

令和 2 年 2 月 28 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 51

氏 名 岸川 孝弘

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ボストン (国名：アメリカ合衆国)

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

膵発癌におけるノンコーディング RNA の果たす分子生物学的意義についての検討

3. 派遣期間：平成 30 年 2 月 1 日 ～ 令和 2 年 1 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Division of Genetics, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意

書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究成果】

1. マウスモデルを用いた反復配列 RNA の発癌促進機構の検討

① 反復配列 RNA 発現マウスの作成

報告者はこれまでノンコーディング RNA のひとつである「反復配列 RNA」の発現の分子生物学的意義について、消化器癌、特に膵癌において検証を行ってきた。日本での研究成果として、1) サテライト RNA と呼ばれる反復配列 RNA が発癌過程初期の前がん病変の段階から高度に発現しており、この反復配列 RNA を強制発現させることによって酸化ストレスによる DNA 損傷修復の遅延と突然変異率の上昇が惹起されること、2) この分子機序として、DNA 修復タンパク YBX1 と反復配列 RNA が結合することによって、DNA 損傷時に核内移行するべき YBX1 が細胞質に拘束され、損傷修復機構の活性が低下することを示してきた。

これらの知見をより普遍的なものとするために、全身性に反復配列 RNA を発現するトランスジェニックマウスを樹立した。このマウスに膵特異的恒常活性型 Kras 発現マウスを交配させ、膵臓に発生する腫瘍形成様式の変化について観察を行った。

② 反復配列 RNA 発現による膵腫瘍形成促進

正常膵組織に変異 Kras を導入すると、6-8 週齢において異時多発的に腺腫様前癌病変が形成されるが、反復配列 RNA 発現マウスにおいて、腫瘍形成が促進されることが分かった (図 1)。さらに週齢を重ねてマウスを飼育したが、浸潤、転移を伴う悪性度の強い腫瘍の形成には至らなかったものの、反復配列 RNA 発現マウス群に有意に生存率の低下を認めた。

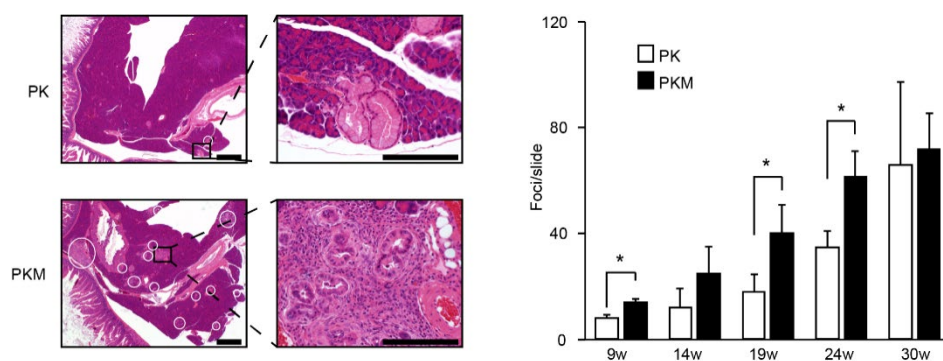


図 1 反復配列 RNA 発現による膵腺腫様腫瘍の形成促進

左) 変異型 Kras マウス(PK)と変異 Kras+反復配列 RNA 発現マウス(PKM)の組織像

右) 週齢ごとの腫瘍数の比較 (Kishikawa et al. Mol Can Res より一部改変)

③ 反復配列 RNA 発現による DNA 損傷回復の遅延と突然変異率の上昇

In vivo の実験系において腫瘍形成が促進された分子学的背景として、in vitro の系で認められた酸化ストレスによる DNA 損傷の修復遅延、YBX1 の核内移行の阻害について、セルレインによる炎症誘導下での検討を行ったところ、反復配列 RNA 発現マウスにおいて有意に損傷 DNA の増加、YBX1 の核内移行率の低下を認めた。以上の結果から in vivo の系においても反復配列 RNA の発現がストレス下での DNA 損傷修復の遅延を介してランダムな突然変異率を上昇させている可能性が示唆された (Kishikawa et al. Mol Can Res, 2018)。

