

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860263

研究課題名(和文)膵発癌における転写因子EVI1の分子ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of EVI1 molecular network in pancreatic carcinogenesis

研究代表者

田中 麻理子(Tanaka, Mariko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50645710

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)：膵がんは予後不良な疾患で、発がん初期機構は未解明な部分が多い。KRAS遺伝子変異は膵発がんの重要分子だが、それ単独では発がんの全てを説明し得ない。申請者は発がん初期の胃上皮形質獲得に注目し、膵前がん病変及び膵がん転写因子EVI1が過剰発現し、EVI1がKRAS抑制分子miR-96の発現抑制を介してKRAS発現を上昇させ腫瘍促進的に働くことを明らかにした。これは、膵発がん初期にEVI1過剰発現とKRAS遺伝子変異が協調的にKRAS経路活性化に働くこと、EVI1やmiR-96が有用なマーカーかつ治療対象となり得ることを示唆しており、現在の膵がん治療の限界に新しい方向性を提唱する重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer typically manifests a very poor prognosis. The precise mechanism of pancreatic carcinogenesis is still unclear. Although an activating point mutation of KRAS is an early event in pancreatic carcinogenesis, it remains unclear whether KRAS mutation is solely responsible for initiation of pancreatic carcinogenesis. By tracking potential transcriptional regulators of gastric epithelial genes in pancreatic neoplasms, we found that overt expression of ecotropic viral integration site 1 (EVI1) oncoprotein is a hallmark of human pancreatic cancer and its precursors. In pancreatic cancer cells, EVI1 poses the oncogenic role by upregulating KRAS expression through suppression of a potent KRAS suppressor, miR-96. Results suggest that EVI1 oncoprotein and KRAS mutation converge on activation of the KRAS pathway in the early phase of pancreatic carcinogenesis and implicate EVI1 and/or miR-96 as candidate early markers and therapeutic targets in pancreatic cancer.

研究分野：病理学

キーワード：膵癌 発癌 分化異常 EVI1 KRAS microRNA

1. 研究開始当初の背景

膵がんは本邦のがん死因第4位を占める予後不良ながん腫である。最多の組織型は膵管がんで、前がん病変として pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN), intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN), mucinous cystic neoplasm (MCN) がある。エクソーム解析やコピー数解析から、膵管がんの大半に KRAS の活性型変異が、半数以上に TP53, SMAD4, CDKN2A の不活性化が認められ膵管がんの中核シグナルはクロマチン制御機構を含めた13個に集約されること、転移巣の遺伝的不均一性 (heterogeneity) は原発巣に既に存在していること、家族性膵がんには特定の生殖細胞突然変異 (germline mutation) がみられることなどが明らかとなり、膵管がんの性質や進展機構が解明されてきた (Biankin, A. V. et al, *Nature* 491:399–405, 2012; Jones, S. et al, *Science* 321:1801–1806, 2008, Yachida et al, *Nature* 467:1114–1117, 2010, Jones S et al, *Science* 324:217, 2009.)。一方、発がん初期の機構については未解明の部分が多い。膵管がんに至る多段階発がんモデルが存在し、初期には膵腺房細胞が膵管上皮へと化生を起し (acinar-to-ductal metaplasia: ADM)、PanIN を経てがん化すること、この際 KRAS 変異が鍵となることが *in vitro* や遺伝子改変マウスモデルから提唱されている。KRAS 変異は膵がんの最重要因子であるが、多段階発がんでは初期 (low-grade PanIN) での KRAS 変異率は30%程度と低く、また進行期ほどその変異頻度が高くなること、遺伝子改変マウスモデルでは KRAS 変異単独での膵発がん誘導はヒトのそれを完全には模倣できていないことなどから、膵管 (あるいは腺房) における遺伝子異常は KRAS 変異が必ずしも最初ではないと考えられる。

膵がんの生物学的特徴を理解する上で、発がん初期機構の解明は重要であり、KRAS 変異の他にどのような機構が寄与するのかについて多角的アプローチを用いた研究が行われている。申請者はヒト検体における発がん初期の形態学的変化、特に胃型形質獲得が起こることに注目し、KRAS 変異に加えて発がん開始を推進する分子機序の同定を目的に検討を行った。研究開始時点では、既に申請者が同定していた、膵前がん病変で発現する胃上皮関連分子 claudin-18 などを指標とし (Tanaka et al, *J Histochem Cytochem* 59:942-52, 2011) マイクロアレイ解析と *in silico* 解析から、膵がんにおいて胃上皮形質と発現相関を示す転写因子 Ecotropic virus integration 1 site (EVI1) を見出しており、

EVI1 を軸に研究を進めた。

2. 研究の目的

膵がんの発がん初期機構解明のために、EVI1 に着目し、膵発がんに必要な KRAS 分子との関係を軸に、転写因子 EVI1 を取り巻くネットワークが膵発がん過程にどのように寄与しているかを明らかにすることを目的とした。

