

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659167

研究課題名(和文)GPCR信号伝達経路を標的とする新規膵腫瘍分子診療法の開発

研究課題名(英文)Identification of molecular targets associated with activation of GPCR signal pathway in pancreatic cancer

研究代表者

古川 徹(Furukawa, Toru)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：30282122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がん細胞、正常膵管上皮細胞に活性化型変異GNAS遺伝子を導入して表現型を解析し、分子診療標的となるGPCR経路活性化関連遺伝子を網羅的に同定した。変異GNAS導入により細胞内cAMP濃度は上昇しGPCR経路が活性化されたが細胞の生存増殖は抑制された。変異GNAS導入により粘液遺伝子を含む大規模な遺伝子発現変化が誘導され、MAPK、PI3K経路とGPCR経路との相互作用が示された。GNAS遺伝子改変マウスモデルを作成し、KrasG12Dとの二重変異モデルで膵管内乳頭粘液性腫瘍類似の腫瘍が発生することを示した。本モデルはGNAS変異関連疾患のバイオマーカー検索や薬物試験に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined phenotypes of pancreatic ductal lineage cells with exogenous expression of either wild-type or mutated (R201H) GNAS. We found that exogenous GNAS upregulated intracellular cAMP and varying altered expression of mucin genes. Exogenous GNAS did not promote cell growth but suppressed it in some of the cells. Global gene expression profiling showed drastic alterations of the gene expression profiles by exogenous mutated GNAS and led to identify downstream genes of activated GPCR pathway. We found interactions between the signaling pathways of GPCR, MAPK, and PI3K on expression of mucin genes. We generated transgenic mice lines with Lox-STOP-Lox (LSL)-GNASR201H under CAG promoter. By crossing this mice line with LSL-KrasG12D mice and Ptf1a-cre mice, we showed that mutated GNAS and Kras cooperatively promoted pancreatic tumorigenesis recapitulating IPMN. This mouse model may serve as a platform to find biomarkers and effective drugs for diseases associated with GNAS mutations.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵臓がん シグナル伝達 GPCR MAPK PI3K 遺伝子発現 分子標的 GNAS

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは我が国では臓器別がん死亡数で全臓器中第5位であり、年間2万4千人あまりが罹患し2万2千人程が死亡している。罹患数と死亡数の対比で明らかなようにその予後は極めて悪く、5年生存率は僅かに5%程度である。近年のがんの診療においてはがん発生進展の分子機構をふまえた分子診療戦略が極めて有望であることが示されており、膵臓がんにおいても同様と考えられるがこれまでに有効な分子標的治療法は開発されていない。申請者は膵臓がんの分子発生機構解明から新規分子診療法の開発を目標に研究しており、これまでに膵臓がんの多段階発生機構の分子メカニズムの解明を進めて来た。これらの解析の中で、申請者は膵臓がん前駆病変の一種である膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)を対象に全ゲノムエクソン配列解析を行い、その結果、Gタンパク共役型受容体(GPCR)信号伝達経路におけるGTPase分子であるGsaをコードする遺伝子GNASがIPMNにおいて高頻度に突然変異を来していることを見出した(Furukawa T et al. Sci Rep 1:161, 2011)。GNAS変異はIPMNの40%程度に認められるが、GsaタンパクはIPMNではほぼ100%で強発現しており、さらに、GPCR経路の下流のエフェクター分子に相当するProtein kinase A (PKA)による活性化基質が70%程度で発現していた。また、GNAS変異はKRAS変異と重なる事が多く、GPCR活性化がmitogen-activated protein kinase (MAPK)活性化と相乗的に作用している事が示唆される。このことは、IPMNにおいてGNASの変異とGPCR経路の活性化が腫瘍発生進展にほぼ必須の重要な役割を担っており、その4割程度においてはGNASの活性化型変異がGPCR経路活性化の原因であることを示すものである。一方で、通常型の膵臓がん症例における解析ではGNASの変異は全く認められなかったもののPKAの活性化基質はIPMNと同程度に高頻度に発現しており、未知のPKA活性化機構が存在する事が示唆された。以上の結果は膵腫瘍にGPCR経路異常が密接に関与している事を示す所見であり、これまで全く知られていなかった、また、予期されていなかった結果であった。

