

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461022

研究課題名(和文) 成体膵の恒常性の維持および膵癌形成におけるNotch/Hes1シグナルの機能解析

研究課題名(英文) The role of Notch/Hes1 signaling in the maintenance of homeostasis and carcinogenesis in pancreas

研究代表者

児玉 裕三 (Kodama, Yuzo)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80378687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は最難治癌である。我々は、膵発生において重要なNotch/Hes1に着目し、成体膵の恒常性維持、および腫瘍形成における機能解析を行なった。その結果、(1) Hes1はPtf1a陽性細胞の分化運命制御に関与しない、(2) Hes1は生後の膵外分泌組織の形成に必須である、(3) Hes1は成体膵の恒常性の維持に必須ではない、(4) Hes1は膵前癌病変の形成に必須である、(5) Hes1は膵癌の形成に必須である、(6) Hes1阻害により膵癌の増殖は抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、Hes1をターゲットした新規膵癌治療法の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is one of the most intractable cancers. It has been revealed that pancreatic cancer is derived from precancerous lesions by accumulation of multiple genetic abnormalities. Here, we focused on the Notch/Hes1 signaling in the maintenance of homeostasis and carcinogenesis in pancreas. As a result, we found that (1) Hes1 does not affect the cell fate of Ptf1a-positive cells, (2) Hes1 is indispensable for the development of pancreatic exocrine tissues after birth, (3) Hes1 is not essential for the maintenance of adult pancreatic homeostasis, (4) Hes1 is essential for the development of pancreatic precancerous lesions, (5) Hes1 is essential for the development of pancreatic cancer, and (6) the growth activities of pancreatic cancer cells were significantly diminished by a treatment of Hes1 inhibitor. These results suggest the possibility of a new therapeutic strategy against pancreatic cancer that targets Hes1.

研究分野：消化器病学

キーワード：膵癌 Notchシグナル Hes1

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌は極めて予後不良の最難治癌である。膵癌は正常の膵臓上皮に、*KRAS*、*TP53* など複数の遺伝子異常が蓄積し、Pancreatic Intraepithelial Neoplasm (PanIN) などの前癌病変を経て、段階的に浸潤癌へと進展することが明らかとなってきた。

(2) 癌組織には自己複製能と多分化能をもつ癌幹細胞が存在し、癌の浸潤や転移、化学療法への抵抗性に関与していることが指摘されている。極めて生物学的な悪性度が高い膵癌において、癌幹細胞システムの分子機構の解明が新規治療の開発に向けて重要な課題となっている。

(3) 癌幹細胞は正常組織幹細胞と共通の分子機構によって維持されると考えられている。Notch シグナルは、種々の組織において幹細胞の維持に必須の役割を果たすとともに、各種の癌幹細胞への関与が示唆されている。胎生膵では、Notch/Hes1 シグナルが幹細胞の維持、および外分泌系・内分泌系の分化制御に必須の役割を担っている。一方、成体膵においては、成体の組織幹細胞と考えられている腺房中心細胞、さらには膵癌前癌病変 (PanIN) や浸潤癌においても *Hes1* の発現が報告され、その重要性が示唆されている。

(4) 以上のように、Notch/Hes1 シグナルは膵発生過程のみならず、成体膵組織幹細胞と考えられる腺房中心細胞の分化制御や、膵癌前癌病変の形成、さらには膵癌の癌幹細胞の維持への関与が強く示唆される。しかしながら、*Hes1* ノックアウトマウスは胎生致死であり、これまでは *Hes1* の成体における組織幹細胞維持機構や、癌幹細胞維持機構の解析は不可能であった。

2. 研究の目的

本研究では、膵の発生過程において幹細胞の維持に必須の役割を果たす Notch シグナルの下流分子 *Hes1* に着目し、成体膵の形成および組織維持、②膵前癌病変～膵癌の形成における Notch/Hes1 シグナルの役割について解析を行う。そしてさらに、Notch/Hes1 をターゲットとした膵癌の新規治療の開発に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 成体膵の形成および組織維持における Notch/Hes1 シグナルの機能解析

