

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02893

研究課題名(和文) ユビキチン化酵素の発現異常がもたらす膵発癌促進の分子機序解明とその制御法の開発

研究課題名(英文) Molecular functions of pancreatic oncogenesis induced by dysregulation of ubiquitin ligases.

研究代表者

岸川 孝弘 (Kishikawa, Takahiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00724171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では近年癌の発生や進展に関与するとされるユビキチン関連酵素であるWWP1について、膵癌における分子生物学的役割を明らかにすることを目的とし、遺伝子改変マウスモデルと膵癌細胞株を用いた検討を行った。膵組織特異的にWWP1を過剰発現するマウスでは、変異型KRAS発現による発癌の早期段階である腺房細胞からの腫瘍化を著明に促進させることが分かった。また膵癌細胞株を用いた検討では、WWP1阻害による抗腫瘍効果が観察され、難治癌である膵癌の新たな治療標的分子となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の癌種において発現が亢進しているWWP1の発癌促進機能について、今まで報告のない膵癌において、遺伝子改変マウスモデルを用いて解析した点に新規性があると考えられる。その分子機序についてさらなる解析を進めることで、ユビキチン関連酵素が発癌に積極的に関与する病態モデルの提唱することが可能となるかもしれない。また、WWP1阻害による膵癌細胞の増殖抑制効果についても、その分子機序を含めて検討を行ったことで、WWP1が難治癌である膵癌の新規治療ターゲットとなり得る可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the biological roles of WWP1, an E3 ubiquitin ligase which is involved in the development and progression of various cancers. In the genetically engineered mouse model with specific overexpression of WWP1 in the pancreatic tissue, tumorigenesis originating from acinar cells was significantly accelerated when combining with mutant KRAS expression. Furthermore, WWP1 inhibition suppressed tumor growth in pancreatic cancer cell lines, highlighting therapeutic potential of targeting WWP1.

研究分野：消化器癌

キーワード：膵癌 ユビキチン化 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、その他の癌と比較しても圧倒的に予後が不良な癌として知られており、従来の化学療法に加えて遺伝子標的治療や免疫療法など治療の選択肢が急速に拡大している現在においても進行癌の予後改善効果が極めて乏しいのが現状である。そのため従来の枠組みを超えた新しい切り口からの治療法の開発が渴望されている。

タンパク質は mRNA の情報をもとに翻訳合成された後、アミノ酸に種々の修飾を受けることでその活性や立体構造、細胞内局在を多様に変化させることができる。その代表格であるユビキチン修飾系は、標的となる基質タンパク質にユビキチン鎖を付加することでプロテアソームに誘導して迅速に分解することで、重要なタンパク質量管理機構を担っている事が知られている。ユビキチン修飾には多様な構造様式が存在し、それぞれが異なる生理機能を有しており、古典的な分解機構だけではなく、シグナル伝達、膜タンパク質の輸送、DNA 修復など様々な細胞機能を時空間的に制御することが近年続々と明らかになってきている。

WWP1 は NEDD4 ファミリーに属する HECT 型 E3 リガーゼの一種であるが、乳癌、前立腺癌、胃癌、白血病など複数癌種においてゲノムの増幅や発現の亢進が確認されており、oncogenic なユビキチン化酵素として注目されている。実際 WWP1 は非典型的なユビキチン修飾を癌抑制遺伝子 PTEN に付加することでその機能を低下させて PI3K シグナル経路を活性化すること、種々の癌で WWP1 の機能獲得型の生殖細胞変異が集積していることが報告されている (Lee et al *Science*. 2019; Lee et al *N Engl J Med*. 2020)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「膵発癌における WWP1 の癌促進因子としての分子生物学的意義を多角的に明らかにする」ことである。膵発癌において WWP1 の発現亢進や機能異常が関与することを示した報告はこれまでになく、WWP1 の過剰発現による悪性腫瘍の誘発についてのマウスモデルを用いた検証もなされていない。さらに、膵癌は分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の効果も限定的であり、新規の治療ターゲット分子の導出が希求されていることから、WWP1 を阻害することによる抗腫瘍効果についても検討が望まれる。そこで本研究では膵癌細胞株、遺伝子改変マウスモデルを用いて、発癌機序解明、および治療標的としての可能性の両面から検討を加えていくこととした。