2. 研究の目的

膵臓がん細胞におけるGPCR信号伝達経路活性化の作用及びそのエフェクター分子を同定して、信号伝達経路モデュレーター化合物を使った信号伝達経路相互作用の解析、遺伝子改変マウスモデルの解析から膵臓がんにおけるGPCR経路活性化の意義を明らかにし、膵腫瘍の新規分子診療法の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)培養細胞

膵臓がん細胞として PK-8, PCI-35, MIA PaCa-2、正常膵管上皮不死化細胞として HPDE を用いた。

(2)GNAS 遺伝子クローニングと遺伝子導入

GNAS 遺伝子は cDNA ライブラリーから 蛋白翻訳領域に相当する cDNA 断片を PCR 法で増幅し、pcDNA3.1-V5/His ベクターに挿入した。変異 GNAS(GNAS R201H)は site directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて作成した。遺伝子導入は lipofectamin (Life Technologies)を用いて行った。

(3)免疫プロット、リアルタイム定量 PCR 法

免疫プロットは XV-Pantera system (DRC)を用い、一次抗体は anti-V5 (Life Technologies), anti-Gsa (BD Biosciences; San Diego, CA), anti-MAPK, activated (Sigma-Aldrich), anti-ERK2 (BD Biosciences), anti-phospho-Akt (Cell Signaling Technology Inc), anti-Akt (Cell Signaling Technology Inc.), anti-b-actin (Sigma-Aldrich)を、2次抗体は HRP 標識抗マウスあるいはラビット IgG(GE Healthcare)を用い、シグナル検出には ECL Reagent (GE Healthcare)を用いた。リアルタイム定量 PCR は Taqman assay kit (Life Technologies)を用いた。

(4) cyclic AMP (cAMP)アッセイ

cAMP は cAMP EIA kit (Cayman Chemical Company Inc)を用いて行った。

(5)コロニー形成、MTT 増殖アッセイ

コロニー形成アッセイでは遺伝子導入細胞を 10-cm 培養皿に播き G418 添加培地で 2-4 週間培養した。MTT 増殖アッセイは導入細胞を 96 ウェル培養プレートに播き、連続 5 日間 MTT 比色反応で細胞増殖を定量した

(6) Serial analysis of gene expression (SAGE)

SOLiD SAGE kit, SOLiD system (Life Technologies)を用いて SAGE 解析を行った。

(7)GNAS 導入遺伝子改変マウスモデル

CAG-Lox-STOP-Lox-GNAS-wild or R201H ベクターを作成し、エレクトロポレーションで ES 細胞に導入し、スクリーニング後、シングルトランスジェニックマウスラインを樹立した。Ptf1a-cre マウスと交配して膵臓特異的に野生型あるいは変異型 GNAS 遺伝子を発現するコンディショナルマウスモデルを作成した。LSL-KrasG12D ノックインマウス(David Tuveson 博士提供)と交配して Kras-GNAS 二重トランスジェニックマウスを作成した。

