

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15528

研究課題名（和文）発生部位による遺伝子変異の違いに着目した胆道癌発癌メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the carcinogenic mechanisms of bile duct cancer focusing on genetic mutations based on the site of occurrence.

研究代表者

西川 義浩（Nishikawa, Yoshihiro）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：80802785

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）：胆嚢腫瘍形成におけるELF3の役割の詳細を、ヒト検体・パブリックデータ、マウスモデル、オルガノイドなどを用いて解明を図った。ELF3は腫瘍抑制性の働きを行っていることが明らかとなり、それはREGおよびその下流のAKT/PI3K/mTORC1の制御によるものと考えられた。ELF3の欠損は最終的にEMTの亢進につながり、腫瘍形成が促進された。ELF3が欠損するとAKT/PI3K/mTORC1経路への依存性が高まるため、mTORC1の阻害により腫瘍が抑制されることより、ELF3変異胆嚢癌の治療標的となる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道癌は予後不良な難治癌の一つであり、予後改善・新規治療薬の開発には、その病態解明が必須である。ELF3は胆嚢癌において21%に変異を認めるという報告があり、がん抑制性の役割を担っていると考えられていたものの、詳細は不明であった。本研究でその病態形成の詳細を明らかにすることが出来た。実際の新規治療法開発には更なる検討が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to elucidate the role of ELF3 in gallbladder tumorigenesis using human samples, public data, mouse models, and organoids. It was revealed that ELF3 functions as a tumor suppressor, likely through the regulation of REG and its downstream AKT/PI3K/mTORC1 pathway. Loss of ELF3 ultimately led to enhanced EMT, promoting tumor formation. Since the loss of ELF3 increases dependence on the AKT/PI3K/mTORC1 pathway, the inhibition of mTORC1 suppressed tumors, suggesting that mTORC1 could be a potential therapeutic target for ELF3-mutant gallbladder cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：胆嚢癌 胆道癌 ELF3

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は5年生存率が20%程度と低く、膵癌に次いで予後不良な癌腫である。そのため、その予後改善のために、病態解明・新規治療法の開発が求められている。胆道癌は発癌部位によって大きく、肝内胆管癌、肝外胆管癌、胆嚢癌の3つに分類される。これらの癌は胆道癌と一括りにされるものの、治療反応性、予後などが異なることが知られている。特に胆嚢癌は発見時には進行癌であることが多く、胆道癌の中でも特に予後不良である。また、近年広く行われるようになっている次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析により、胆道癌の発生部位により遺伝子異常プロファイルに違いがあることが分かっている(Nakamura H et al. Nat Genet. 2015)。そのような違いが臨床像の違いにつながっていると考えられるが、どのように病態に関わっているか、そのメカニズムはまだ十分に解明されていない。また、手術不能の進行癌の場合化学療法がおこなわれるが、そのレジメンは胆道癌として標準治療が定められており、発生部位など subtype による性質の違いはレジメン選択に反映されていないのが現状である。

ELF3 (E74 Like ETS transcription Factor 3)はETSファミリーに属する転写因子の一つである。正常組織においては、細胞周期、分化、増殖、アポトーシスのコントロールなどを行っていると言われており、近年各種癌における発現の異常が報告され、注目されている(Sizemore GM et al. Nat Rev Cancer. 2017)。胆道癌に関しては、特に胆嚢癌において、ELF3 遺伝子の loss-of-function 変異が TP53 遺伝子に次いで2番目に高い頻度で認めることが近年報告され、胆道癌形成において癌抑制遺伝子として機能していることが強く示唆されている(Pandey A et al. Nat Commun. 2020)。

