

令和元年6月18日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09395

研究課題名（和文）Notch/Hes1シグナルをターゲットとした膵癌の新規治療開発

研究課題名（英文）Development of novel therapy for pancreatic cancer targeting Notch/Hes1 signaling

研究代表者

児玉 裕三（Kodama, Yuzo）

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80378687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌はKRAS遺伝子変異などの遺伝子異常の蓄積により、ADMやPanINと呼ばれる前癌病変を経て浸潤癌へと進行する。本研究では、Notch/Hes1シグナルに着目し、膵癌の病態解明と新規治療の開発を目指した。ヒト膵癌組織および細胞株を用いた検討では、変異KRAS遺伝子の活性化がHes1を誘導した。マウスモデルを用いた検討では、Hes1遺伝子をノックアウトにより膵癌の形成がほぼ完全に抑制された。さらに、新規のHes1阻害剤はヒト膵癌細胞株の増殖を抑制した。これらの検討により、Hes1が膵癌の形成に必須の役割を果たしており、新しい治療標的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

膵癌はその5年生存率が10%に満たない難治癌であり、その病態の解明と新規治療開発が急務となっている。膵癌症例の95%はKRAS遺伝子の変異を有し、病態の中心を担っていることが示唆されてきた。本研究では、膵癌に発現が認められるHes1に着目し、その機能解析を行った。その結果、変異KRAS遺伝子の活性化による膵癌の形成には、変異KRASの活性化により誘導されるHes1が必須であることが明らかとなった。また、膵癌細胞にHes1阻害を投与したところ、その増殖が抑制されたことから、Hes1が膵癌の新しい治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer develops from precancerous lesions called ADM and PanIN by accumulation of genetic abnormalities including KRAS gene mutation. In this study, we focused on Notch/Hes1 signaling and aimed to elucidate the pathogenesis of pancreatic cancer and to develop new treatment options. Analysis using human pancreatic cancer specimens and cell lines showed that activation of mutant KRAS gene induced Hes1. Mouse model demonstrated that the formation of pancreatic cancer was almost completely suppressed by knocking out the Hes1 gene. Furthermore, the novel Hes1 inhibitor significantly suppressed the growth of human pancreatic cancer cell lines. These findings suggest that Hes1 plays an essential role in the formation of pancreatic cancer and could be a new therapeutic target.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 Hes1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 膵癌について

膵癌は増加傾向にあるが、その5年生存率は未だ10%に満たない最難治癌の一つである。膵癌は多数の遺伝子異常の蓄積により、化生性変化(acinar-to-ductal metaplasia; ADM)、前癌病変(pancreatic intraepithelial neoplasia; PanIN)を経て、多段階に浸潤癌へと進展する。なかでもKRAS遺伝子変異は、ADMやPanINなど早期の段階から高頻度に認められ、膵癌形成において中心的な役割を担うと考えられている。

#### (2) Notchシグナルと悪性腫瘍の関連について

Notchシグナルは、種々の組織の発生段階において、幹細胞の維持や細胞運命の決定に必須の役割を果たしている。膵臓においても、Notch/Hes1シグナルは、胎生幹細胞の維持、外分泌系・内分泌系の分化制御に必須の役割を担っている。一方最近では、種々の悪性腫瘍の形成においても、Notchシグナルが重要な役割を果たしていることが示され(Ntziachristos. Cancer cell 2014)、新たな治療ターゲットとして注目されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、膵前癌病変～膵癌においてNotch/Hes1シグナルが活性化していることに着目し、膵癌の形成過程におけるNotch/Hes1シグナルの機能を明らかにすること、さらにはNotch/Hes1シグナルをターゲットとした膵癌の新規治療の開発を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、ヒト膵癌切除標本の解析に加え、ヒト膵癌細胞株を用いた*in vitro*の検討やマウスXenograftモデルを用いた検討、さらには申請者らが既に構築しているCre/loxPシステムを用いた膵癌モデルマウスを応用し、以下の点について明らかにすることを目指す。

#### (1) ヒト膵癌におけるNotch/Hes1シグナルの役割

ヒト膵癌切除標本を用い、正常膵上皮細胞・ADM・PanIN・浸潤癌におけるNotchシグナルの構成因子の発現について、その臨床像とともに検討する。さらに各種の膵癌細胞株を用い、ヒト膵癌におけるNotch/Hes1シグナルの活性化メカニズムを明らかにする。