- (1) ヒト検体における EVI1 発現と臨床病理学的検討：ヒト膵切除組織検体 (非腫瘍性膵、膵前がん病変、膵がん) を用い、発がん初期の EVI1 発現を検討する。
- (2) *In vitro* 再構成系での EVI1 の腫瘍促進能、EVI1 と KRAS の関係性の検討：ヒト膵管上皮細胞 (HPDE 細胞) と膵がん細胞における EVI1 発現抑制が腫瘍促進的に作用するか、KRAS との発現相関を示すかを検討する。
- (3) EVI1-KRAS ネットワークの解明：EVI1 と KRAS の間に介在する経路を同定し、治療介入可能な EVI1 下流標的分子を見出す。

3. 研究の方法

- (1) 膵がんおよび前がん病変における EVI1 発現：東京大学医学部附属病院の膵腫瘍外科切除症例224例 (1986～2009年) に対し、Tissue Micro Array (TMA) を作成し免疫組織化学的に EVI1 発現を検討した。
- (2) 膵がん細胞における EVI1 の腫瘍促進能：EVI1 に対する siRNA を培養細胞に導入し、細胞増殖能評価、wound healing assay、細胞周期解析を行った。
- (3) 膵がん細胞における EVI1 による KRAS 経路の修飾：定量的 RT-PCR と western blotting により KRAS およびその下流経路の発現変動を検討した。
- (4) 膵がんにおける EVI1-KRAS ネットワークの描出：EVI1 の KRAS 制御機構について、KRAS プロモーター領域に対する EVI1 の直接結合の有無をクロマチン免疫沈降とルシフェラーゼレポーターアッセイで検証した。直接結合を見出すことが出来なかった場合は、microRNA (miRNA) が介在分子として作用するかを文献的検討及び結合予測プログラムにより探索し、定量的 RT-PCR で検証した。さらに、miRNA 前駆体と host gene の定量により、EVI1 が標的 miRNA を転写レベルで制御しているかを検証した。また、対象の miRNA の導入により、EVI1 の膵がん細胞における腫瘍促進能が再現され

るか、および対象 miRNA の発現抑制 (tough decoy RNA) が EVI1 発現抑制による腫瘍促進能の低下を補填できるかを検討した。最後に、公用の microarray データセット (GSE17891) を用い EVI1 と KRAS の mRNA 発現を比較した。

4. 研究成果

(1) ヒト膵腫瘍における EVI1 過剰発現：ヒト非腫瘍性膵、膵前がん病変、膵管がんの免疫組織学的検討から、EVI1 は正常の形態を維持した膵管上皮に発現しない一方、ほぼすべての膵前がん病変でびまん性の発現が確認された。腺上皮の形態を保持できない低分化型膵がんでは EVI1 発現が低下するものの、分化度の高い膵管がんでは発現が良く保たれていた。膵腫瘍性病変での EVI1 発現はその他の胃型形質よりも広範で、組織亜型に依存しておらず、EVI1 は膵腫瘍化の初期のメカニズムに参与する可能性が考えられ、腫瘍性膵上皮の検出に優れた指標となりうる。

(2) 膵がん細胞における EVI1 の腫瘍促進的作用：EVI1 発現抑制実験から EVI1 は HPDE 細胞と膵がん細胞にて細胞増殖能、移動能、細胞周期を正に制御し、腫瘍促進能を有することが分かった。

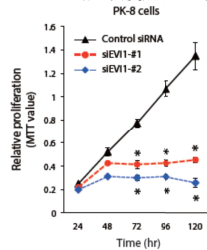


図 1: PK8 細胞における EVI1 発現抑制による細胞増殖能の低下

(3) 膵がん細胞における EVI1 による KRAS-ERK-p27Kip1 経路の修飾：HPDE 細胞と膵がん細胞において KRAS 変異の有無によらず EVI1 は KRAS 発現を正に制御し、KRAS 下流経路のうち RAF-MEK-ERK 経路に主として作用し、p27Kip1 の発現制御を介して細胞周期に働きかけることが分かった。他の KRAS 下流経路である PI3K、c-Jun、NF- κ B 等の関与はみられなかった。

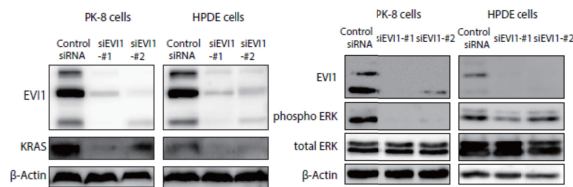


図 2: PK-8 細胞と HPDE 細胞における EVI1 発現抑制による KRAS-ERK 経路抑制

(4) EVI1-miRNA-KRAS axis の同定：HPDE 細胞と膵がん細胞において EVI1 は miRNA-96 と miRNA-181a に直接結合し、それらの発現を転写レベルで制御した。中でも miR-96 は KRAS に直接結合し、KRAS-ERK-p27 経路に作用し、増殖能、移動能、細胞周期を正に制御した。さらに、EVI1 による増殖制御機構にも miRNA-96 は対応して関与した。公用の microarray データセットを用いた検討から EVI1 と KRAS の mRNA 発現は正の相関が見られ、EVI1 と KRAS の発現は古典的浸潤性膵管がん群で高いことが分かった。