Hes1 ノックアウトマウスは胎生致死であるため、これまで成体における *Hes1* の機能解析は不可能であった。本研究では、膵特異的プロモーター *Ptf1a* 下に Cre recombinase を発現する *Ptf1a-Cre* マウスと *Hes1 flox* マウスとの交配を行う。これにより、膵細胞特異的に *Hes1* 遺伝子のノックアウトが誘導され、出生後の膵形成における *Hes1* の機

能解析が可能となる。また、膵特異的プロモーター *Elastase1 (Ela1)* 下にタモキシフェン誘導型 Cre を発現する *Ela1-CreERT2* マウスと *Hes1 flox* マウスとの交配を行う。これにより、成体マウスにおいて膵細胞特異的に *Hes1* 遺伝子のノックアウトを誘導し、成体膵の組織維持における *Hes1* の機能解析を行なう。

(2) 膵前癌病変～膵癌の形成における Notch/Hes1 シグナルの機能解析

Ela1-CreERT2 マウスと、Cre 誘導性に恒常活性化型変異 *Kras* 遺伝子を発現する *LSL-KRas^{G12D}* マウスとの交配 (*Ela1-CreERT2;Kras^{G12D}*) により、前癌病変 mPanIN が生じる。また、同マウスにさらに変異 *TP53* 遺伝子を発現する *TP53^{R172H}* マウスを交配することにより (*Ela1-CreERT2;Kras^{G12D};TP53^{R172H}*) マウス膵癌が形成される。これらのマウスに *Hes1 flox* マウスを交配することにより、マウス膵前癌病変～膵癌の形成における *Hes1* の機能解析を行なう。

(3) Notch/Hes1 をターゲットとした膵癌の新規治療開発

各種のヒト膵癌細胞株を用いた *in vitro* 培養系、あるいは免疫不全マウスを用いたヒト膵癌 Xenograft モデル系を用い、ヒト膵癌細胞株の増殖能・浸潤能・遊走能などに対する *Hes1* 阻害の効果について評価する。

4. 研究成果

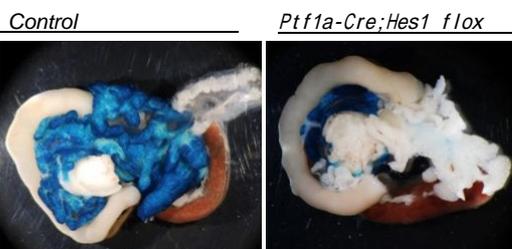
(1) *Hes1* は *Ptf1a* 陽性細胞の分化運命制御に関与しない

Hes1 ノックアウトマウスの解析より、*Hes1* は胎生期の膵組織幹細胞の維持、および外分泌 / 内分泌細胞への分化制御に必須の役割を果たしていることが報告されている。今回、*Ptf1a-Cre;Hes1 flox* マウスを解析することにより、膵前駆細胞として知られている *Ptf1a* 陽性細胞における *Hes1* の機能を解析した。その結果、出生時の *Ptf1a-Cre;Hes1 flox* マウスにおける膵臓のサイズおよび重量はコントロールマウスと同等であった。また、アミラーゼ・サイトケラチン・インスリン・グルカゴンなどの免疫組織化学染色による膵外分泌 / 内分泌細胞分化の評価においてもコントロールマウスと同等であった。すなわち、*Hes1* は *Ptf1a* 陽性細胞の分化運命制御には関与しないことが明らかとなり、外分泌 / 内分泌細胞への分化運命は、*Ptf1a* 陽性細胞以前の前駆細胞において既に決定されていることが明らかとなった。