#### (2) マウス膵癌モデルにおけるNotch/Hes1シグナルの役割

膵特異的な変異Kras遺伝子・変異TP53遺伝子の導入によるマウス膵癌の形成にHes1遺伝子のノックアウトが与える影響を、*in vivo/in vitro*の検討により明らかにする。

#### (3) Hes1をターゲットとした新規膵癌治療法の可能性

ヒト膵癌細胞株を用い、新規Hes1阻害薬が増殖能・浸潤能・遊走能に与える影響について検討する。さらに、ヒト膵癌細胞株によるマウスXenograftモデル、あるいは遺伝子改変マウス膵癌モデルに新規Hes1阻害薬の投与を行い、Hes1をターゲットにした新規膵癌治療法の可能性を探索する。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト膵癌におけるNotch/Hes1シグナルの役割

ヒト膵癌切除標本を用い、正常膵上皮細胞・ADM・PanIN・浸潤癌におけるNotchシグナルの下流分子Hes1の発現について、免疫染色により検討を行なった。Hes1は正常膵の導管細胞に発現を認めたが、腺房細胞には発現を認めなかった。一方、ADM・PanINおよび浸潤癌には強い発現が確認された。また、TCGAデータベースを用いた解析では、Hes1の発現の強い膵癌は予後不良であるとの結果が得られた。さらにHes1の発現分布は、KRASの活性化を示すリン酸化ERKの発現分布と類似しており、変異KRAS遺伝子の活性化がHes1

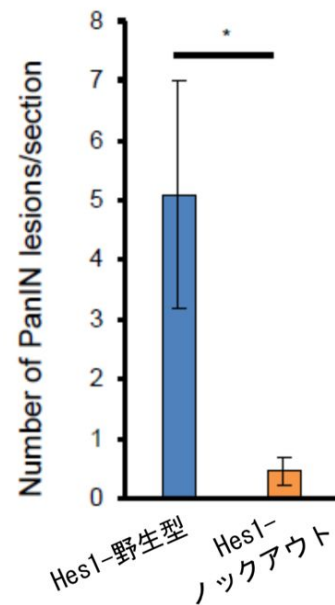
の発現に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

そこで、ヒト膵癌細胞株を用い、KRAS の活性化と Hes1 の発現について検討を行なった。その結果、EGF の処置により ERK のリン酸化および Hes1 遺伝子の発現誘導が確認された。さらに変異 KRAS 遺伝子の導入すると、ERK のリン酸化と Hes1 遺伝子発現誘導が遷延することが確認された。また、これらの Hes1 誘導は Mek 阻害剤により抑制されるが、Notch シグナル阻害剤では抑制されないことが観察された。