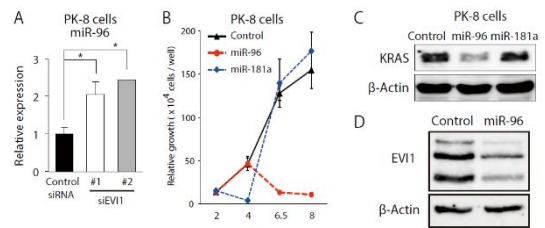


図 3: (A) PK-8 細胞における EVI1 発現抑制による miR-96 mRNA 発現上昇 (B) PK-8 細胞における miR-96 導入による細胞増殖抑制 (C-D) PK-8 細胞における miR-96 導入による KRAS と EVI1 の発現抑制

以上をまとめると、本研究を通し申請者は膵発がんにおいて、EVI1 は、がん遺伝子 KRAS とがん抑制分子 miR-96 のバランスの不均衡を惹起する重要な oncogenic factor であることを見出した。本結果は、KRAS 変異のみならず KRAS/KRAS 下流経路の活性化レベルの維持が膵がん発がん・進展に必須という報告を支持し (Ji B et al. *Gastroenterology* 137:1072-82, 2009) 変異型 KRAS への介入という治療アプローチの限界に新しい道筋を提唱する重要な成果である。

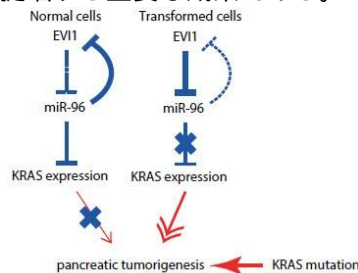


図 4: 膵がんにおける EVI1-miR-96-KRAS ネットワーク

< 引用文献 >

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8件)

Tanaka M, Ushiku T, Ikemura M, Shibahara J, Seto Y, Fukayama M. Esophageal adenocarcinoma arising in cervical inlet patch with synchronous Barrett's esophagus-related dysplasia. *Pathol Int*, 査読有, 2014;64:397-401.

Tanaka M, Suzuki HI, Shibahara J, Kunita A, Isagawa T, Yoshimi A, Kurokawa M, Miyazono K, Aburatani H, Ishikawa S, Fukayama M. EVI1 oncogene promotes KRAS pathway through suppression of microRNA-96 in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene*, 査読有, 2014;33:2454-63.

Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*, 査読有, 2014;46:1267-73.

Harada N, Ishizawa T, Inoue Y, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Tanaka M, Fukayama M, Kokudo N. Acoustic radiation force impulse imaging of the pancreas for estimation of pathologic fibrosis and risk of postoperative pancreatic fistula. *J Am Coll Surg*, 査読有, 2014;219:887-94.e5.

Sasaki T, Isayama H, Aoki T, Tanaka M, Hamada T, Nakai Y, Sakamoto Y, Hasegawa K, Morikawa T, Fukayama M, Kokudo N, Koike K. A R0 resection case of initially unresectable metastatic pancreatic cancer downstaged by FOLFIRINOX therapy. *Pancreas*, 査読有, 2014 Aug;43(6):972-4.

Nakai Y, Isayama H, Chang KJ, Yamamoto N, Hamada T, Uchino R, Mizuno S, Miyabayashi K, Yamamoto

K, Kawakubo K, Kogure H, Sasaki T, Hirano K, Tanaka M, Tada M, Fukayama M, Koike K. Slow pull versus suction in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of pancreatic solid masses. *Dig Dis Sci*, 査読有, 2014;59:1578-85.

Ko E, Natsuaki M, Toyofuku M, Morimoto T, Matsumura Y, Oi M, Motohashi Y, Takahashi K, Kawase Y, Tanaka M, Kitada M, Yuzuki Y, Tamura T, Inoue K, Mitsudo K, Kimura T. Sirolimus-eluting stent implantation for ostial right coronary artery lesions: five-year outcomes from the j-Cypher registry. *Cardiovasc Interv Ther*. 2014, 査読有, 29:200-8.

Halimi SA, Maeda D, Shinozaki-Ushiku A, Koso T, Matsusaka K, Tanaka M, Arimoto T, Oda K, Kawana K, Yano T, Fujii T, Fukayama M. Claudin-18 overexpression in intestinal-type mucinous borderline tumour of the ovary. *Histopathology*, 査読有, 2013;63:534-44.

〔学会発表〕(計0件)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 麻理子 (TANAKA MARIKO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50645710

(2)研究分担者

無し

()

研究者番号：

(3)連携研究者

無し

()

研究者番号：

(4)研究協力者

深山正久
石川俊平
砂河孝行
鈴木洋