これらの背景より、ELF3 が、胆嚢癌形成・悪性度に関与し、その予後に影響を及ぼしている可能性が考えられた(図1)。しかしながら、胆嚢癌において ELF3 が病態形成に与える影響のメカニズムは十分に機能解析なされていない。そのため、ELF3 がどのように胆嚢癌形成に関わっているか、また胆道癌の発生部位による発癌メカニズムの違いにどのように影響しているのか、さらには、ELF3 が胆道癌の治療標的になり得るのかという問いから本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究は、予後不良な胆道癌の病態解明・予後改善を目指し、ELF3 の胆嚢癌形成における役割の解明から胆道癌の発生部位による発癌メカニズムの違いの一端を明らかにし、新規治療標的を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト組織を用いた検討

-1 ヒト胆道組織における ELF3 発現の評価

手術検体を用い、ヒトの癌でない胆道組織における ELF3 の発現を免疫組織化学染色によって評価し、非癌部位における発現分布を確認する。

-2 ヒト胆嚢癌における ELF3 発現と臨床像との比較

当院治療を受けた胆嚢癌 85 症例の組織検体を用い、ELF3 の発現と臨床像の相関を検討する。

ELF3 の胆嚢腫瘍発生・進展における役割の検討

-1 マウスモデルを用いた *in vivo* の検討

胆道に $Kras^{G12D}$ および $Trp53^{R172H}$ を導入可能な ($Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}$) を胆嚢腫瘍モデルマウスとして確立し、さらに *Elf3* コンディショナルノックアウトマウスを掛け合わせることで、ELF3 の胆嚢腫瘍発生・進展における機能を検討する。