3. 研究の方法

本研究では以下の項目に従って、WWP1 の膵癌における役割について解析を行った。

(1). 膵特異的 *Wwp1-Tg* マウスを用いた新たな膵発癌マウスモデルの構築

Wwp1 の過剰発現が膵発癌に及ぼす影響を評価するために、膵選択的に *Wwp1* を過剰発現するマウスの樹立を行い、その表現型を観察した。

(2). WWP1 阻害による膵癌細胞株の抗腫瘍効果の検討

WWP1 ノックダウンによる膵癌細胞株の増殖抑制効果について評価し、その分子機序について検討を加えた。

(3). WWP1 阻害の in vivo における腫瘍増殖抑制効果の検証

ドキシサイクリン誘導性 WWP1 ノックダウン細胞を用いて、マウス xenograft モデルにおける腫瘍抑制効果を検討した。

4. 研究成果

(1). 膵特異的 *Wwp1-Tg* マウスを用いた新たな膵発癌マウスモデルの構築

WWP1 の過剰発現が膵発癌に及ぼす影響を評価するために、膵選択的に WWP1 を過剰発現するマウスの樹立を行った。Cre 依存性に WWP1 を発現する組織特異的 *Wwp1* トランスジェニックマウス (*Wwp1-Tg*) と膵選択的に Cre を発現する *Ptf1a-Cre* マウスとの交配により、*Pdx1^{Cre/+}; Wwp1^{Tg/+}* (CW) マウスを樹立した。このマウスでは Cre 非存在下では定常的に DsRed を発現し、Cre 遺伝子が発現すると WWP1 と GFP を発現するようになる。このマウスにおいて、膵特異的に WWP1 および GFP が発現することを確認した(図 1)。

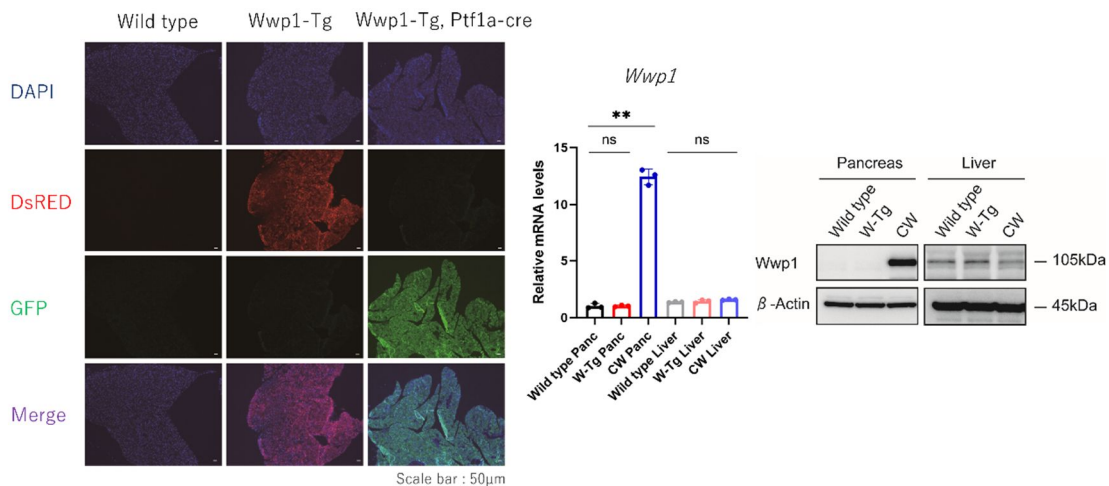


図 1 膵特異的 *Wwp1* 発現マウスの樹立。左) 野生型(Wild type), *Wwp1-Tg*, CW マウスにおける膵臓の DsRED, GFP の発現状況。CW マウスでは DsRED から GFP への発現移行が確認できる。中) RT-qPCR、右) ウェスタンブロッティングによる膵臓、肝臓における WWP1 の発現解析。 *Wwp1* の発現は膵臓のみで誘導されている。

CW マウスでは観察期間内に膵腫瘍形成に至らなかったため、さらに Cre 依存性に *Kras* *G12D* 変異を誘導する *Kras^{G12D}* マウスを交配させた(KCW)。変異型 *Kras* 発現マウスでは、膵臓に良性腫瘍(mPanIN)が形成されるものの、浸潤転移をきたす高悪性度の癌組織の発生は稀であるが、WWP1 の過剰発現を伴う KCW マウスでは出生早期から著明な mPanIN 形成を認めることが明らかになった(図 2)。

