

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10203

研究課題名(和文)膵癌幹細胞におけるc-mycネットワークの発現意義の解明と新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文)The significance of c-myc expression in pancreatic cancer

研究代表者

秋田 裕史(Hirofumi, Akita)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・医長

研究者番号：70528463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌細胞株にtet調節系c-myc発現ベクターを導入し、c-myc発現量を低刺激すると、spheroid形成能や造腫瘍能の増加を認めた。一方で高刺激にて増殖能は極端に低下し、細胞はapoptosisに陥った。次に膵癌症例65例のc-myc発現と予後について検討した。C-myc強発現群は低発現群に比べOS、DFSともに有意に低かった($p < 0.001$, $p = 0.003$)。また術前CRTを施行した45例において組織学的効果とc-myc発現に有意な相関を認めず、c-mycは治療抵抗性に関連すると思われた。膵癌においてc-mycは癌幹細胞に関連し、治療抵抗性を示し、予後不良である可能性が示唆された。

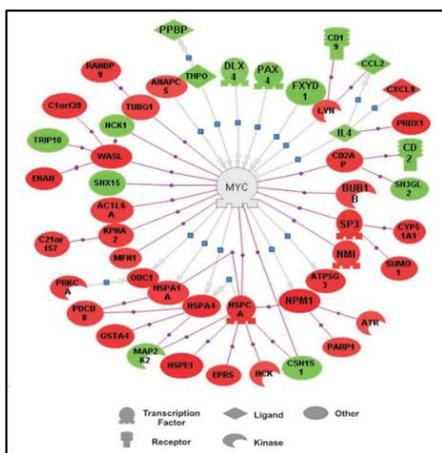
研究成果の概要(英文)：The mild stimulation of c-myc by using tet-myc activation system lead pancreatic cancer cell lines to spindle-like cells, increasing the spheroid formation ability and tumorigenesis potential. However, when exceeding a threshold level, c-MYC induced loss of proliferation potential and a pro-apoptotic program. Next we examined the relationship between c-myc expression and clinical outcome after radical resection by using 65 pancreatic cancer patients. Patients with high c-myc expression showed a significantly worse prognosis both in overall survival and disease-free survival($p < 0.001$, $p = 0.003$). In 45 patients with preoperative chemoradiotherapy, there was no significant difference between c-myc expression and pathological effect. In conclusion, c-myc could be related to the maintenance of cancer stem cell in pancreatic cancer and high c-myc expression in pancreatic cancer showed poor prognosis with showing the resistance of preoperative chemoradiotherapy.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵臓癌 c-myc 癌幹細胞 予後

1. 研究開始当初の背景

膵癌は消化器癌の中でも非常に予後が悪く、根治切除を施行しても5年生存率は20%に満たない。そのため抗癌剤をはじめ、分子標的治療薬など様々な集学的治療が試みられているが、多くの膵癌は治療抵抗性であり奏効率は20-30%程度と良好な結果とは言えない。膵癌の持つ生物学的悪性度の解明は、治療成績向上の為に非常に重要な課題である。特に膵癌メカニズムと膵癌幹細胞の維持機構の解明は、治療抵抗性の改善や新規治療の開発にもつながり、今後の膵癌研究においても非常に重要であると思われる。c-myc 遺伝子は癌遺伝子として最も重要なもののひとつで、全遺伝子の15%に影響を及ぼす転写因子であり、その機能については昔から様々な研究が行われてきた(図1)。最近ではES細胞において高発現していることが確認され、またiPS細胞を誘導するための4因子の一つとしても注目されており、c-mycの持つ未分化性を維持する機能についても注目されている。癌研究においては近年、癌は一部の多分化能を有する癌により支配され、それらを中心に癌のheterogeneityを形成するという癌幹細胞仮説が提唱されており¹、現在様々な癌において癌幹細胞の同定と癌幹細胞の病態解明の研究がおこなわれている。癌幹細胞を同定し、その病態を把握することは、癌幹細胞を標的とした治療法の開発に繋がり、癌治療の飛躍的な向上をもたらす可能性を秘めている。一方で、膵癌におけるc-mycの発現意義はまだまだ明らかにされていない。2014年には、c-mycが膵癌発生に関連するという報告が行われているが²、膵癌におけるc-mycの役割についてはまだまだ不明な点が多い。膵癌におけるc-mycの発現意義が解明されれば、難治といわれる膵癌に対する治療戦略の新たなアプローチの一助になると思われる。



