

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	河端 秀賢
<p>学位論文題目</p> <p>Mutant <i>GNAS</i> limits tumor aggressiveness in established pancreatic cancer via antagonizing the KRAS-pathway (GNAS変異はKRAS経路に拮抗することにより、膵癌の悪性度を抑える)</p> <p>共著者名</p> <p>Yusuke Ono, Nobue Tamamura, Kyohei Oyama, Jun Ueda, Hiroki Sato, Kenji Takahashi, Kenzui Taniue, Tetsuhiro Okada, Syugo Fujibayashi, Akihiro Hayashi, Takuma Goto, Katsuro Enomoto, Hiroaki Konishi, Mikihiro Fujiya, Keita Miyakawa, Mishie Tanino, Yuji Nishikawa, Daisuke Koga, Tsuyoshi Watanabe, Chiho Maeda, Hidenori Karasaki, Andrew S. Liss, Yusuke Mizukami & Toshikatsu Okumura</p> <p>Journal of Gastroenterology; 2022 Jan 11 (Epub) doi:10.1007/s00535-021-01846-4</p> <p>研究目的</p> <p>膵癌は5年生存率が10%以下と低く、難治癌の代表である。膵発癌の過程では、KRAS変異を伴い前駆病変が発生し、TP53やSMAD4などの癌抑制遺伝子の不活化を経て、浸潤癌へと進展する。また、膵癌の前駆病変として、膵上皮内腫瘍性病変(以下、PanIN)と膵管内乳頭粘液性腫瘍(以下、IPMN)が注目されている(1)。PanINは顕微鏡レベルで観察される病変であり、肉眼的に捉えることは難しい。一方でIPMNは乳頭状増殖と豊富な粘液産生を特徴とし、嚢胞状構造を呈するため超音波やMRIによる描出が容易であり、低異型病変から浸潤癌に至る病態の観察が可能である。IPMNの一部は嚢胞性病変本体が浸潤癌へと進展するが、嚢胞とは異なる部位に膵発癌(IPMN併存癌)が見られる場合もある。このような悪性ポテンシャルを有する病変の特定は、膵癌早期発見に有益と考えられ、画像診断の精度向上に加え分子マーカー等を利用した有効なサーベイランス方法の確立が望まれている。</p> <p>IPMNの初期発生において、二つのドライバー遺伝子 KRAS 及び GNAS が重要な役割を担う。GNAS 遺伝子は20番染色体長腕の複合遺伝子座(20q13.32)に局在し、GTP結合蛋白であるG蛋白刺激性αサブユニット($G\alpha_s$)をコードする。$G\alpha_s$の活性化により細胞内cAMP産生が上昇し、これによってcAMP依存性Aキナーゼ(protein kinase A; PKA)が活性化される。PKAはセリン・スレオニンキナーゼであり、cAMP response element binding (CREB)や extracellular signal-regulated kinase (ERK)などの基質をリン酸化することにより、転写調節を行う。我々の研究グループは、GNAS変異はマウスの膵腫瘍発生においてKRAS経路と協調し、癌抑制遺伝子である塩誘導性キナーゼの阻害を介して脂質代謝のリプログラミングを誘導しIPMN様の形質をもたらすことを明らかにした(2)。しかし、KRAS変異単独でも膵発癌を誘導できるのに、なぜGNAS変異が加算される必要性があるのか?過去にGNASは脳や皮膚組織において、癌抑制的に機能することも報告されている。IPMNの多くが低悪性腫瘍であることを考えると、GNAS変異はKRASシグナルと協調してIPMNの初期発生を担う一方で、その進化過程の後期では浸潤・転移能などの悪性形質獲得にブレーキをかけている可能性もある。このことは、GNAS経路を標的とする癌治療の是非にも関わる重要課題であり、ヒト細胞リソースを用いた検証が欠かせない。</p> <p>本研究では、GNAS変異がヒト膵癌の進展経路をどのように調節するかを明らかにし、GNAS変異が関与する分子経路を特定することで、膵癌に対する個別化治療に役立つ新規情報を得ることを目的とする。</p>			