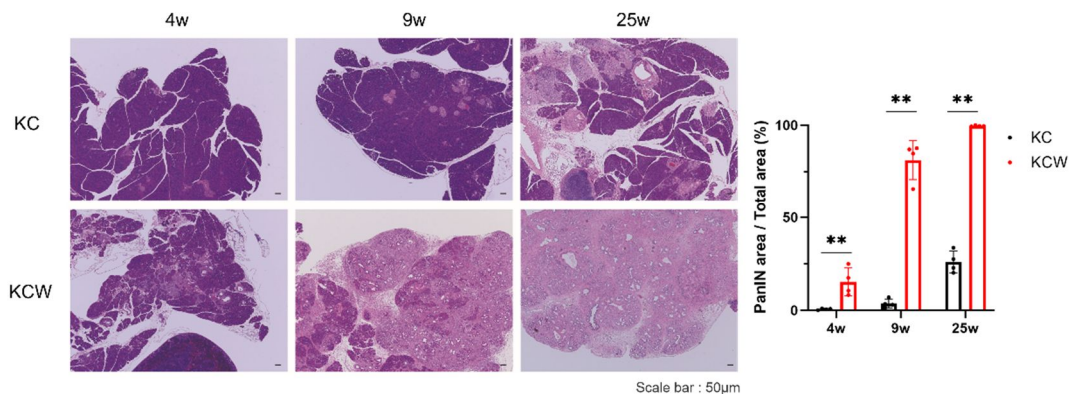


図 2 *Wwp1* 強制発現によって変異 KRAS 誘導マウスでの mPanIN の形成が著明に促進される。左) KC, KCW マウスにおける週齢ごとの膵臓の HE 染色像。KCW マウスでは 4 週から mPanIN が形成され始め、9 週でほぼ全体が腫瘍化する。右) 各週齢の mPanIN の面積比率。 **: P < 0.01

(2). WWP1 阻害による膵癌細胞株の抗腫瘍効果の検討

WWP1 を定常的にノックダウンするコンストラクトを用いて、膵癌細胞株における増殖抑制の評価を行った。その際、ドキサイクリン(Dox)誘導性、濃度依存性に shRNA の発現を制御可能な tet-KD システムを用いた。これにより、WWP1 をノックダウンすることによる即時的な細胞の変化をとらえることが可能となり、実際に複数の膵癌細胞株において Dox 投与による増殖抑制が得られることが分かった(図3)。さらに WWP1 をノックダウンした細胞においてアポトーシスの亢進、細胞周期の停止(G1 arrest)が起きていることを確認した。また、その分子機序を解析した結果、WWP1 のノックダウンによって、PI3K/AKT シグナルの抑制が起きていること、膵癌細胞株においても PI3L/AKT シグナルの抑制因子である PTEN を WWP1 がユビキチン化していることを確認した。

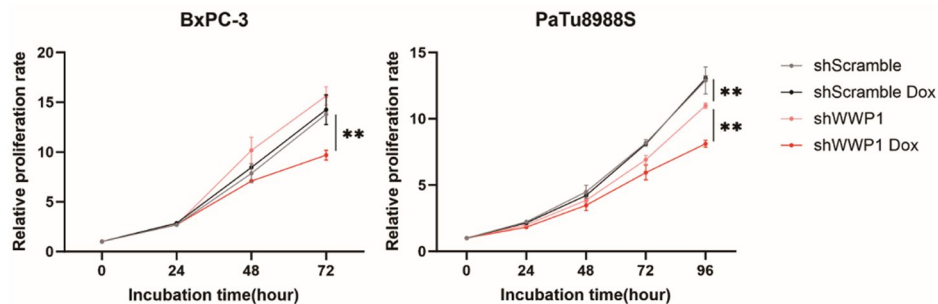


図3 ドキササイクリン(Dox)誘導性に WWP1 がノックダウンされる膵癌細胞株の増殖曲線。Dox 投与によって増殖低下を認める。*: $p < 0.01$

(3). WWP1 阻害の in vivo における腫瘍増殖抑制効果の検証

上記 Dox 誘導性 WWP1 ノックダウン細胞株を、ヌードマウスの背部に移植し xenograft モデルを作成した。腫瘍が形成された時点から Dox の投与を行い、WWP1 阻害による腫瘍増殖能を比較した。その結果 Dox 投与群で著明な腫瘍の縮小効果が得られた。また、xenograft においても WWP1 ノックダウンにより AKT のリン酸化が抑制されていることが示された。