これらの結果から、膵癌形成において、変異 KRAS 遺伝子の活性化が Hes1 を誘導する可能性が示唆された。

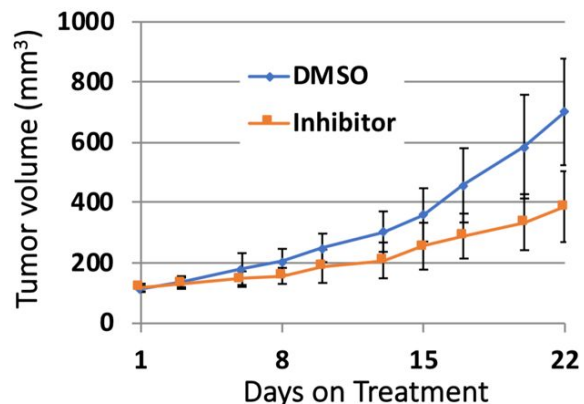
## (2) マウス膵癌モデルにおける Notch/Hes1 シグナルの役割

膵特異的な変異 *Kras* 遺伝子の導入によるマウス前癌病変形成モデルに、*Hes1 flox* マウスを交配することにより、*Hes1* 遺伝子のノックアウトが ADM/PanIN の形成に与える影響を評価した。その結果、*Hes1* 遺伝子のノックアウトにより変異 *Kras* 遺伝子による PanIN の形成はほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。次に、ADM・PanIN 形成のどのステップを抑制するかについて詳細に検討を行なった。セルレインを変異 *Kras* 遺伝子を導入したマウスに投与すると、膵炎の惹起により ADM の形成を経て、PanIN の形成が大きく促進されることが知られている。このモデルを用い *Hes1* 遺伝子のノックアウトの効果について検討したところ、*Hes1* 遺伝子のノックアウトは ADM の形成には影響を与えないが、PanIN への進行を抑制することが明らかとなった（右図）。さらに同モデルにおいて lineage tracing 法を用いた検討を行なったところ、膵炎の誘導により形成された ADM は、*Hes1* 遺伝子のノックアウトにより、変異 *Kras* 遺伝子の存在下にも関わらず、腺房細胞へ再分化することにより PanIN への進行が抑制されていることが明らかとなった。最後に、膵特異的な変異 *Kras* 遺伝子および変異 *p53* 遺伝子の導入によるマウス膵癌モデルに、*Hes1 flox* マウスを交配することにより、*Hes1* 遺伝子のノックアウトが膵癌の形成に与える影響を評価した。その結果、*Hes1* 遺伝子のノックアウトにより膵癌の形成がほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。



## (3) Hes1 をターゲットとした新規膵癌治療法の可能性

上記の結果より、Hes1 を標的とした膵癌治療の可能性について期待が持たれた。実際に、*Hes1* 遺伝子のノックアウトは正常成体膵の恒常性の維持には影響を及ぼさないため、膵癌のみを標的とした治療になり得るものと考えられた。そこで、Hes1 阻害効果を持つ新規の低分子化合物が、ヒト膵癌細胞株の増殖に与える影響について *in vitro* の検討を行なった。その結果、Hes1 の阻害はヒト膵癌細胞株の増殖を有意に抑制するとの結果が得られた。また、ヒト膵癌細胞株を用いた異種移植モデルを用い、同新規 Hes1 阻害剤の効果について検討を多なしたところ、*in vivo* においても膵癌の増殖抑制効果が確認された（右図）。以上の結果より、Hes1 をターゲットとした新規膵癌治療法が有用である可能性が示唆された。



## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 2 件)

Nishikawa Y, Kodama Y, Shiokawa M, Matsumori T, Marui S, Kuriyama K, Kuwada T, Sogabe Y, Kakiuchi N, Tomono T, Mima A, Morita T, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Uza N, Uesugi M, Kageyama R, Chiba T, Seno H. Hes1 plays an essential role in Kras-driven pancreatic tumorigenesis. *Oncogene*. 2019;38:4283-4296.

Perron A, Nishikawa Y, Iwata J, Shimojo H, Takaya J, Kobayashi K, Imayoshi I, Mbenza NM, Takenoya M, Kageyama R, Kodama Y, Uesugi M. Small-molecule screening yields a compound that inhibits the cancer-associated transcription factor Hes1 via the PHB2 chaperone. *J Biol Chem*. 2018;293:8285-8294.

### [学会発表](計 4 件)

Nishikawa Y, Kodama Y, Okada H, Kuwada T, Marui S, Morita T, Matsumori T, Tomono T, Yamauchi Y, Shiokawa M, Uza N, Seno H. HES1 PLAYS AN ESSENTIAL ROLE IN THE INITIATION OF PANCREATIC CANCER FORMATION BY REGULATING ACINAR-DUCTAL REPROGRAMMING. Digestive Disease Week USA 2018年6月

西川義浩、児玉裕三、山内 雄揮、津田 喬之、妹尾浩 膵癌形成における Hes1 の機能解析 第76回日本癌学会総会 横浜 2017年9月

西川義浩、児玉裕三、栗田威、丸井彩子、曾我部裕子、森田敏広、垣内伸之、美馬淳志、松森友昭、友野輝子、上田樹、津田喬之、山内雄揮、佐久間洋二郎、栗山勝利、丸野貴久、塩川雅広、宇座徳光、妹尾浩 Hes1 KO は膵癌マウスモデルにおいて膵発癌を抑制する 第48回日本膵臓病学会大会 京都 2017年7月

西川義浩、児玉裕三、千葉勉、妹尾浩 膵癌形成における Hes1 の機能解析 第75回日本癌学会総会 横浜 2016年10月

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。