現を確認した結果、GNAS 変異型細胞は野生型細胞に比較して、有意に高発現を認めた。膵癌症例の TCGA データセット (RNA-seq) を用いた解析においても、同様の結果が確認された。ERK 阻害剤 (SCH772984, 10mM) の添加によって、GNAS 変異型細胞では MUC2 の発現は抑制されるが、MUC5B の発現には影響を与えなかった。一方で、H89 は MUC2、MUC5B mRNA 発現の双方を抑制した。また、Notch 阻害剤 (SAHM1, 20mM) の添加によって、MUC5B の発現が増加したことから、MUC2 は PKA-ERK 経路、MUC5B は PKA-Notch 経路により制御されていると考えられた。

以上の結果より、GNAS は KRAS に対し、ERK や WNT シグナルにおいて膵癌の悪性度に相乗効果を示すものの、Notch シグナルの抑制を介して EMT に代表される KRAS 経路の過剰な活性化にブレーキをかけていることが分かった (Kawabata H, *J Gastroenterol* 2022)。GNAS 変異は CDX2 誘導を介して MUC2 発現、即ち腸型形質を誘導することが報告されているが、MUC5B 発現とより強い関連性が示され、ヒト外科手術標本を用いた免疫染色においてもその傾向が示唆された。本研究では、MUC5B の knock-down により腫瘍の粘液産生能の顕著な低下を確認したが、このことが浸潤能に直接影響を与えることはなかった。しかし、GNAS によるムチンファミリー分子群の発現制御は、癌微小環境の変化を介して腫瘍細胞の形質に間接的に影響を及ぼす可能性もある。



*GNAS*変異がNICDを介して腫瘍浸潤に対し抑制的な作用を有することから、*GNAS*を標的とする治療を考える場合には、腫瘍に関連する腫瘍増殖経路を選択的に阻害することに留意する必要がある。*GNAS*-PKAが部分的であれ *KRAS*シグナルに拮抗しうることは、*KRAS*下流経路を標的とする新規創薬へ発展する可能性を秘める。また、本研究では*GNAS*変異による cell autonomousな作用について解析を行ったが、同変異を有する細胞が豊富な粘液産生能を有することから、今後の研究で腫瘍微小環境、さらに膵発癌素地への影響についても着目し、膵癌初期発生段階で生じる*KRAS*と*GNAS*のクロストークの全貌を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kawabata Hidemasa, Ono Yusuke, Tamamura Nobue, et al | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 Mutant GNAS limits tumor aggressiveness in established pancreatic cancer via antagonizing the KRAS-pathway | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology | 6. 最初と最後の頁 208 ~ 220 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-021-01846-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidemasa Kawabata |
| 2. 発表標題 Tumor-suppressive effect of mutant GNAS through the restriction of tumor aggressiveness in established pancreatic cancer. |
| 3. 学会等名 DDW2022/AGA2022（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidemasa Kawabata |
| 2. 発表標題 Mutant GNAS limits tumor aggressiveness in established pancreatic cancer via antagonizing the KRAS-pathway. |
| 3. 学会等名 第26回国際膵臓学会 Oral 27 IPMN(Basic Research)（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 河端秀賢 |
| 2. 発表標題 IPMN関連膵癌におけるPKA-GNAS経路による悪性度制御. |
| 3. 学会等名 第7回 Gastro-PLUS 口頭発表 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hidemasa Kawabata |
| 2. 発表標題 TUMOR-SUPPRESSIVE EFFECT OF MUTANT GNAS THROUGH THE RESTRICTION OF TUMOR AGGRESSIVENESS IN ESTABLISHED PANCREATIC CANCER |
| 3. 学会等名 DDW2022, Digestive disease week, Sandiego (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 河端秀賢 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 日本臨床 増刊号 | 5. 総ページ数 13 |
| 3. 書名 膵癌・胆道癌2023 上 膵癌編 | |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|