材 料 ・ 方 法

1) 変異型GNASを標的としたゲノム編集株の作製

IPMN関連膵癌の切除材料より樹立したGNAS R201H変異を有する患者由来細胞を用い、GNAS R201H特異的なguide RNAを組み込んだpSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0プラスミド (Addgene #62988)と野生型GNAS配列を有するドナー用一本鎖鋳型DNAをエレクトロポレーション法により導入した(3)。Puromycin耐性クローンより限界希釈法及びDigital PCRによりGNAS野生型細胞をスクリーニングし、取得した亜株をサンガー法にて確認した。またゲノム編集に伴うGNAS下流分子のリン酸化をWestern blotting法により評価した。

2) 細胞及び組織形態、増殖・浸潤能の評価

上記細胞を用いて、血清含有培地を用いたMonolayer培養、及び無血清培地（希釈した2%マトリゲル、2% BSA、1x Insulin-Transferrin-Selenium、10 μ M ROCK阻害剤を添加）を用いたMatrigel overlay法によるオルガノイド培養を行った。またNOD-SCIDマウスへの皮下移植によりXenograftを作成した。これらの形態と増殖能(Sulforhodamine B assay、CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay及び腫瘍体積量やKi-67標識率)を評価し、Scratch assay やTranswellを用いた invasion assayによる浸潤能・遊走能の評価を行った。

3) ムチン組成とその機能の評価

GNAS変異の有無によるムチンファミリー組成変化をRT-PCR法、免疫組織染色により評価した。MUC2及びMUC5Bに対してノックダウン亜株を作製し、形態・増殖・浸潤能に対する影響を評価した。

4) GNAS変異のシグナル経路の同定

上記細胞よりRNAを精製し、AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kitを用いたRNA発現解析を行った(Thermo-Fisher Scientific社製Ion GeneStudio S5 Systemを使用した)。Molecular Signature Databaseより取得した4つのGene set(hallmark, GO, KEGG, REACTOME; curated gene set, ver.7.4)を用いてGSEA解析を行った。Western blotting法及び qRT-PCR法により、KRAS関連分子の活性化及びEMT関連遺伝子の発現を調べた。変化の見られた分子については阻害剤を使用し、細胞形質を(2)で述べた方法で評価した。

成 績

GNAS変異を有するIPMN細胞(GNAS変異型細胞とする)は、ゲノム編集により得たGNAS野生型の亜株(GNAS野生型細胞とする)と比較して、PKA、CREB及び vasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP)のリン酸化の程度が強く、変異型GNASによる古典的PKA経路の活性化が確認された。Monolayer培養では、GNAS変異型細胞は細胞集塊がより強く、細胞同士の接着は野生型に比べ弱い傾向にあった。オルガノイド培養では、GNAS変異型細胞でのみ粘液貯留を反映した泡状に膨らんだ特徴的な形態がみられ、一方GNAS野生型細胞は、充実性の集塊を呈した。また、GNAS変異型細胞のXenograftが泡状の粘液貯留を伴う組織構築を呈したのに対し、GNAS野生型細胞では充実性腫瘍の像であった。Monolayer、オルガノイド培養いずれにおいても、GNAS野生型細胞の増殖速度はGNAS変異型細胞と比較して有意に速いことが明らかとなった。さらに、Xenograftにおける腫瘍体積量及びKi-67標識率からも、GNAS野生型細胞の腫瘍増殖が速いことが示唆された。

次に、オルガノイド培養したGNAS変異型及び野生型細胞から得られた遺伝子発現プロファイルを用いてGSEA解析を行った結果、GNAS野生型細胞では HALLMARK KRAS SIGNALING UP、逆にGNAS変異型細胞では HALLMARK KRAS SIGNALING DOWNセットに属する遺伝子が高発現していることを見出した。このことから、変異型GNASがHALLMARKセットにおけるKRASシグナリング群との拮抗的な関連を有することが示唆される。また、Epithelial-mesenchymal transition(EMT)に関与する転写因子群が GNAS野生型細胞において高発現していた。特に、BMP2、CALD1、CNG11の発現変動が顕著であったことから、変異型GNASはEMTを抑制する可能性が示唆された。