(2) *Hes1* は生後の膵外分泌組織の形成に必須である

Hes1 ノックアウトマウスは胎生致死であるため、これまで成体における *Hes1* の機能解析は不可能であった。今回、

Ptf1a-Cre;Hes1 flox マウスの解析により生後の膵形成における *Hes1* の機能解析を行なった。その結果、上記のように出生時には膵外分泌 / 内分泌細胞分化に障害は認められなかった。しかし、*Ptf1a-Cre;Hes1 flox* マウスの外分泌組織は、成長とともに特に背側膵において腺房細胞の萎縮と脱落を認め、生後 2-4 週ではほぼ全て脂肪組織に置換されていた (下図)。一方、インスリン・グルカゴンなどの免疫組織化学染色により、内分泌組織の形成を評価したところ、明らかな異常は認められなかった。この理由として、コントロールマウスでは膵外分泌組織の組織幹細胞として知られている腺房中心細胞 (*Hes1* 陽性) が存在するのにに対し、*Ptf1a-Cre;Hes1 flox* マウスでは、出生児の時点で腺房中心細胞が脱落していることが観察された。すなわち、生後に正常に膵外分泌組織が形成されるためには、*Hes1* 陽性の腺房中心細胞が必須である可能性が示唆された。



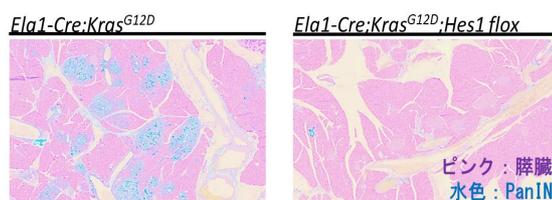
(3) *Hes1* は成体膵の恒常性の維持に必須ではない

膵腺房細胞特異的プロモーター *Elastase1 (Ela1)* 下にタモキシフェン誘導型 Cre を発現する *Ela1-CreERT2* マウスと *Hes1 flox* マウスとの交配を行い、*Ela1-CreERT2;Hes1 flox* マウスの解析を作成した。同マウスに 4 週齢あるいは 8 週齢においてタモキシフェンを投与し、成体マウスにおいて膵腺房細胞特異的に *Hes1* 遺伝子のノックアウトを誘導し、成体膵の組織維持における *Hes1* の機能解析を行なった。その結果、4 週齢および 8 週齢ともに *Hes1* 遺伝子ノックアウトの影響は認められず、ある程度成熟した膵腺房細胞の維持には *Hes1* が必須ではないことが明らかとなった。さらに、これらのマウスにセルレイン投与による膵炎を誘導し、組織障害の感受性や組織再生の程度について評価を行った。その結果、*Ela1-CreERT2;Hes1 flox* マウスの膵炎感受性、および組織再生能はコントロールマウスと比較して同等レベルであった。

(4) *Hes1* は膵前癌病変の形成に必須である

膵前癌病変 mPanIN を形成するモデル *Ela1-CreERT2;Kras^{G12D}* マウスに *Hes1 flox* マウスを交配することにより、*Ela1-CreERT2;Kras^{G12D};Hes1 flox* マウスを作成し、mPanIN 形成における *Hes1* の役割について解析を行なった。その結果、

Ela1-CreERT2;Kras^{G12D} マウスでは広汎に mPanIN の形成が認められた。また、これらの mPanIN における *Hes1* の発現を免疫組織化学染色により評価を行ったところ、強い発現が確認された。一方、*Ela1-CreERT2;Kras^{G12D};Hes1 flox* マウスでは、*Hes1* 遺伝子のノックアウトにより mPanIN の形成がほぼ完全に阻害されていることが明らかとなった (下図)。すなわち、マウス膵癌の前癌病変の形成において *Hes1* が必須であることが明らかとなった。