以上の結果から、WWP1 は膵発癌過程の早期の腫瘍化に関与している可能性が示唆された。さらに WWP1 の阻害は膵癌においても治療標的となり得ることが示された。今後腫瘍化のさらなる分子機序の解明を進めるとともに、他の分子標的薬の併用によるシナジー効果についても解析を行い、WWP1 を標的とした膵癌治療の開発へとつなげていきたい。

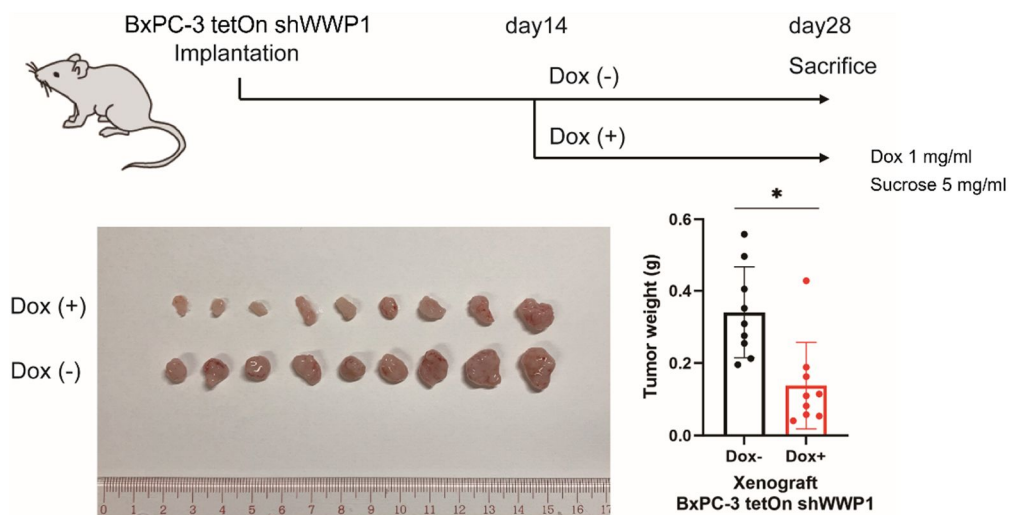


図4 Dox 誘導性 WWP1 ノックダウン細胞 xenograft モデル。上) 実験系の概略。下) xenograft の写真と重量計測値。Dox 投与群で有意な腫瘍増殖低下を認める。*: $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Iwata Takuma, Kishikawa Takahiro, Seimiya Takahiro, Notoya Genso, Suzuki Tatsunori, Shibata Chikako, Miyakawa Yu, Odawara Nariaki, Funato Kazuyoshi, Tanaka Eri, Yamagami Mari, Sekiba Kazuma, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko, Fujishiro Mitsuhiro | 4. 巻 300 |
| 2. 論文標題 Satellite double-stranded RNA induces mesenchymal transition in pancreatic cancer by regulating alternative splicing | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 105742 ~ 105742 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2024.105742 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Miyakawa Yu, Otsuka Motoyuki, Shibata Chikako, Seimiya Takahiro, Yamamoto Keisuke, Ishibashi Rei, Kishikawa Takahiro, Tanaka Eri, Isagawa Takayuki, Takeda Norihiko, Kamio Noriaki, Imai Kenichi, Fujishiro Mitsuhiro | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Gut Bacteria-derived Membrane Vesicles Induce Colonic Dysplasia by Inducing DNA Damage in Colon Epithelial Cells | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology | 6. 最初と最後の頁 745 ~ 767 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2024.01.010 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kanai Sachiko, Fujiwara Hiroaki, Mizuno Suguru, Kishikawa Takahiro, Nakatsuka Takuma, Hamada Tsuyoshi, Tanaka Mariko, Arita Junichi, Nakai Yousuke, Isayama Hiroyuki, Kasuga Masato, Tateishi Ryosuke, Tateishi Keisuke, Ushiku Tetsuo, Hasegawa Kiyoshi, Koike Kazuhiko, Fujishiro Mitsuhiro | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Increased expression of TNFRSF14 and LIGHT in biliary epithelial cells of patients with primary sclerosing cholangitis | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Digestive and Liver Disease | 6. 最初と最後の頁 305 ~ 311 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dld.2023.08.057 | 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 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Funato Kazuyoshi, Miyake Nozomi, Sekiba Kazuma, Miyakawa Yu, Seimiya Takahiro, Shibata Chikako, Kishikawa Takahiro, Otsuka Motoyuki | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Cabozantinib inhibits HBV-RNA transcription by decreasing STAT3 binding to the enhancer region of cccDNA | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Hepatology Communications | 6. 最初と最後の頁 e0313 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HCG.0000000000000313 | 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 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Shibata Chikako, Otsuka Motoyuki, Shimizu Takayuki, Seimiya Takahiro, Kishikawa Takahiro, Aoki Taku, Fujishiro Mitsuhiro | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Extracellular vesicle mediated RNA editing may underlie the heterogeneity and spread of hepatocellular carcinoma in human tissue and in vitro | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Reports | 6. 