(Kaposi-Novak P et al, Cancer Res2009)

図1

2. 研究の目的

本研究では、膵癌におけるc-mycの役割を、テトラサイクリン系c-myc発現調節ベクター

を用いて、癌幹細胞維持機能を中心に解明するとともに、臨床サンプルを用いて膵癌におけるc-myc発現の意義を解明する。さらに全遺伝子の15%に影響を及ぼすc-mycの発現を調節することで、癌幹細胞維持に関わる新規moleculeを探索し、癌幹細胞を治療targetとした標的分子の発掘を行う。

3. 研究の方法

5種の膵癌細胞株にc-myc発現調節ベクター(図2)を導入することにより、c-myc発現を自由にコントロールし、c-mycの膵癌における増殖促進やapoptosis誘導といった役割を解明するとともに、癌幹細胞誘導および維持との関係をin vitro, in vivo実験において証明する。また全遺伝子の15%に影響を与えるc-mycの発現を変化させることで、癌幹細胞維持にc-mycを中心としたc-mycネットワークがどのように関与しているかを検討し、このネットワークの中から癌幹細胞維持や薬剤耐性に関与する、今後治療のtargetとなりうる新規moleculeを探索する。これらのmoleculeについて新たにin vitroでの確認実験を行い、さらに全国有数の膵癌の専門病院である当施設の豊富に保有している膵癌サンプルを用いて、c-myc蛋白及び新規治療標的となりうるmoleculeの発現程度を検討し、予後や抗がん剤耐性などとの関係を解明する。

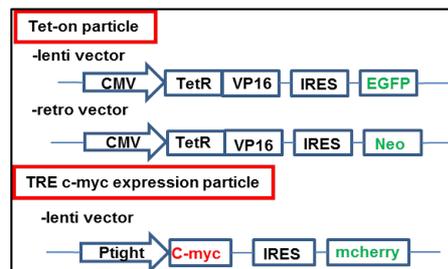


図2

4. 研究成果

まずテトラサイクリン系発現調節ベクターを膵癌細胞株に導入し、c-mycの発現量によって細胞がどのように変化をするかを確認した。まずテトラサイクリン調節系c-myc発現レンチウイルスベクターを膵癌細胞株に導入し、doxycyclineの濃度によってc-myc発現が調整できることを確認した(図3)。Dxの濃度を調節しc-mycの発現量を2-3倍程度に調節すると、細胞はspindle likeに変化し、proliferation assayにおいて増殖能の増加を認めた。またspheroid形成能や造腫瘍能の上昇も認められた(図4)。一方で、発現を5倍以上に調節すると増殖能は極端に低下し、spheroid形成能も低下した。さらにbcl-2などの発現が上昇し、細胞はapoptosisに陥ることが分かった。Flow cytometryによるside population解析においても、c-mycの低刺激によりSP fractionが増加したのに

対し、高刺激では逆に SP fraction の低下が認められた。これにより c-myc は低刺激により cancer stem cell もしくは progenitor cell の刺激を行い、高刺激により逆に apoptosis を誘導することが示唆された。今後さらに細胞内の未分化性マーカーや膵癌の癌幹細胞に関わるマーカーについての発現解析を行い、c-myc 低刺激における病態を解析していく予定である。