(5) *Hes1* は膵癌の形成に必須である

膵癌を形成するマウスモデルである *Ela1-CreERT2;Kras^{G12D};TP53^{R172H}* マウスに *Hes1 flox* マウスを交配することにより、*Ela1-CreERT2;Kras^{G12D};TP53^{R172H};Hes1 flox* マウスを作成し、マウス膵癌形成における *Hes1* の役割について解析を行なった。その結果、*Ela1-CreERT2;Kras^{G12D};TP53^{R172H}* マウスに膵炎刺激を加えることにより、高率に膵癌の形成が観察された。また、これらのマウス膵癌における *Hes1* の発現を免疫組織化学染色により評価を行ったところ、強い発現が確認された。一方、*Ela1-CreERT2;Kras^{G12D};TP53^{R172H};Hes1 flox* マウスでは、前癌病変の結果と同様に、*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阻害されていることが明らかとなった。すなわち、マウス膵前癌病変のみならず、膵癌の形成においても *Hes1* が必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

(6) *Hes1* 阻害により膵癌の増殖は抑制される

Hes1 を阻害する化合物 (京都大学物質細胞統合システム拠点・化学研究所との共同研究) が、各種のヒト膵癌細胞株に与える影響について検討した。まず、MIA PaCa-2 細胞および PANC-1 細胞を用い、*in vitro* において MTT 増殖 assay・invasion assay・wound healing assay・アポトーシス assay による評価を行った。その結果、低容量の *Hes1* 阻害剤は、膵癌細胞の増殖・浸潤・遊走を抑制し、高用量ではアポトーシスを誘導することが明らかとなった。つぎに、免疫不全マウスにこれらのヒト膵癌細胞株を皮下移植した Xenograft モデルを確立し、*Hes1* 阻害剤の投与を行なった。その結果、*in vivo* においても *Hes1* 阻害剤による膵癌の増殖抑制効果が観察された。膵癌症例において最も多く用いられている抗癌剤であるゲムシタピンも、本 Xenograft モデルにおいて腫瘍抑制効果を示

した。興味深いことに、Hes1 阻害剤による膵癌の増殖抑制はゲムシタピンによる増殖抑制とは独立した効果であり、両者を併用することにより相加的な腫瘍抑制効果が得られた。

このように、膵発生において重要な Notch/Hes1 シグナルに着目し、生体膵の恒常性の維持、および腫瘍形成における機能解析を行った結果、(1) Hes1 は Ptf1a 陽性細胞の分化運命制御に関与しない、(2) Hes1 は生後の膵外分泌組織の形成に必須である、(3) Hes1 は成体膵の恒常性の維持に必須ではない、(4) Hes1 は膵前癌病変の形成に必須である、(5) Hes1 は膵癌の形成に必須である、(6) Hes1 阻害により膵癌の増殖は抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、Hes1 をターゲットとした治療が、正常細胞には悪影響を及ぼさず、腫瘍のみを標的とした新規膵癌治療法となる可能性を示唆するものである。

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 2 件)

Sawai Y, Kodama Y, Shimizu T, Ota Y, Maruno T, Eso Y, Kurita A, Shiokawa M, Tsuji Y, Uza N, Matsumoto Y, Masui T, Uemoto S, Marusawa H, Chiba T. Activation-Induced Cytidine Deaminase Contributes to Pancreatic Tumorigenesis by Inducing Tumor-Related Gene Mutations. *Cancer Res.* 2015;195:3033-3044. 査読有

Kurita A, Kodama Y, Nakamoto Y, Isoda H, Minamiguchi S, Yoshimura K, Kuriyama K, Sawai Y, Uza N, Hatano E, Uemoto S, Togashi K, Haga H, Chiba T. Impact of EUS-FNA for preoperative para-aortic lymph node staging in patients with pancreatobiliary cancer. *Gastrointes Endosc.* 2016. in press. 査読有

[学会発表](計 1 件)

Kuriyama K, Kodama Y, Shiokawa M, Kakiuchi N, Matsumori T, Mima A, Tomono T, Nishikawa Y, Tsuda M, Ueda T, Yamauchi Y, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Uza N, Seno H, Chiba T. Biphasic role of Hes1 in pancreatic development. *Digestive Disease Week* 2016. San Diego.

6. 研究組織

(1)研究代表者

児玉 裕三 (KODAMA, Yuzo)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：80378687