2. 膵癌化学療法耐性化に関与する non-coding RNA の同定とその分子機能の解析

① Patient derived xenograft (PDX) サンプルを用いた化学療法耐性寄与遺伝子の網羅的解析
近年、従来の化学療法に加えて、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬等の新たな側面をターゲットとした新薬の開発が急激に進んでおり、多数の癌種で目覚ましい効果を上げていくが、膵癌に関しては依然化学療法の奏効率が低く、5 年生存率の改善が乏しい原因となっている。化学療法が奏功しない原因として、治療薬に対する耐性の獲得が一番に挙げられる。すでに複数のタンパク質が耐性獲得に必要な役割を持つことは示されているが、一部の薬剤においては耐性細胞と感受性の高い細胞とを比較した網羅的 RNA 解析において、coding gene よりも non-coding gene の方が発現パターンの変動が大きいことも分かってきている。そこで現在最も普遍的に膵癌に対して使用されている薬剤である gemcitabine に着目して、その耐性化に寄与する non-coding RNA の同定を試みた。

膵癌患者の手術検体から作成した PDX サンプルの中から、gemcitabine に対して最も感受

性の高かった群と最も耐性を示した群からそれぞれ 5 サンプルを抽出し、RNA-seq による網羅的解析を行った。

② 化学療法耐性に寄与する non-coding RNA の同定と機能的 validation

薬剤耐性、感受性組織の比較で有意な発現差を認めた long non-coding RNA (lncRNA) について、さらに癌細胞株における遺伝子発現 profile の中から gemcitabine 感受性と関連するものを抽出して候補を絞り込んだ。これらの lncRNA を実際に細胞に過剰発現させることによって gemcitabine に対する耐性が獲得されるかどうか in vitro での検証を行った。この際 endogenous な locus からの遺伝子発現を実現するために転写発現誘導型 CRISPR (CRISPRa) システムを用いた。CRISPR の本来の使用目的は、任意にデザインした gRNA 配列と共通するゲノム上の配列に Cas9 と呼ばれる細菌由来の酵素を誘導し、特定の部位に二重鎖切断を起こしてゲノム編集を行うものであるが、CRISPRa システムは、endonuclease 機能を欠失させた dCas9 に転写誘導因子である p65, VP64, HSF1 をキメラ融合させたもので、遺伝子の promoter 領域に gRNA を設定することによって、下流の遺伝子の発現を強制的に惹起することが可能となる (図 2)。Non-coding RNA は従来用いられてきた cloning vector を transfection する ectopic な過剰発現系では生体内での正確な細胞内局在や立体構造を示さない場合があることが知られており、このシステムを用いることで、より自然な発現制御が可能となるという利点がある。