Western blotting により、代表的なKRAS関連経路を検証した。結果、GNAS変異型細胞において、ERKのリン酸化及び核内 β カテニンの発現がGNAS野生型細胞に比較して亢進していることを見出した。このことから、同変異がERKやWntシグナルの活性化においてKRASと相乗的に働くことが示唆された。続いて、KRAS変異に伴い発生する膵癌前駆病変の悪性化に重要であることが知られているNotchシグナルの関連を確認した。結果、GNAS野生型細胞と比較して、GNAS変異型細胞では同経路の活性化指標とされるNotch intercellular domain(NICD)

の核内発現が顕著に増加することが明らかとなった。この変化がcAMP-PKA経路に依存するか否かを確認するために、GNAS変異型へPKA阻害剤(H89, 10 μ M)を添加したところ、24時間後に核内NICD発現が顕著に増加した。また、Notchシグナル下流遺伝子(HEY family: HEY2, HEYL)の発現も、H89添加により上昇したことから変異型GNASはPKA依存的にNotch経路を抑制することが示唆された。次に、GNAS変異とムチン産生の関連を調べるため、分泌型ムチンであるMUC1、MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6のmRNA発現を確認した結果、GNAS変異型細胞は野生型細胞に比較して、有意に高発現を認めた。膵癌症例のTCGAデータセット(RNA-seq)を用いた解析においても、同様の結果が確認された。ERK阻害剤(SCH772984, 10mM)の添加によって、GNAS変異型細胞ではMUC2の発現は抑制されるが、MUC5Bの発現には影響を与えなかった。一方で、H89はMUC2、MUC5B mRNA発現の双方を抑制した。また、Notch阻害剤(SAHM1, 20mM)の添加によって、MUC5Bの発現が増加したことから、MUC2はPKA-ERK経路、MUC5BはPKA-Notch経路により制御されていると考えられた。

さらに、GNASの変異獲得が膵臓癌細胞の運動/浸潤能に及ぼす影響を解析した。Scratch assayにより評価した結果、変異型GNASの野生型へのゲノム編集により細胞遊走能の上昇が確認された。また、Invasion assayの結果よりGNAS変異型細胞は野生型細胞と比較して、浸潤能が低いことが明らかとなった。さらに、GNAS変異型細胞はPKA阻害剤の添加により浸潤能増加を認め、EMT関連遺伝子BMP2及びCALD1の発現上昇に裏付けられる細胞挙動を呈した。一方、GNAS野生型細胞にNotch阻害剤を添加すると、浸潤能低下が見られた。以上の結果より、GNASはKRASに対し、ERKやWntシグナルにおいて膵癌の悪性度に相乗効果を示すものの、Notchシグナルの抑制を介してEMTに代表されるKRAS経路の過剰な活性化にブレーキをかけていることが分かった。

最後に、GNAS変異型細胞を用いてMUC2及びMUC5Bの発現を恒常的に抑制すると、コントロール細胞及びMUC2抑制細胞ではオルガノイド培養及びXenograftにおいて粘液産生形質を認めたが、MUC5B抑制細胞では粘液産生が抑制された充実性の形態を呈した。しかし、MUC2及びMUC5Bの発現を抑制しても、Xenograftのサイズ、Ki-67標識率、細胞浸潤能のいずれにおいても変化を認めず、ムチン発現が直接的に腫瘍の増殖や浸潤能を制御する可能性は否定された。

考 案

本研究では、ヒト膵癌において、GNAS変異が2つの大きな腫瘍形質に関与することを明らかにした。すなわち、①Notch阻害を介した部分的な腫瘍浸潤能に対する抑制効果と、②MUC2のみならずMUC5B発現上昇を介した粘液産生能の亢進である。我々は、GNAS変異がKRAS経路と協調し、粘液産生能を有する膵腫瘍の発生に寄与することを過去に遺伝子改変マウスモデルで証明したが(2)、今回、ヒトIPMN細胞においてもGNAS変異がMEK-ERK及びWnt経路の活性化にわり、「Oncogene」として機能することを確認した。一方で、Notch-EMT経路に対し抑制的に働くという変異型GNASの「Tumor suppressor」としての側面を証明した。

