

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15482

研究課題名(和文)膵癌における新たな細胞内分子ターゲットによる生物学的診断・治療法の開発

研究課題名(英文)Development of biological diagnosis and treatment of pancreatic cancer using a new intracellular molecule

研究代表者

森田 直樹 (MORITA, Naoki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・総括研究主幹

研究者番号：60371085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌細胞におけるpXY分子の生物学的意義を評価したところ、pXY分子は細胞の生存に強く関わること、細胞内抗酸化能・解毒能の維持に貢献していることが、FasL/Fas経路を阻害することで細胞の易傷性を低下させることを明らかにした。

pXY分子測定法の基礎的な検討を行ったところ、細胞からの培養液に漏出したpXY分子の分泌はELISA法にて可能であることを明らかにしたが、一方、血液中のpXY分子測定ではELISA法による検出可能な限界濃度に課題があり、より高い感受性を持つ抗体の開発が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Evaluation of the biological significance of pXY molecule in pancreatic cancer cells revealed that pXY molecule was strongly involved in cell survival, and that pXY contributed to maintenance of intracellular antioxidant capacity and detoxification ability, and that reduced the easy-cytotoxicity by inhibiting FasL/Fas ligand. The secretion of pXY from the cells into the culture medium was detected by conventional ELISA method, whereas there remained a problem with the detectable limit concentration of pXY in blood by the present ELISA method. These results indicated that a novel antibody with higher sensitivity to pXY is required to achieve the pXY detection in blood.

研究分野：分子生物学

キーワード：膵癌 治療ターゲット分子 生物学的診断・治療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵臓癌は依然として予後不良の癌の代表的なものであり、可能な限り早い段階で診断をして精度の高い治療を行うことが極めて重要である。膵癌では、癌を引き起こす最初の変異から成熟した癌細胞形成までに 10 年以上 遅延期間が存在することが明らかとなっており (Yachida et al., 2010)、早期での診断の重要性が強調されている。

(2) CT、MRI、PET といった画像診断法はたいへん優れた診断装置であるが、既存の画像診断法・バイオマーカーには限界があり、10mm 以下の病変を正確に検出することは極めて困難であり、これらの検査をルーチン化して健常人に頻回に行うことは現実的でない。加えて、これらは正常部分と正常でない部分の画像化されたイメージの相違に基づく診断法であり、癌細胞の生物学的特性・機能を反映したものではない。病変個々の進展様式、進展速度及び治療への反応の予測などといった質的診断に関しても、決して充分ではない。また、膵癌は早期に症状が出ないため、発見時には局所・遠隔転移を起こしていることが多く、外科治療が可能である場合でも奏功しないことが多い。あるいは外科的治療が不能な場合には、抗癌剤による治療等を行うが、有効な治療法は未だ確立していない。こうした事実は、現状の技術による個々の膵癌診断の不確実性、ひいては現在の治療法の限界を示している。

(3) このような状況下で、我々は消化器系腫瘍に注目して様々な分子生物学的な検討を進めていたが、膵臓癌細胞において特徴的にかつ著明に増加する機能性タンパク質 (pXY (仮称)) を同定し、膵臓癌の生物学的な特徴を表わす可能性があると考えられた。この分子は、正常膵組織での発現は低く、癌における診断・治療の有用性が期待された。

2. 研究の目的

(1) これまでに我々は、pXY について研究し、この分子に関して膵癌細胞以外で様々な生存能 (抗ストレス、抗アポトーシス) に関する機能を解析しており、膵癌細胞では特に高発現しているため、膵癌の増殖・転移などの進展にも関わる可能性が高いことを示した。この分子は細胞におけるゲートキーパー的な機能を持ち、膵癌における生物学的な特徴に強く関係することが期待される。

(2) 本研究では、この pXY 分子が膵癌細胞において、どのような機能を有し、膵癌細胞の増殖、生存能に関与し、膵癌の進展 (増大能、浸潤能、転移能) に影響するかを、細胞・小動物疾患モデルにて解析し、pXY の膵癌における治療ターゲットなるか否かを検討した。

3. 研究の方法

(1) マウスの各組織 (脳、肺、心臓、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、大腸、筋肉、皮膚、脂肪)、及びヒトの各種癌細胞株 (肝細胞癌細胞株 (Huh-7、HepG2)、大腸癌細胞 (SW480)、扁平上皮癌細胞株 (HeLa)、神経芽細胞種細胞株 (SK-N-AS)、腎癌細胞株 (ACHM)、膵癌細胞株 (Panc-1、AsPC-1)) を用いて、タンパク質画分を調製し、市販の pXY 抗体を用いて、ウエスタンブロット法により pXY タンパク質の発現プロファイルについて、詳細に検証した。また、マウスの各組織については、リアルタイム-PCR 法を用いて、pXY 遺伝子発現を詳細に解析した。