最初と最後の頁 194 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2023.8631 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Seimiya Takahiro, Suzuki Tatsunori, Iwata Takuma, Kishikawa Takahiro, Sekiba Kazuma, Shibata Chikako, Ishigaki Kazunaga, Fujiwara Hiroaki, Oyama Hiroki, Kanai Sachiko, Sato Tatsuya, Nakai Yousuke, Ishibashi Rei, Moriyama Masaru, Nakagawa Ryo, Ijichi Hideaki, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Combination of serum human satellite RNA and miR-21-5p levels as a biomarker for pancreatic cancer | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 106021 ~ 106021 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106021 | 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Kato Hiroyuki, Tateishi Keisuke, Iwadate Dosuke, Yamamoto Keisuke, Fujiwara Hiroaki, Nakatsuka Takuma, Kudo Yotaro, Hayakawa Yoku, Ijichi Hideaki, Otsuka Motoyuki, Kishikawa Takahiro, Takahashi Ryota, Miyabayashi Koji, Nakai Yousuke, Hirata Yoshihiro, Toyoda Atsushi, Morishita Shinichi, Fujishiro Mitsuhiro | 4. 巻 114 |
| 2. 論文標題 HNF1B driven three dimensional chromatin structure for molecular classification in pancreatic cancers | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 1672 ~ 1685 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15690 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Shibata Chikako, Otsuka Motoyuki, Seimiya Takahiro, Ishigaki Kazunaga, Miyakawa Yu, Kishikawa Takahiro, Fujishiro Mitsuhiro | 4. 巻 637 |
| 2. 論文標題 Smaller extracellular vesicles are released from pancreatic cancer cells by the alteration of the lipid composition under low glucose conditions | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 314 ~ 321 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.11.040 | 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 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Shibata Chikako, Otsuka Motoyuki, Seimiya Takahiro, Kishikawa Takahiro, Ishigaki Kazunaga, Fujishiro Mitsuhiro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Lipolysis by pancreatic cancer derived extracellular vesicles in cancer associated cachexia via specific integrins | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Clinical and Translational Medicine | 6. 最初と最後の頁 e1089 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ctm2.1089 | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kishikawa Takahiro, Higuchi Hiroshi, Wang Limei, Panch Nivedita, Maymi Valerie, Best Sachem, Lee Samuel, Notoya Genso, Toker Alex, Matesic Lydia E., Wulf Gerburg M., Wei Wenyi, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko, Clohessy John G., Lee Yu-Ru, Pandolfi Pier Paolo | 4. 巻 131 |
| 2. 論文標題 WWP1 inactivation enhances efficacy of PI3K inhibitors while suppressing their toxicities in breast cancer models | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation | 6. 最初と最後の頁 e140436 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI140436 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Suzuki Tatsunori, Kishikawa Takahiro, Sato Tatsuyuki, Takeda Norihiko, Sugiura Yuki, Seimiya Takahiro, Sekiba Kazuma, Ohno Motoko, Iwata Takuma, Ishibashi Rei, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Mutant KRAS drives metabolic reprogramming and autophagic flux in premalignant pancreatic cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy | 6. 最初と最後の頁 505 ~ 518 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-021-00326-4 | 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 - |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takahiro Kishikawa, Takuma Iwata, Takahiro Seimiya, Genso Notoya, Tatsunori Suzuki, Chikako Shibata, Kazuhiko Koike, Motoyuki Otsuka, and Mitsuhiro Fujishiro |
| 2. 発表標題 1. Double-stranded RNA derived from tandem repeat sequences induces mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by regulating alternative splicing. |
| 3. 学会等名 AACR Special Conference in Cancer Research: Pancreatic Cancer (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

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