このようなGNAS変異の膵発癌・進展過程における相反する役割は、発生初期段階では粘液産生を主体とした腫瘍促進(IPMNとしての形質付与)、後期段階での腫瘍悪性度の抑制というように、「腫瘍進化の時期」に依存する可能性がある。一般に、遺伝子変異の蓄積は腫瘍のクローン進化を考える上でプラス要因と考えられるが、膵IPMNにおいてRNF43やKLF4等の変異が、高異形病変に比較して低異形病変により高頻度に見られる現象も最近証明されている。さらに、GNAS活性化の意義は臓器・組織依存性も存在する。すなわち、脳腫瘍(髄芽腫)や皮膚癌(基底細胞癌)においてはGNAS-PKA経路がGLIやYAP等を抑制し、発癌抑制的に機能することが報告されている。このことは、遺伝子異常の蓄積に伴いOncogene addiction(癌遺伝子中毒)が成立するには、細胞の種類や状態(cellular context)によって異なるデリケートなバランスが求められることを示唆する。

それでは、GNAS変異の役割が腫瘍発生と進展それぞれの段階で異なる理由は何か？膵癌細胞の増殖に伴う低酸素などの微小環境が重要な要因となっている可能性がある。すなわち、1)GNAS-PKA経路の活性化はSer173のリン酸化を介して、細胞エネルギーに関わるAMPKを抑制すること、2)低酸素環境ではAMPKがNICDのユビキチン経路を介した分解阻害により、その安定性を促す機構の存在が示されており、腫瘍後期ではこのような複合的な要因でGNAS経路によるNotch経路の阻害が成立しているのかもしれない。今後、PKAのリン酸化基質の特定により、膵癌微小環境における分子制御について理解を深める必要がある。

GNAS変異はCDX2誘導を介してMUC2発現、即ち腸型形質を誘導することが報告されているが、MUC5B発現とより強い関連性が示され、ヒト外科手術標本を用いた免疫染色においてもその傾向が示唆された。本研究では、MUC5Bのknock-downにより腫瘍の粘液産生能の顕著な低下を確認したが、このことが浸潤能に直接影響を与え

ることはなかった。しかし、GNASによるムチンファミリー分子群の発現制御は、癌微小環境の変化を介して腫瘍細胞の形質に間接的に影響を及ぼす可能性もある。我々はGNAS変異がミトコンドリアやautophagyにも顕著な影響を及ぼす実験データを得ており、今後、細胞のエネルギー代謝の観点からKRAS及びGNAS経路のクロストークを明らかにしていきたい。また、IPMNの悪性度評価の指標となる嚢胞サイズは豊富なムチン産生を反映するため、必ずしも生物学的な悪性度とは関連しない。このため、嚢胞径のみを根拠に、積極的な外科切除を行う意義は乏しい可能性がある。産生された粘液の腫瘍増殖・進展における意義をより明確にすることは、今後のIPMN診療ガイドラインの改定に向けた重要な課題となる。

最後に、本研究の結果は、GNAS変異を標的とした薬物治療の是非について、重要な知見を与える。同変異がNICDを介して腫瘍浸潤に対し抑制的な作用を有することから、GNASを標的とする治療を考える場合には、腫瘍に関連する腫瘍増殖経路を選択的に阻害することに留意すべきである。実際に活性型GNASの強制発現が腫瘍増殖を抑制すること、PKAが“mesenchymal-to-epithelial”を誘導し、癌細胞の幹細胞性喪失を促す事も報告されている。GNAS-PKAが部分的であれ KRASシグナルに拮抗しうることは、膵癌をはじめとする様々な癌種において「悪の根源」とされるKRAS下流経路を標的とする新規創薬へ発展する可能性を秘めており、今後の研究でその全貌を明らかにしたい。

結 論

膵 IPMN では GNAS 変異により MUC2, 5B, 5AC を中心としたムチン産生能が亢進し、特徴的な膵管内の豊富な粘液産生を伴う嚢胞状形態を誘導する。膵腫瘍の発生段階で KRAS 及び GNAS はいずれもドライバー遺伝子が重要な役割を担うが、後者は腫瘍後期段階では Notch シグナルを介し、KRAS の暴走にブレーキをかけていることが新たに分かった。この GNAS の癌抑制シグナルを理解することは IPMN 関連膵癌の診断や治療戦略に一石を投じると期待される。