(8)統計解析

統計解析には SPSS 統計解析ソフトを使用

した。P < 0.05 を有意差有りとした。

4. 研究成果

(1) 膵臓がん細胞における活性化型変異 *GNAS* 導入の効果

膵臓がん細胞において GPCR 経路活性化の影響を調べるため野生型および活性化変異型 *GNAS* 遺伝子を遺伝子発現ベクターにクローニングし、膵臓がん細胞株、正常膵管上皮不死化細胞株に導入した。用いた膵臓がん細胞は PK-8, PCI-35, MIA PaCa-2 であり、それぞれ *KRAS* 遺伝子変異を有している。MAPK 経路が内因的に活性化している。正常膵管上皮細胞株は HPDE を用いた。野生型及び変異型 *GNAS* 遺伝子を導入後、Gsa の発現を特異的抗体を用いた免疫プロット法で解析したところ、Gsa の過量発現を確認した。それらの細胞における cAMP の濃度は何れでもコントロールベクター導入細胞に比し上昇を認め、野生型 *GNAS* 遺伝子導入細胞よりも変異型 *GNAS* 遺伝子導入細胞で上昇の程度が強かった。しかし、遺伝子導入後の Gsa の発現程度はほぼ同等であったが、cAMP の上昇の程度は細胞株により差が認められた。この結果は、野生型及び変異型 *GNAS* 遺伝子の過量発現により GPCR 信号伝達経路が活性化することを示すものと考えられた。

GNAS 変異が頻繁に認められる IPMN では粘液の産生が亢進していることが特徴であるため、*GNAS* 遺伝子導入細胞で粘液蛋白遺伝子である *MUC2*, *MUC5AC* の発現が変化するか否かをリアルタイム定量 PCR 法で解析したところ、HPDE, PK-8 においては何れの発現も変異 *GNAS* 導入細胞で増加したものの、PCI-35, MIA PaCa-2 では減少していた。この結果は、*GNAS* 遺伝子導入による GPCR 信号伝達経路活性化により粘液蛋白遺伝子の発現が変化することを示すものと考えられた。

GNAS 導入により細胞生存増殖がどのように変化するかを明らかにするためコロニー形成アッセイを行ったところ、PK-8 細胞では野生型および変異型 *GNAS* 導入により何れでもコロニー形成は有意に減少した。PCI-35, MIA PaCa-2 では変化が無かったが、導入直後の一過性増殖を解析する MTT アッセイにおいては MIA PaCa-2 の増殖が有意に減少した。細胞回転の状態には変化がなかった。これらの結果は、*GNAS* 導入による GPCR 信号伝達経路活性化により膵臓がん細胞の増殖は抑制されることを示すものと考えられた。

GNAS 導入によりグローバルな遺伝子発現がどのように変化するかを解析するため、次世代型シーケンサーを使用して網羅的遺伝子発現解析である SAGE 解析を行った。変異 *GNAS* 導入により発現変動が大きい(4 倍以上あるいは 1/4 倍以下)遺伝子数は PK-8 で 2258、PCI-35 で 265、MIA PaCa-2 で 66 個

であり、PK-8 が *GNAS* 導入による GPCR 活性化に極めて反応性が高く、PCI-35, MIA PaCa-2 は比較的低いことが明らかとなった。発現変動遺伝子の内容を検索すると、PK-8 では IPMN で発現亢進が認められる複数の粘液蛋白遺伝子の発現が増加していた。PCI-25, MIA PaCa-2 では粘液蛋白遺伝子の発現は減少しているものが多かったが *MUC1* は増加していた。PK-8 では *MUC1* は減少していた。*MUC1* の発現亢進は通常型の膵臓がんでよく認められるものの IPMN では稀である。PK-8 では GPCR 活性化により IPMN の形質に近い表現型を示すものの、PCI-35, MIA PaCa-2 では通常型膵臓がんの形質に近い表現型を示すものと考えられた。膵臓がんが IPMN 型と通常型に大きく分けられることは臨床的にも経験されることであり、GPCR 経路活性化の表現型の違いがそのような特徴に深く関与していることが示唆された。遺伝子発現解析により発現変動が大きい遺伝子は膵臓がん、IPMN で重要な役割を担っていることが知られている信号伝達経路である MAPK 経路、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 経路に多く属していることが明らかとなった。発現変動が大きい遺伝子を抽出することで、GPCR 活性化に反応して変動するエフェクター分子を多数同定することが出来た。これらは分子診療標的として有用と考えられた。また、GPCR 信号伝達経路の活性化が MAPK, PI3K 経路の機能を変化させることを示すものと考えられた。