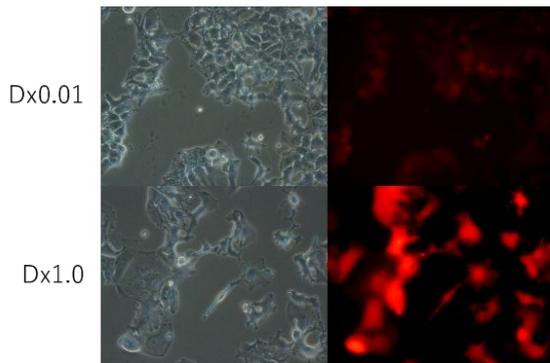


図 3



図 4

次に臨床サンプルの c-myc 発現について検討した。根治切除(R0)を施行した膵癌症例 65 例の切除標本の癌部分の c-myc 発現と予後について検討した。65 例の内訳は男性 37 名、女性 28 名で、平均年齢は 66.5 歳であった。45 例で Gemcitabine を用いた術前化学放射線治療(術前 CRT)を施行した。病変部位は膵頭部 43 例、膵体尾部 23 例で、膵頭十二指腸切除術(PD)を 41 例に、膵体尾部切除術(DP)を 21 例に、膵全摘術(TP)を 3 例に施行した。PD/TP を施行した 44 例中 8 例で門脈を合併切除し、DP を施行した 21 例中 3 例で腹腔動脈を合併切除した。癌部での c-myc 発現を図 5 のように陰性、弱陽性、陽性、強陽性に分類し、陰性/弱陽性を低発現群、陽性/強陽性を高発現群として、2 群に分けて治療成績を比較した。C-myc 強発現群は 36 例で、低発現群は 29 例であった。両群間で腫瘍の進行度など患者背景に有意差を認めなかった。C-myc 強発現群の 5 年生存率(OS)は 26.7%であり、低発現群の 67.6%に比べて有意に低かった($p < 0.001$)。さらに 5 年無再発生存率(DFS)も c-myc 強発現群は低発現群に比べ有意に低かった(21.4% vs 54.8%, $p = 0.003$) (図 6)。また術前 CRT を施行した 45 例においても同様に予後を検討したところ、術前 CRT 施行令にお

いても c-myc 低発現群は高発現群に対し、OS($p = 0.003$)、DFS($p = 0.023$)ともに有意に予後良好であった。一方で、組織学的効果(Evans 分類)と c-myc の発現量の検討においては、組織学的効果と c-myc 発現には有意な相関を認めなかった。これは c-myc 発現陽性細胞が治療に抵抗性を示すためと思われた。以上より、膵癌において c-myc が癌幹細胞に関連する可能性があり、腫瘍内で高発現している症例は治療抵抗性を示し、予後不良である可能性が示唆された、今後さらに症例数を増やして検討するとともに、c-myc の下流の signaling を検討し、治療の target となる分子を検索していく予定である。

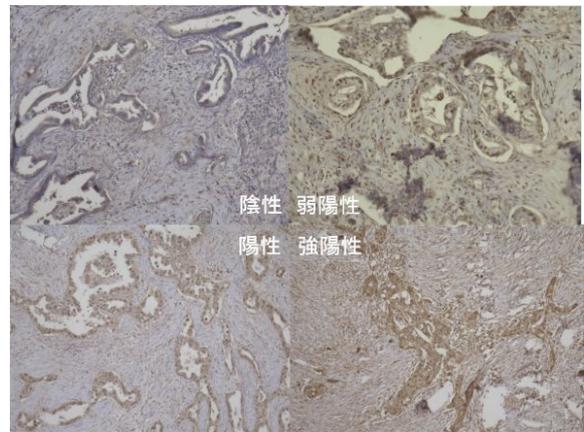


図 5

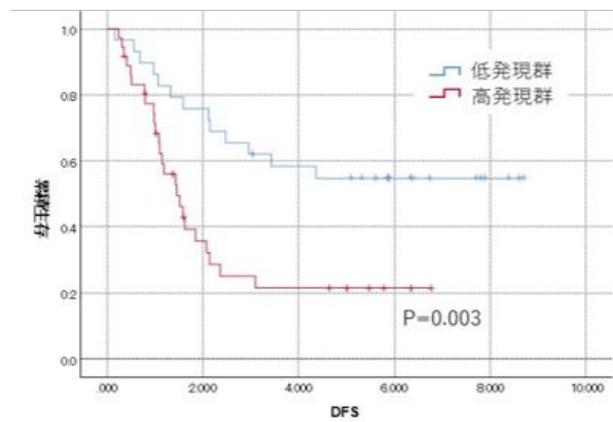
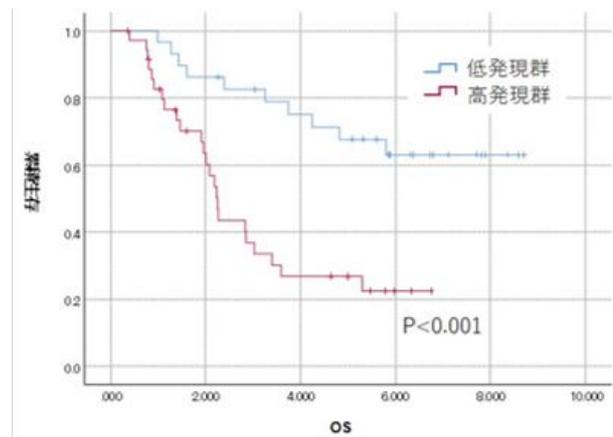


図 6

(引用文献)

1. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859):105-11;2001
2. Inagawa Y, Yamada K, Yugawa T, et al. A human cancer xenograft model utilizing normal pancreatic duct epithelial cells conditionally transformed with defined oncogenes. *Carcinogenesis* 35(8):1840-6;2014