引 用 文 献

- 1) Patra KC, Bardeesy N, Mizukami Y: Diversity of precursor lesions for pancreatic cancer: The genetics and biology of intraductal papillary mucinous neoplasm. Clin Transl Gastroenterol 2017; 8: e86.
- 2) Patra KC, Kato Y, Mizukami Y, Widholz S, Boukhali M, Revenco I, Grossman EA, Ji F, Sadreyev RI, Liss AS, Screatton RA, Sakamoto K, Ryan DP, Kenudson MM, del Castillo CF, Nomura DK, Haas W, Bardeesy N: Mutant gnas drives pancreatic tumorigenesis by inducing pka-mediated sik suppression and reprogramming lipid metabolism. Nat Cell Biol 2018; 20: 811-822.
- 3) Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F: Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013;8:2281-308.

参 考 論 文

- 1) Kawabata H, Miyazawa Y, Sato H, Okada T, Hayashi A, Iwama T, Fujibayashi S, Goto T, Sasajima J, Takauji S, Fujiya M, Torimoto Y, Tanino M, Omori Y, Ono Y, Karasaki H, Mizukami Y, Okumura T: Genetic analysis of postoperative recurrence of pancreatic cancer potentially owing to needle tract seeding during eus-fnb. Endosc Int Open 2019; 7: E1768-E1772.
- 2) 河端秀賢、水上裕輔、岡田哲弘、佐藤裕基、林 明宏、後藤拓磨、上田 潤、小野裕介、唐崎秀則、奥村利勝. IPMNの分子基盤はどこまでわかったか (特集・膵嚢胞診療最前線—IPMN 国際診療コンセンサスガイドライン改訂を踏まえて—) 肝胆膵 77巻5号:1003-1009(2018)

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	河端 秀賢
		審査委員長	中山 恒 
		審査委員	小林 博也 
		審査委員	川辺 淳一 
学位論文題目			
<p>Mutant <i>GNAS</i> limits tumor aggressiveness in established pancreatic cancer via antagonizing the KRAS-pathway. (GNAS 変異は KRAS 経路に拮抗することにより、膵癌の悪性度を抑える。)</p> <p>掲載雑誌：J Gastroenterol 57:208-220; 2022</p>			
<p>(本論文が評価される点及び審査結果を600字から800字以内で簡潔に記載すること。)</p> <p>膵癌は全世界で、最も死亡率の高いがん種の一つであり、PanIN、IPMN と呼ばれる前駆型より発生する。KRAS 変異が共通に認められるのに対して、GNAS 変異は IPMN に特徴的である。GNAS はがん促進的と抑制的の両方向に作用することが知られているが、その分子機序は明らかではなかった。申請者は、GNAS 変異を持つ膵癌細胞より、CRISPR/Cas9 による遺伝子改変技術を用いて、GNAS 野生型のみが発現するような細胞株を樹立した。この細胞では、PKA 経路の活性が抑制され、腫瘍形成能が亢進していた。さらに、野生型・変異型を比較した遺伝子発現解析より、野生型では Notch シグナル経路が亢進し、細胞移動能や浸潤能が高まっていた。この結果は、膵癌の進展過程の初期では、KRAS と GNAS が協調的に増殖を促進する一方で、浸潤能を獲得する過程では、GNAS を介した PKA の活性化が Notch シグナルを抑制して、進展を抑制することを示すものである。</p> <p>試問では、申請者は、研究の背景、手法、結果、今後の展望までをプレゼンテーションし、質疑に明確に答えることができた。論文発表会では、KO 細胞作製時のオフターゲット効果、がんステージとの関連、臨床応用への展望などの質問が出たが、いずれも適切に回答がなされた。</p> <p>以上より、本研究成果は、十分な新規性を有し、難治性の膵癌の克服にむけた重要な知見となり得るものであり、河端氏は本学博士号(医学)を授与するのにふさわしい学識を持つと本審査委員会とは判断した。</p>			