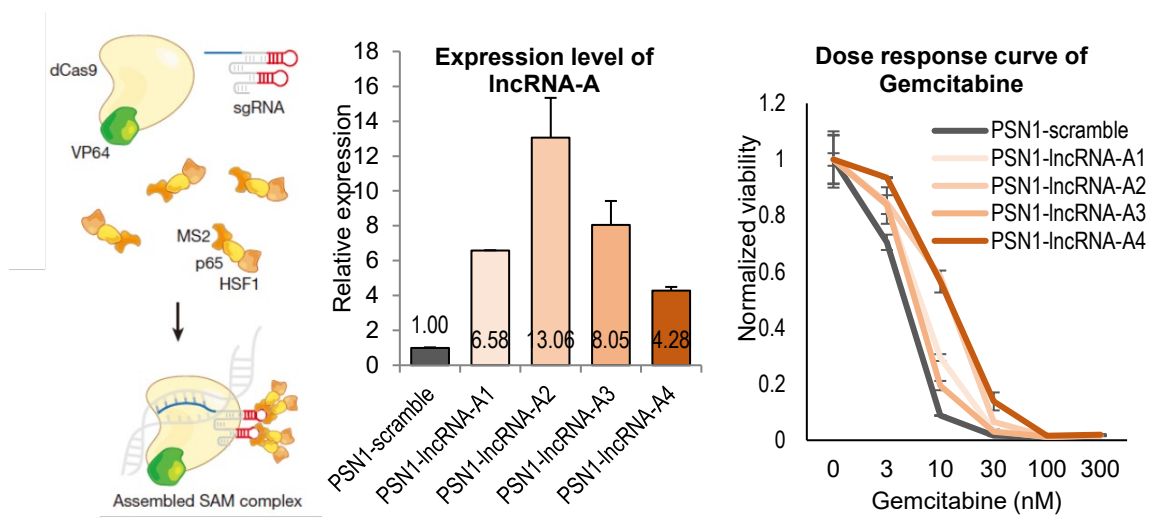


図2 CRISPRa システムによる non-coding RNA の発現誘導

左) CRISPRa の模式図。複数の転写促進因子を dCas9 複合体に結合させ強力に転写を誘導する。

中) CRISPRa システムによる lncRNA 過剰発現の一例。Control と比較して 4–13 倍の発現上昇を認める。

右) lncRNA 強制発現による gemcitabine への耐性獲得。

実際に off-target のリスクを低下させるために複数設定した gRNA のいずれでも CRISPRa システムによる過剰発現を認めており、また網羅的解析によって絞り込まれた 10 種の lncRNA の中には、過剰発現した膵癌細胞株が gemcitabine への耐性化を示すものが存在した。これらの lncRNA は膵癌における gemcitabine による治療予後を予測するバイオマーカーとして期待されるだけでなく、効率的に発現を抑制することで治療抵抗性を改善する新規の核酸治療としての可能性を有していると考えられる。

3. ユビキチン化酵素 WWP1 を介した PI3K シグナル経路の制御機構解明

① WWP1 による PTEN の非特異的ユビキチン化による機能障害

PTEN は最も有名かつ重要な癌抑制遺伝子の一つである。PTEN の主要な機能は、細胞膜に存在する PIP3 を脱リン酸化して PIP2 に変換することで PI3K/AKT/mTOR シグナル経路を負に制御する事である。この経路は細胞の代謝や増殖の制御、オートファジーなど生命の恒常性維持に関わる因子を司るため、PTEN の機能が低下して PI3K 経路が脱制御されるとアポトーシスが抑制されるとともに代謝経路の変化が起こり、増殖が促進されて腫瘍形成へとつながる。実際に多くの癌種において PTEN の変異や発現低下が起こることが知られており、PTEN

を強制発現するマウスでは発癌が抑制されることができていることが知られている。そのため癌組織において PTEN の機能を再活性化する薬学的アプローチは発癌予防、抗癌治療の面で希求されている。一方、当研究室の Lee YR らは癌細胞において PTEN を基質としてその機能を制御するユビキチン化酵素を質量分析解析を用いて探索し、WWP1 を同定した。WWP1 は NEDD スーパーファミリーに属するユビキチン E3 リガーゼであり、多くの腫瘍において発現が増加していることが知られている。ユビキチン化反応では付加されるユビキチンの数や結合するリシン残基の部位によって多様な型のポリユビキチン鎖が形成される。一般的にはポリユビキチン化は標的タンパクをプロテアソームに認識させ分解を促進させるが、WWP1 による PTEN のポリユビキチン化は、分解促進ではなく PTEN の二量体形成を阻害して細胞内局在を変化させるという非特異的な役割を持っており、結果として PTEN の PIP3 の脱リン酸化作用が低下し PI3K シグナル経路を活性化させることが示唆された (Lee et al, *Science*, 2019)。

② 発癌素因遺伝子としての WWP1 の機能亢進型生殖細胞変異の同定

先天的に PTEN に機能異常を認める遺伝性疾患群として PTEN 過誤腫症候群 (PHTS) が知られている。この患者群は幼年期より PI3K シグナル活性が亢進し、種々の良性腫瘍や発達異常、さらには多発悪性腫瘍を発生するとされている。しかしながら PTEN 遺伝子に変異を持つ症例は全体の約 30% にすぎず、遺伝性疾患でありながらその原因遺伝子は全貌が解明されていないのが現状である。これら PTEN 変異を有さない家族性 PHTS 患者において生殖細胞変異を網羅的に解析した結果、WWP1 に一塩基変異を有する患者を 4% に認めた。これらの変異のうちユビキチン化触媒活性を持つ HECT ドメイン内の変異は 1 家系において浸透率が 100% であった。さらに、癌患者の大規模データベースある TCGA に登録された WWP1 の生殖細胞変異を検索したところ、PHTS 患者に好発する乳癌、子宮癌などにおいて WWP1 の変異が蓄積しており、特に大腸癌においては腸ポリポーシスの原因遺伝子として知られている STK11 や MSH2 などの変異率に匹敵する頻度で認めることが分かった。これらの知見から WWP1 の変異が PTEN の機能阻害を介して PHTS の症候の発生、発癌に関与しているという仮説を立てた。これを検証するため、大腸癌細胞株に CRISPR system を用いて WWP1 の一塩基変異を導入し、野生型との表現型を比較したところ、変異株において細胞増殖が亢進し、腫瘍形成能も著明に亢進することが分かった。分子機能的には変異型 WWP1 は PTEN のユビキチン化を促進させ、PI3K 経路を活性化することが分かった。さらに正常組織においても変異型 WWP1 の機能を検討するため、WWP1 の一塩基変異アリルを有するマウスモデルを CRISPR システムを用いて作成した。このマウスから採取した MEF では大腸癌細胞株と同様に WWP1 の機能が亢進し PI3K シグナルが活性化していた (Lee et al, *NEJM*, in revision)。