(2) ヒト膵癌細胞株:Panc-1 細胞、AsPC-1 細胞を用いて、生存能・転移能・増殖能・薬物耐性・抗低酸素能などに関して、pXY がどのように、あるいはどの程度関係しているかを細胞生物学的・分子生物学的に検討した。

pXY 分子発現量とともにリン酸化部位との関係を、抗体を用いてウエスタンブロット法により解析し、膵癌細胞株で pXY の特異的発現と同時にリン酸化の程度・部位を確認した。更に、pXY 遺伝子ノックダウン変異株を作製した。pXY の生物学的意義を確認するために、これら細胞株を用いて、実際に細胞生存能・細胞増殖能・細胞傷害に対する抵抗性を評価した。

また、分泌型リンフェラーゼ (*Cypiridina* または *Gaussia* リンフェラーゼ) を安定発現した膵癌細胞株の樹立を検討した。

(3) pXY タンパク質を、膵癌に対するバイオマーカーとして使用するために、培養液中、血液中における pXY タンパク質の測定条件及び検出条件を詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) pXY タンパク質は、マウスの各臓器にてユビキタスに発現しており、特に脳、心臓、肝臓、腎臓の各組織においてより多くのタンパク質発現が認められた。しかしながら、膵臓組織においては、pXY タンパク質の発現は検出できなかった。pXY 遺伝子は、ほぼ全ての臓器にて発現していたが、正常膵臓組織においては、殆ど発現が観られなかった。これらの結果より、正常マウス膵臓初期においては、pXY の遺伝子及びタンパク質の発現が認められないことが確認できた。

(2) ヒト膵癌を含む様々な癌細胞株を用いて、癌細胞における pXY タンパク質の発現を確認した。肝細胞癌細胞株 (Huh-7、HepG2)、大腸癌細胞 (SW480)、扁平上皮癌細胞株 (HeLa)、神経芽細胞種細胞株 (SK-N-AS)、腎癌細胞株 (ACHM)、膵癌細胞株 (Panc-1、AsPC-1) を検討したが、膵癌細胞株にて最も強い発現が認められた。他の癌細胞株では、肝細胞癌細胞株、神経芽細胞種細胞株、腎癌

細胞株にて中程度の発現を認めたのみであった。

(3) 以上(1)及び(2)の結果から、pXYタンパク質の発現について、膵癌細胞株に特異的な発現増加であることが認められたので、特に膵癌に対するバイオマーカーとなり得ることが期待された。そこで、ヒト膵癌細胞株(Panc-1、AsPC-1)を用いて、pXYタンパク質の発現や活性化について、更に検討した。

ヒト膵癌細胞株(Panc-1、AsPC-1)に対して、pXYタンパク質分子発現量とともに活性化に必要なリン酸化を検証した。既存の抗体を用いてSer351及びSer403に対するリン酸化を検討した。様々な培養条件において、Panc-1細胞株、AsPC-1細胞株におけるpXYタンパク質のリン酸化を検証したが、検出は困難であった。このため、膵癌細胞株におけるpXYタンパク質の活性化には、これらの部位のリン酸化が不要な可能性、あるいはこれら部位以外のリン酸化が必要である可能性等が考えられた。

(4) pXYの生物学的意義を確認するために、細胞を用いて実際に細胞生存能・細胞増殖能・細胞傷害に対する抵抗性を評価した。

pXYの発現・活性化は、細胞内抗酸化能に強く影響を与えていた。抗酸化能をつかさどる転写因子であるNrf2を強く活性化し、その下流にある様々な抗酸化分子(カタラーゼ、ヘムオキシゲナーゼI、チオレドキシニンなど)を上方制御していた。この事実は、細胞が酸化ストレスに対して基本的な抵抗性(さらには、低酸素に対する抵抗性)を与えることを示唆していると考えられた。

pXY刺激は、同時に抗アポトーシス分子であるBcl-xL、Bcl2を活性化(リン酸化)していた。また同時に、細胞生存のキーとなるAkt/PKB分子のリン酸化(活性化)を誘導していた。これらの事実は、癌細胞が様々な刺激によるアポトーシス細胞死(プログラム細胞死)から免れ、かつ強い生存能を有していることを示唆している。さらに、Fasリガンド、Fasの発現をも抑制したことから、pXYはリガンドを経由した細胞傷害に対しても抵抗性を与えていることが考えられた。FasリガンドあるいはFasは、肝のみならず膵癌細胞においても発現が高まることが報告されているため、pXYはそれらに対する特異的な防御機構であると推定された。しかしながら、pXY刺激は、細胞増殖に関わる分子(STAT3のリン酸化、サイクリンD1及びPCNA発現にて評価)の活性には影響を与えてはなかった。つまり、pXYは、細胞の増殖性を刺激している可能性は低いと考えられた。

