

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15492

研究課題名(和文)可視化システムを用いた膵癌幹細胞の特異的分子同定と臨床病理学的解析

研究課題名(英文)Clinicopathological analysis and investigation of molecular mechanism of pancreatic cancer stemness using visualizing system.

研究代表者

上田 浩樹 (Ueda, Hiroki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・レジデント

研究者番号：40750071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膵神経内分泌腫瘍(PNET)のがん幹細胞性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。PNETで遺伝子変異の頻度が高く、変異群で予後が悪いことが報告されているエピゲノム構成因子Xについて、PNET細胞株に遺伝子Xのノックダウン、ノックアウトを行ってin vitro、in vivoで幹細胞性との関連性を調べた。XはPNETにおいて腫瘍抑制的に機能し、X/H3.3複合体はH3K9me3を亢進させることで標的遺伝子Yの発現を抑制していた。Xの低発現と標的遺伝子Yの高発現の組み合わせはPNETの有用なバイオマーカーとなり、治療の標的になりうると思われた。

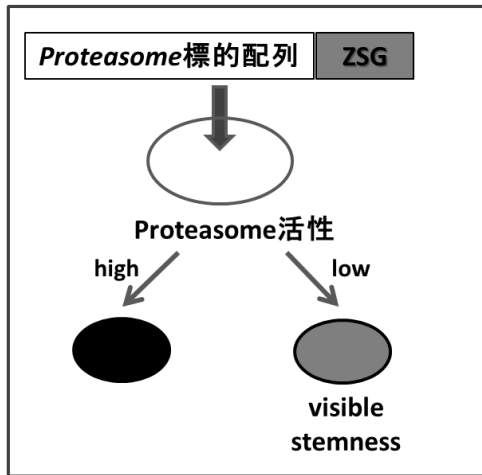
研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the molecular mechanism of cancer stemness in pancreatic neuroendocrine tumors (PNET). Frequent somatic mutations and loss of an epigenetic gene 'X' protein expression with malignant progression have been found in PNET. We evaluated the relationship between X expression and clinicopathological features in PNET. X-knockdown and X-knockout PNET cells were analyzed for in vitro and in vivo. X plays as a tumor suppressor and X/H3.3 complex suppresses target genes by promoting H3K9me3 in PNET. Combination of X loss and its target gene Y overexpression might be effective biomarkers and therapeutic candidates.

研究分野：肝胆膵領域の悪性疾患

キーワード：膵癌 膵神経内分泌腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

癌難治性の原因の一つはその多様性にある。癌組織にも幹細胞性を示す細胞群の内存在が示され heterogeneity の根源となることが報告されているものの、その動態や局在には不明な点が多い。



我々はユビキチン非依存のプロテアソーム標的的部位である ODC-C 末端 37 アミノ酸 (degron sequence) と蛍光蛋白 (ZsGreen) の融合遺伝子をウイルスベクターを用いてヒト膵癌細胞株に導入した。セルソーターにより ZsGreen 陽性細胞 (以下 CSC<sup>high</sup>) を抽出することで様々な実験への応用が可能となった (Gastroenterology 2012)。

膵癌は難治性の代表的な悪性腫瘍として早急に新治療の開発が望まれているが、膵神経内分泌腫瘍 (以下 PNET) も全膵臓腫瘍の 1-3% を占める悪性度の高い腫瘍である。PNET の遺伝子解析により、MEN1 などの遺伝子異常が検出されたが、PNET におけるこれら遺伝子異常の分子機構は未だに解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では (A) 膵癌と PNET の幹細胞性の分子メカニズムを明らかにすること、さらに (B) PNET で遺伝子変異の頻度が高く、変異群で予後が悪いことが報告されているエピゲノム構成因子 X (Gastroenterology 2014) について、幹細胞性との関連性を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(A) 上記の可視化システムを PNET 細胞株に導入した。

(B) X の免疫組織化学染色 (IHC) を行い、蛋白質発現と臨床病理学的因子との関連を検討した。発現低下した症例は遺伝子 X の変異についてシーケンス解析した。さらに X の siRNA をトランスフェクションしてノックダウン (KD)、また CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウト (KO) させた PNET 細胞株を用いて機能解析を行い、microarray 解析および X、ヒストン H3.3、H3K9me3 のクロマチン免

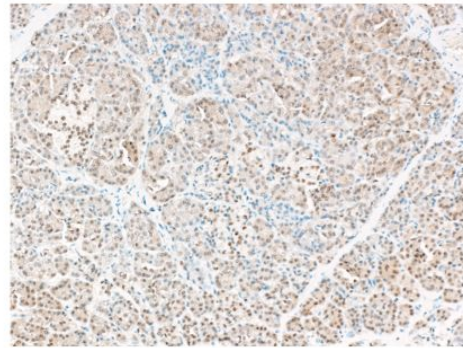
疫沈降法 (ChIP) にて標的遺伝子を探索した。

### 4. 研究成果

(A) PNET の癌幹細胞モデルとして CSC<sup>high</sup> を抽出した。現在実験継続中であり、in vitro で CSC<sup>high</sup> と CSC<sup>low</sup> に対して、膵癌での実験系同様に遺伝子発現や DNA のメチル化解析を行う。結果を統合し、PNET の幹細胞特異的遺伝子候補を抽出し、Western blotting および免疫細胞染色によって蛋白発現および局在を解析し特異的分子群を同定する。in vivo では NOD SCID マウスに CSC<sup>high</sup> 細胞を接種し、膵腫瘍モデルを作成する。CSC<sup>high</sup> 細胞と CSC<sup>low</sup> 細胞での腫瘍造成能力を比較検討する。