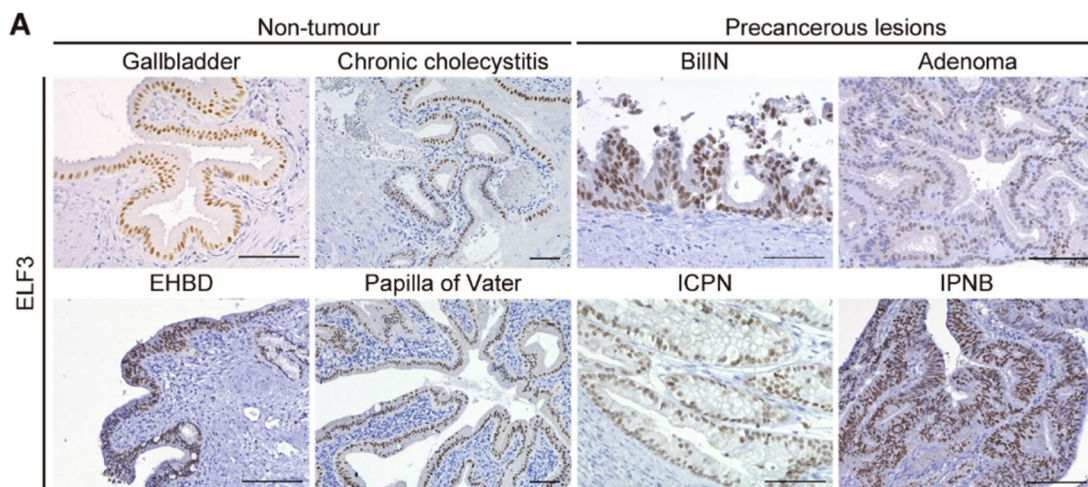
-2 ELF3 の胆嚢腫瘍における機能のメカニズムの解明

ELF3 の胆嚢腫瘍発生・進展における機能のメカニズムを、オルガノイドなどを用いて解明を図る。

4 . 研究成果

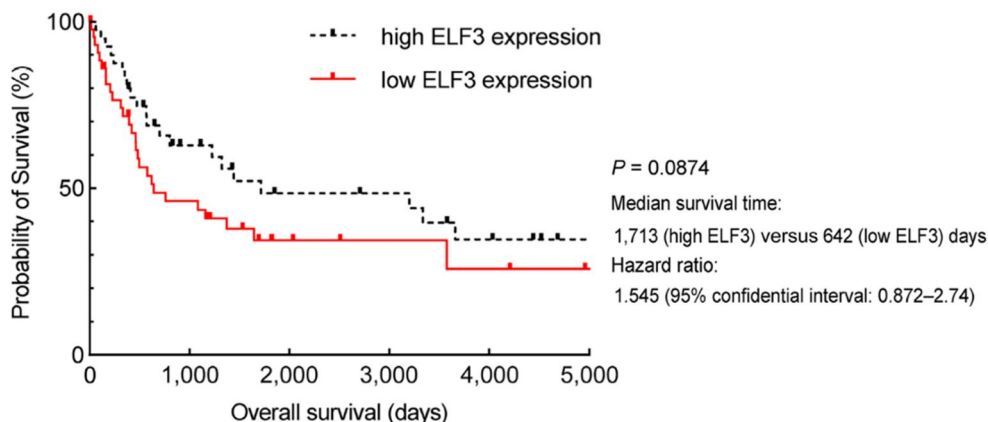
1. ELF3 はヒト非癌胆道組織で幅広く発現する

ヒト非癌胆道組織に対して免疫組織化学染色を用いた検討を行った。結果、ヒト胆道系組織において、正常組織（胆嚢・肝外胆管・乳頭部）から、炎症上皮（慢性胆嚢炎）前癌病変（BiIN、adenoma、ICPN、IPNB）に至るまで、幅広く ELF3 が発現していることが確認された（下図）。



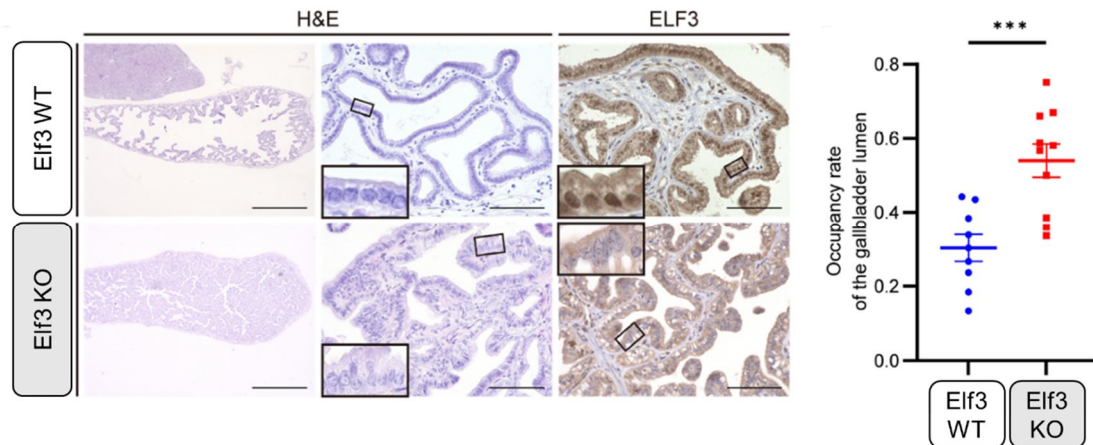
2. ELF3 低発現のヒト胆嚢癌は予後不良である

ヒト胆嚢癌における ELF3 の発現を免疫組織化学染色にて検討した。胆嚢癌は ELF3 の発現の多寡により、発現の弱い群と強い群の 2 群に分けられた。臨床像との関連を検討したところ、発現の弱い群は深達度が深く癌のステージが進行していた。また、全生存日数が短い傾向も認められた（下図）。この結果より、ELF3 が胆嚢癌において腫瘍抑制因子であることが支持された。



3. Elf3 ノックアウトにより胆嚢腫瘍の進行は促進される

胆嚢腫瘍モデルマウスと Elf3 コンディショナルノックアウトマウスを掛け合わせ、Elf3 の胆嚢腫瘍形成における役割を検討した。Elf3 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、胆嚢病変の増大を認め(下図)、マウスモデルにおいても Elf3 が腫瘍抑制的に機能していることが確認された。

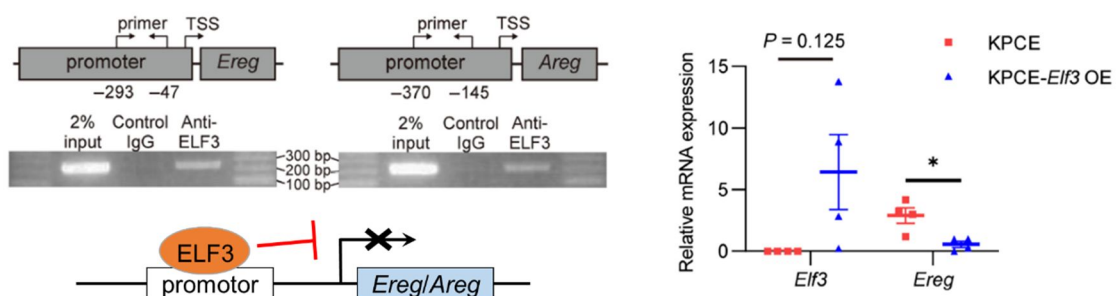


4. Elf3 は Ereg を直接制御することで ERBB シグナル経路を制御する

続いて、Elf3 が腫瘍抑制するメカニズムの解明を図った。まず、胆嚢腫瘍モデルマウスに形成された腫瘍からオルガノイドを作成し、RNA シーケンスに提出し、Elf3 のノックアウトによりどのような遺伝子・遺伝子群の発現変化が生じているのか検討した。結果、ERBB シグナルや EMT に関連する遺伝子群の発現上昇が確認された。ERBB シグナルの中でも ERBB リガンドである Ereg の発現が最も大きく変動していることが確認されたため、中心となっている可能性が考えられた。

Elf3 は転写因子であるため、Elf3 が Ereg の発現を直接制御している可能性を検証するため、ChIP assay を行った。結果、ELF3 が Ereg のプロモーターに結合していることが確認された(下図、左)。また Elf3 のノックアウトオルガノイドに Elf3 を再導入したところ、Ereg の発現が低下することも確認した(下図、右)。すなわち、Elf3 が Ereg の発現を直接制御し、ERBB シグナル経路を制御していると考えられた。