(5) 膵癌細胞あるいはその他の不死化細胞株におけるpXY分子の生物学的意義を確認するために、種々の細胞株を細胞生存能・細胞増殖能・細胞傷害に対する抵抗性を評価し

た。また、pXY遺伝子をノックダウンすることにより、pXY分子の直接的な影響かどうかを検討した。pXY分子は細胞の生存に強く関わり、核内受容体LXR(Liver X receptor)の刺激により活性化されることが判明した。この分子は、Nrf-2あるいはKeap-1分子を経由して細胞内抗酸化能・解毒能の維持に貢献していることが確認された。また、細胞内生存に関わるAkt分子を活性化することにより細胞生存能を強めるとともに、Fasリガンド、Fasを抑制することで細胞の易傷害性を低下させることも判明した。これらの検討により、この分子の腫瘍病変などにおける生物学的意義を明らかとすることができた。

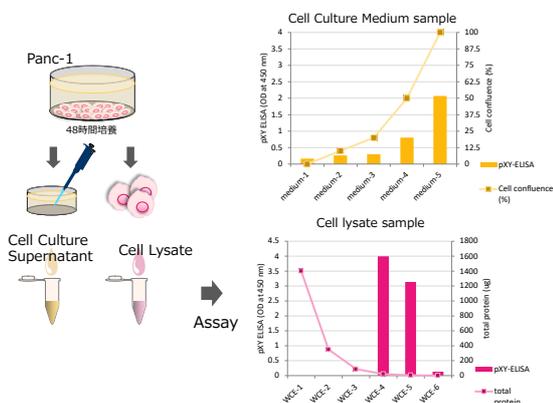
(6) pXYタンパク質を、膵癌に対するバイオマーカーとして使用するために、培養液中、血液中におけるpXYタンパク質の測定条件を検討した。

培養液中への細胞からのpXY分子の漏出、培養液に漏出したpXY分子測定法及び血中pXY分子測定法の基礎的な検討を行った。培養液への細胞からのpXY分子の分泌はELISA法にて可能であり、培養液中のpXY分子レベルと細胞増殖との関係を確認し、良好な相関関係があることが分かった。これにより、膵癌細胞数の増加予測、さらには上記に記載した腫瘍の生物学的な評価にも用いることが出来ると期待された。

細胞死により受動的に細胞外に放出している可能性があるため、その影響も検討したが、細胞が増殖期において良好な相関関係が認められたため、積極的なメカニズムで「分泌」されていると考えられた。

血中のpXY分子測定では、使用する抗体などを検討したが、ELISA法による検出可能な限界濃度に課題があり、より高い感受性を持つ抗体の開発が必要と考えられた。加えて、血中のpXY測定では、アルブミン、トランスフェリンなどの物質が測定を阻害していることが予想されたため、それらタンパク質の除去の要不要などを検討する必要がある。

Panc-1培養上清サンプルにおけるELISAをもちいたpXY検出の検討
Panc-1培養上清サンプルは、pXYはELISAで測定可能であった



(7) 分泌型ルシフェラーゼ (*Cypiridina* または *Gaussia* ルシフェラーゼ) を膵癌細胞株に安定導入することを試みたが、十分な発現量を示す細胞を得るのに時間がかかり、有効性を検討することができなかった。

(8) 今後は、分泌型ルシフェラーゼ安定発現株を用いて、マウスを用いた動物移植実験を行う。生体イメージング装置を用いた、pXY陽性癌細胞の進展をイメージングし (Morita et al., 2016)、同時に全血あるいは血清での測定を試み、pXYの生物学的あるいは臨床的な意義を検討する。

<引用文献>

- ① Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue CA、Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer、Nature、467 巻、2010、1114-1117
- ② Morita N, Haga S, Ohmiya Y, Ozaki M、Long-term *ex vivo* and *in vivo* monitoring of tumor progression by using dual luciferases、Analytical Biochemistry、497 巻、2016、24-26

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 直樹 (MORITA, Naoki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域生物プロセス研究部門・総括研究主幹

研究者番号： 60371085

(2)研究分担者

芳賀 早苗 (HAGA, Sanae)

北海道大学・大学院保健科学研究院・特任

講師

研究者番号： 60706505

(3)連携研究者

奥田 徹哉 (OKUDA, Tetsuya)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号： 20443179

野田 なつみ (NODA, Natsumi)

北海道大学・大学院保健科学研究院・助教

研究者番号： 30624358

(平成 27 年度まで)

(4)研究協力者

尾崎 倫孝 (OZAKI, Michitaka)