GPCR 信号伝達経路と MAPK, PI3K 経路の相互作用を明らかにするため *GNAS* 導入細胞に MAPK 阻害剤、PI3K 阻害剤を加え、粘液蛋白遺伝子発現の変化を解析したところ、cAMP レベルは PK8 では変化しなかったが PCI-35 においては MAPK 阻害剤では減少したが PI3K 阻害剤では増加した。粘液蛋白発現については MAPK 阻害剤で *MUC2* 発現は何れの細胞でも減少したが *MUC5AC* 発現は PK-8 では増加、PCI-35 では減少した。PI3K 阻害剤により *MUC2* は何れの細胞でも減少したが、*MUC5AC* は変化が無かった。これらの結果から、PK-8 では GPCR 経路と MAPK 経路、PI3K 経路は独立しているが遺伝子発現には相加的あるいは相殺的に作用しており、PCI-35 では GPCR 経路に対して MAPK は相加的に、PI3K 経路は相殺的に作用し、遺伝子発現も複雑に変化することが明らかとなった。膵臓がん細胞における GPCR 経路と MAPK, PI3K 経路の相互作用においても IPMN 型と通常型膵臓がんで大きく異なることが示された。

以上より、膵臓がん細胞における GPCR 経路活性化はがん細胞の増殖を抑制する方向に働き、遺伝子発現の大規模な変化をもたらして、MAPK 経路、PI3K 経路との複雑な相互作用を来して IPMN 型と通常型で大きく異なる表現型をもたらすことが明らかとな

った。GPCR 経路活性化によりアグレッシブな通常型膵臓がんをより穏健な IPMN 型の腫瘍に変換させられる可能性が示唆された。これらの結果は論文発表した(Komatsu H et al. PLoS One 9(2): e87875, 2014)。

(2) 遺伝子改変マウスモデルによる変異 *GNAS* の膵腫瘍発生進展に果たす役割の解明

変異 *GNAS* の生体内における膵腫瘍発生進展に果たす役割を明らかにするため、*CAG-Lox-STOP-Lox-GNAS* (*CAG-LSL-GNAS*)を生殖細胞系列 DNA に導入し、*Ptf1a-cre* マウスと交配することにより、野生型あるいは変異型 *GNAS* を *Ptf1a* プロモーター調節下にコンディショナルに発現する遺伝子改変マウスモデル *Tg(CAG-LSL-GNAS);Ptf1a-cre* を作成した。*GNASR201H* 発現マウス膵は非改変マウス膵と比較して膵組織内 cAMP の上昇を認め、生後 2 ヶ月までで肉眼的腫瘍発生は認めなかったものの、膵管の小規模な拡張と小葉の萎縮、周囲実質の軽度線維化を認めた。次いで、GPCR 活性化と RAS-MAPK 活性化との生体内での相互作用を明らかにするため、*Tg(CAG-LSL-GNAS);Ptf1a-cre* を活性化型変異 *Kras* を持つ *LSL-KrasG12D* マウスと交配し、*Tg(CAG-LSL-GNAS);LSL-KrasG12D;Ptf1a-cre* を作成した。*GNASR201H+KrasG12D* マウスは生後 5 週まで膵嚢胞性腫瘍を発生し、腫瘍は拡張した膵管内に乳頭状に増生する粘液性の異型上皮より構成され、ヒト IPMN と極めて類似していた。以上より、膵における GPCR 経路の活性化は RAS-MAPK 活性化と相乗作用を来して膵管内乳頭粘液性腫瘍発生の直接的な原因となることが明らかとなった。よって、*GNAS* を標的とする GPCR 経路活性化は RAS-MAPK 活性化が主体となるアグレッシブな通常型の膵管がんをより穏健な性質に変化させることを *in vitro*, *in vivo* で明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Furukawa T. Impacts of activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in pancreatic cancer. *Front Oncol* 査読有 5:23, 2015. DOI: 10.3389/fonc.2015.00023

Komatsu H, Furukawa T, 他 8 名, 10 番目. A *GNAS* mutation found in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms induces drastic alterations of gene expression profiles with upregulation of mucin genes. *PLoS One* 査読有 9(2): e87875,