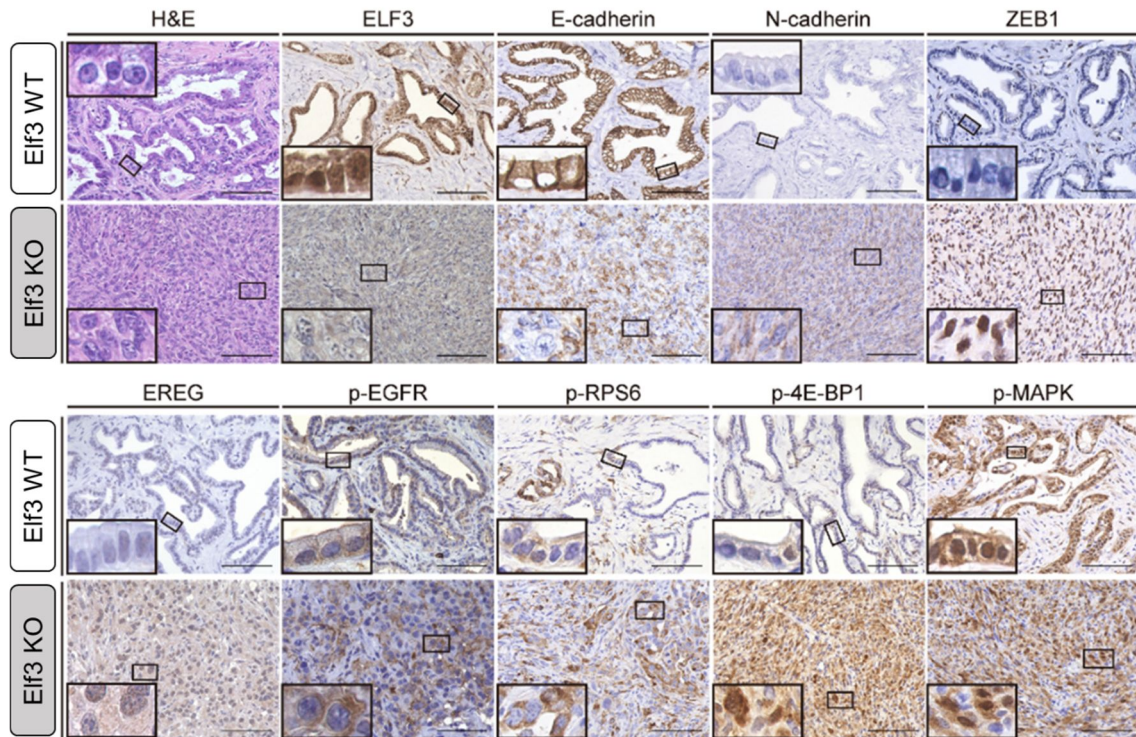
ChIP assay



5. Elf3 は PI3K/AKT/mTORC1 を介して EMT を制御し、悪性度に関与する

Elf3 および下流因子と胆嚢腫瘍のフェノタイプの詳細な関連性の検討をさらに行った。Elf3 ノックアウト胆嚢腫瘍オルガノイドを再度マウスに移植したところ、野生型と比較して低分化な腫瘍が形成された。免疫組織化学染色、Western blotting による評価を行ったところ、Elf3 ノックアウト腫瘍は EMT が亢進していること、また PI3K/AKT/mTORC1 経路が亢進していることが判明した(下図)。そのため、Elf3 が欠損すると PI3K/AKT/mTORC1 が活性化し、EMT が亢進し、その結果腫瘍の悪性度が増悪することが示唆された。そのため、Elf3

ノックアウト胆嚢腫瘍オルガノイドに対して、更に *Ereg* ノックアウトを行ったところ、PI3K/AKT/mTORC1・EMT の抑制と共に、分化度の低下が抑制された。



これまでの結果をまとめると、Eif3 は Ereg を直接抑制することで下流の PI3K/AKT/mTORC1 経路・EMT を抑制し、胆嚢腫瘍の形成を抑制していることが明らかとなった。ELF3 変異を伴う胆嚢癌では、mTORC1 阻害が有効な治療薬となる可能性があると考えられた。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Takeharu, Nishikawa Yoshihiro, Shiokawa Masahiro, Takeda Haruhiko, Yokode Masataka, Matsumoto Shimpei, Muramoto Yuya, Ota Sakiko, Yoshida Hiroyuki, Okada Hirokazu, Kuwada Takeshi, Marui Saiko, Matsumori Tomoaki, Maruno Takahisa, Uza Norimitsu, Kodama Yuzo, Hatano Etsuro, Seno Hiroshi	4. 巻 261
2. 論文標題 ELF3 suppresses gallbladder cancer development through downregulation of the EREG/EGFR/mTOR complex 1 signalling pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 28 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.6144	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村 武晴, 西川 義浩, 塩川 雅広, 宇座 徳光, 妹尾 浩
2. 発表標題 ELF3はERBB/MTORC1 signaling cascadeを制御することで胆嚢癌の進展を抑制する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 NAKAMURA T, NISHIKAWA Y, SHIOKAWA M, UZA N, SENO H.
2. 発表標題 ELF3 SUPPRESSES GALLBLADDER CANCER DEVELOPMENT THROUGH DOWNREGURATION OF EREG/EGFR/MTOR COMPLEX 1 SIGNALING PATHWAY
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2023 (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
---------	---------