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 8件)

1. FDG-PET predicts treatment efficacy and surgical outcome of pre-operative chemoradiation therapy for resectable and borderline resectable pancreatic cancer. Akita H, Takahashi H, Ohigashi H, Tomokuni A, Kobayashi S, Sugimura K, Miyoshi N, Moon JH, Yasui M, Omori T, Miyata H, Ohue M, Fujiwara Y, Yano M, Ishikawa O, Sakon M. *Eur J Surg Oncol* 43(6):1061-67;2017 DOI 10.1186/s40792-017-0326-y 査読あり

2. The POU5F1 gene expression in colorectal cancer: a novel prognostic marker. Miyoshi N, Fujino S, Ohue M, Yasui M, Takahashi Y, Sugimura K, Tomokuni A, Akita H, Kobayashi S, Takahashi H, Omori T, Miyata H, Yano M. *Surg Today*. 2018 Feb 27. doi: 10.1007/s00595-018-1644-9. [Epub ahead of print] 査読あり

3. ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for the prediction of survival in patients with advanced esophageal cancer who have undergone neoadjuvant chemotherapy. Yano M, Miyata H, Sugimura K, Motoori M, Omori T, Fujiwara Y, Miyoshi N, Yasui M, Ohue M, Akita H, Tomokuni A, Takahashi H, Kobayashi S, Sakon M. *Mol Clin Oncol*.8(3):434-440;2018 doi: 10.3892/mco.2018.1546. 査読あり

4. Laparoscopic Hilar Lymph Node Sampling in Patients With Biliary Tract Cancers That are Rarely Associated With Nodal Metastasis. Kobayashi S, Tomokuni A, Takahashi H, Akita H, Marubashi S, Gotoh K, Yanagimoto Y, Takahashi Y, Sugimura K, Miyoshi N, Moon JH, Yasui M, Omori T, Miyata H, Ohue M, Fujiwara Y, Yano M, Sakon M. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*

28(2):90-95;2018.

doi: 10.1097/SLE.0000000000000510.

査読あり

5. The Clinical Significance of Alpha-Fetoprotein mRNAs in Patients with Hepatocellular Carcinoma.

Kobayashi S, Tomokuni A, Takahashi H, Akita H, Sugimura K, Miyoshi N, Moon JH, Yasui M, Omori T, Ohue M, Fujiwara Y, Yano M, Sakon M.

Gastrointest Tumors 3(3-4):141-152;2017.

doi: 10.1159/000455955 査読あり

6. Novel intraoperative use of the "Tensipresser" to assess factors predictive of pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy.

Mikamori M, Gotoh K, Takahashi H, Akita H, Tomokuni A, Kobayashi S, Ohue M, Fujiwara Y, Yano M, Ishikawa O, Sakon M.

Surg Today.47(10):1201-1207;2017.

doi: 10.1007/s00595-017-1509-7.

査読あり

7. Serum Metabolite Profiling for the Detection of Pancreatic Cancer: Results of a Large Independent Validation Study.

Akita H, Ritchie SA, Takemasa I, Eguchi H, Pastural E, Jin W, Yamazaki Y, Goodenow DB, Nagano H, Monden M, Mori M, Doki Y.

Pancreas 45(10):1418-1423;2016

DOI 10.1097/MPA.0000000000000680

査読あり

8. Preoperative Gemcitabine-based Chemoradiation Therapy for Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Impact of Venous and Arterial Involvement Status on Surgical Outcome and Pattern of Recurrence.

Takahashi H, Akita H, Tomokuni A, Kobayashi S, Ohigashi H, Fujiwara Y, Yano M, Sakon M, Ishikawa O.

Ann Surg 264(6):1091-1097;2016

DOI 10.1097/SLA.0000000000001547

査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋田 裕史 (Akita, Hirofumi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局 医長

研究者番号 70528463

(2) 研究分担者

永野 浩昭 (Nagano, Hiroaki)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 10294050

後藤 邦仁 (Gotoh, Kunihito)
大阪大学・医学系研究科(研究院)・助手
研究者番号 10362716

小林 省吾 (Kobayashi, Shogo)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大
阪国際がんセンター(研究所)・その他部
局・副部長
研究者番号 30452436

高橋 秀典 (Takahashi, Hidenori)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大
阪国際がんセンター(研究所)・その他部
局・副部長
研究者番号 90601120