2014. DOI:10.1371/journal.pone.0087875

古川徹 IPMN の病理 臨床消化器内科 査読無 29(13):1667-1673, 2014

古川徹 IPMN-組織学的亜型と分子病理学的知見 肝胆膵 査読無 67(5):709-715, 2013

古川徹 膵臓腫瘍の分子病理-全ゲノム解析時代を俯瞰して- 病理と臨床 査読無 31(3):297-301, 2013

古川徹 全エクソン解析より明らかとなった膵管内乳頭粘液性腫瘍における高頻度の *GNAS* 変異 分子消化器病 査読無 9(2):185-188, 2012

古川徹, 他 5 名, 1 番目 膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)・粘液性嚢胞性腫瘍(MCN) 病因と病態 日本内科学会雑誌 査読無 101(1):57-63, 2012

〔学会発表〕(計 11 件)

Furukawa T. Intraductal neoplasms of the pancreas. VI Japan-Mongolia International Cancer Symposium 2014. 2014 年 9 月 20 日 ウランバートル市(モンゴル).

古川徹 膵管内腫瘍についての最新の知見 第 7 回島根消化器病懇談会 2014 年 7 月 19 日 ホテル一畑(島根県・松江市).

Komatsu H, Furukawa T, 他 7 名 9 番目. A *GNAS* mutation found in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms changes mucin gene expression and gene expression profiles. 105th Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2014 年 4 月 5-9 日 サンディエゴ市(アメリカ合衆国).

Komatsu H, Furukawa T, 他 7 名 9 番目. Mutation of *GNAS* found in IPMN induces alteration of gene expression profiles with promotion of mucin gene expression. 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2013 年 10 月 3-5 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

小松 弘武, 古川 徹. 他 7 名 9 番目. 膵管内乳頭粘液性腫瘍において見出された変異 *GNAS* は mucin 遺伝子発現を促進する 第 44 回日本膵臓学会大会 2013 年 7 月 25-26 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市).

小松 弘武, 古川 徹. 他 7 名 9 番目. 膵管内乳頭粘液性腫瘍において見出された変異 *GNAS* の機能解析 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013 年 4 月 11-13 日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

古川徹 膵管内乳頭粘液性乳頭腫瘍における *GNAS* 遺伝子変異の発見とその意義 第 16 回消化器病態研究会 平成 25 年 1 月 29 日 芝蘭会館(京都府・京都市).

Kuboki Y, Furukawa T, 他 5 名, 7 番目. Clinicopathological significance of molecular aberrations in G-protein coupled receptor pathway in intraductal papillary

mucinous neoplasms of the pancreas. Joint Meeting of American Pancreatic Association and International Association of Pancreatology 2012年10月31日-11月3日 マイアミ市(アメリカ合衆国).

古川徹, 他7名, 1番目. 膵管内腫瘍関連分子異常の全エクソーム解析による同定 第78回東京女子医科大学学会総会 2012年9月29日 東京女子医科大学弥生記念講堂(東京都).

久保木友子, 古川徹, 他5名, 7番目. 膵管内乳頭粘液性腫瘍における GPCR 信号伝達経路の異常 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日 ロイトン札幌(北海道・札幌市).

久保木友子, 古川徹, 他4名, 6番目. 膵管内乳頭粘液性腫瘍における GNAS 遺伝子変異の特徴とその意義 第43回日本膵臓学会大会 2012年6月28-29日 ホテルメトロポリタン山形(山形県・山形市).

〔図書〕(計 2件)

Furuakwa T. Histological subclassification and its clinical significance. Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. Tanaka M. ed. pp 27-42. DOI: 10.1007/978-4-431-54472-2_4 Springer Japan, Tokyo 2014

古川徹 IPMN の分子機序 林紀夫、日比紀文、上西紀夫、下瀬川徹、編 Annual Review 消化器 2013 pp.260-4 中外医学社 東京 2013

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 徹 (FURUKAWA, Toru)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：30282122