③ WWP1 阻害を併用することによる PI3K 阻害薬の活性増強効果の検討

PI3K シグナル経路は多くの癌種において異常な活性化を認めるため、数多くの PI3K 経路を阻害する薬剤が開発され、現在も臨床試験が多数進行中である。しかし他の分子標的薬と同様、阻害薬に対する耐性獲得が高率に発生すること、高血糖などの副作用によって忍容性が低下することなどから期待された効果が得られていないのが現状である。また PTEN の deletion や epigenetic な発現低下は PI3K 阻害薬耐性との関連が指摘されていることから、「WWP1 の阻害によって PTEN の機能を再活性化させることが、PI3K 阻害薬に対する耐性獲得を回避し、治療効果を高める」という仮説を立て、より疾患治療的な側面から WWP1 の分子生物学的機序についての検討を加えた。

まず PI3K 阻害薬投与による PTEN の機能変化について検討したところ、複数の乳癌細胞株において、PI3K 阻害薬投与後に膜分画 PTEN が減少することを見出した。さらに PI3K 阻害薬投与後には PTEN のユビキチン化が増加しており、shRNA によって WWP1 を抑制すると PTEN のユビキチン化がキャンセルされ、阻害薬投与後でも細胞膜への局在が維持されることが分かった。表現型としても PTEN を発現している細胞株でのみ WWP1 抑制によって PI3K 阻害薬への感受性が増加していた。

PI3K 阻害薬を長期間投与して耐性を獲得させた乳癌細胞株と親株を比較すると WWP1 の発現が増加しており、また PTEN のユビキチン化も増加していた。また耐性株では WWP1 の抑制による PI3K 阻害薬の活性増強効果がより強く認められた。

我々は以前の報告において WWP1 を特異的に阻害する薬剤として Indole-3-Carbinol (I3C) を同定した。I3C を PI3K 阻害薬と併用して乳癌細胞株の 3 次元培養及び xenograft model に投与したところ、in vitro, in vivo の双方において併用群は高い腫瘍抑制効果を認めた。I3C は植物由来の低分子化合物であり、その高い安全性が保証されていることから、PI3K 阻害薬との併用によってその治療効果を低リスクのまま高めることができると期待さ

れる (Kishikawa et al, in submission)。

【研究成果の総括】

- 1) 反復配列 RNA に関してはマウスを用いた in vivo での機能解析を行い、腫瘍形成促進作用を持つことを見出した。今後はさらに発癌下での転写調整機構についても検討を加えていきたい。
- 2) 膵癌の予後改善のために不可欠である治療薬に対する耐性獲得について、non-coding RNA の側面から新規標的分子の検索を行った。今後は分子機序の解明を行うとともに、耐性化の改善を目指した治療法の開発も視野に入れて進めていきたい。
- 3) 発癌を促進するユビキチン化酵素 WWP1 の分子生物学的機序の解明を行った。今後は変異型 WWP1 マウスの表現型を長期に観察して PHTS の臨床症候との比較を行うとともに、PI3K 阻害薬投与下での生化学的役割について検討していきたい。

【参加学会】

1. 5th Annual Non-coding RNA Symposium, Boston, Apr. 25, 2019.
2. PTEN and its Pathways, Scientific PTEN Meeting, Boston, Sep. 24-25, 2019
3. HMS Initiative for RNA Medicine Retreat, Boston, Oct. 28, 2019.
4. Standard of Cure Cancer Symposium, Boston, Nov. 17, 2019
5. 4th Annual Non-coding RNA Symposium, Boston, Apr. 26, 2018.
6. AACR Pancreatic Cancer: Advances in Science and Clinical Care, Boston, Sept. 21-24, 2018.
7. Standard of Cure Cancer Symposium, Boston, Oct. 17, 2018.