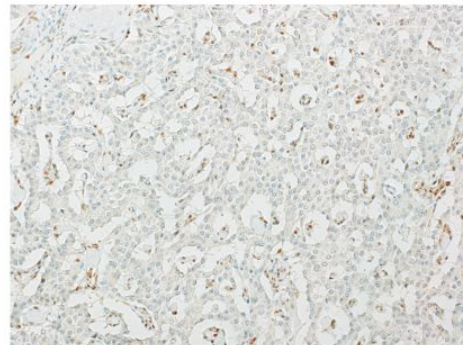
(B) IHC で X は腫瘍細胞の核と非腫瘍部の腺房細胞、ランゲルハンス島などに発現していた。 (Figure 1.)

Figure 1.



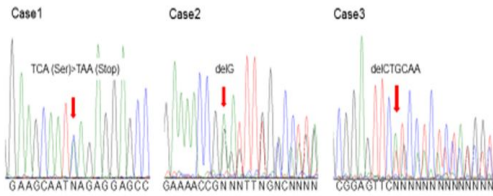
44 例中 12 例 (27.3%) は X 低発現 (Figure 2.) であり、これらは非機能性腫瘍に多く、Ki67 値が高く、WHO 分類 G2 が多かった (p<0.05)。

Figure 2.



X 低発現症例では無増悪生存期間 (PFS) が悪く (p=0.03)、同時性肝転移が多い傾向であった。よって X 低発現の PNET はより悪性度が高い可能性が考えられた。また X 低発現 12 例中 4 例 (変異 3 例とヘテロ接合性消失 1 例) で遺伝子変異が認められた。 (Figure 3.4.)

Figure 3.



X-KD 細胞はコントロール(NC)細胞に比べて細胞増殖、移動能、浸潤能に差を認めなかったが、スフェア形成能が亢進していた ( $P < 0.01$ )。Microarray 解析では KD 群で 81 遺伝子が NC 群より 2 倍以上発現亢進し、96 遺伝子が 2 倍以下に発現低下していた。

樹立した X-K01、K02 株は野生(WT)株と比べてスフェア形成能が亢進した。さらに X-KD 細胞で発現上昇した上位 15 遺伝子中 13 遺伝子は KO 株でも同様に発現上昇を認めた。KD/KO 細胞で共通した 13 遺伝子における ChIP 解析の結果、X は X-WT 株において全 13 遺伝子のプロモーター領域に結合していたが、X-KO 株では認められなかった。7 遺伝子のプロモーター領域で H3.3 レベルは WT 株で高く、KO 株で低かった。この領域での H3K9me3 レベルは、5 遺伝子において WT 株が高かったが、KO 株では低かった。

上記 5 遺伝子中 4 遺伝子について siRNA を用いて KD した結果、X 欠失によって亢進したスフェア形成能は Y の KD のみで減少した。皮下腫瘍モデルでは X-KO 群で腫瘍造成能を亢進させた。また皮下腫瘍では X と Y の蛋白質発現は逆相関を示した。ヒト臨床検体における Y 蛋白質発現は 44 例中 32 例で陽性であった。X 発現との有意差は認めなかったが、X 発現が低かった 12 例中 11 例で Y は高発現であった。X 低発現かつ Y 高発現の症例は他の症例に対し再発率が高かった ( $p = 0.018$ )。

X は PNET において腫瘍抑制的に機能し、X/H3.3 複合体は H3K9me3 を亢進させることで標的遺伝子の発現を抑制していた。X と標的遺伝子 Y は PNET の有用なバイオマーカーとなり、治療標的になりうると考えられた。現在雑誌論文投稿準備中である。

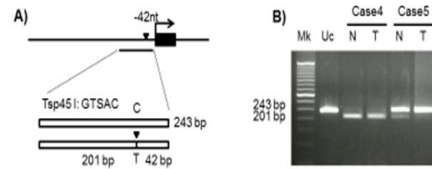
#### 5. 主な発表論文等

(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 0 件)

なし

Figure 4.



〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

上田 浩樹 (Ueda, Hiroki)

国立研究開発法人国立がん研究センター

・中央病院

・レジデント

研究者番号: 40750071

##### (2) 研究分担者

田中 真二 (Tanaka, Shinji)

東京医科歯科大学

・医歯(薬)学総合研究科

・教授

研究者番号：30253420

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )