

令和元年6月6日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07096

研究課題名(和文) LIM蛋白ZNF185-上皮間葉転換機構のヒト膵癌肝転移マウスモデルを用いた解析

研究課題名(英文) The analyses of epithelial-mesenchymal transition associating with LIM protein family ZNF185 using in vivo liver metastasis mouse models of the human pancreas cancer.

研究代表者

古川 大輔 (FURUKAWA, Daisuke)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：70459478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膵癌マウス肝転移モデルを用いて、膵癌肝転移・浸潤における分子制御機構を解析した。細胞内発現・腫瘍内発現を解析し、腫瘍先端部のZNF185細胞膜発現パターンが腫瘍浸潤能を反映するマーカーであることを発見し、臨床データをもって確認した。また、がん患者由来ゼノグラフト(PDX)を用い、インタラクトーム解析を行った。膵癌の相互作用プロファイルは非常に多様性があった。個別化医療に対応するPDXの樹立には、ヒトリンパ球増殖状態(LPL)の発生による失敗がある。LPLにはLymphotoxin-alpha関連相互作用が強いことを発見し、FK506等の薬剤にてLPLの増殖を抑えることが出来た

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は早期に遠隔転移する難治性腫瘍の代表であり、転移性膵癌に対する有効な治療が求められている。我々が発見し、臨床的に確認した腫瘍先端部におけるZNF185細胞膜発現パターンが腫瘍浸潤能を示すマーカーであることは今後の膵癌の治療法決定に役立つものと考えられる。一方で膵癌相互作用プロファイルは非常に多様性があり、画一的な治療では成績向上は困難であり、即ち個別化医療の良好な適応となると考えられる。今回の研究成果は個別化医療に対応するPDXを効率的に樹立する点においても有用な結果が得られた。本研究は、PDXを用いた膵癌転移・浸潤機構のZNF185解析による個別化医療を実現させる可能性を示すものである

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the molecular biology of human pancreatic ductal carcinoma (PDC) during hematogenous metastasis using the experimental liver metastasis mice models. The membranous expression of ZNF185 at the periphery of cancer cell nests was an independent indicator of unfavorable prognosis in patients with PDC. We also performed interactome analyses using patient-derived xenograft (PDX) of PDC. Interactome analyses disclosed interactions between PDC cells and stroma and they were genomically diverse, thus the personalized medicine using PDX is suitable for PDC. During the PDX establishment process, the occurrence of transplantable lymphoproliferative lesion (LPL) that replaces the original tumor cells is the most problematic aspect. In our interactome results, LPLs occur due to a lymphotoxin-alpha-related mechanism. Controlling lymphotoxin-alpha related interactions by FK506 can suppress LPL and improve the establishment rate of PDX for personalized medicine of PDC.

研究分野：外科学

キーワード：ZNF185 膵癌 PDX インタラクトーム

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌(膵癌)は早期発見が今なお困難で死亡率の高い疾患である。最近の罹患率は男女とも5位以下(6-7位程度)でありながら死亡率では男女とも5位以内かつ年々増加傾向である。年間の罹患患者数は死亡者数(約30000人/年)と非常に近く、多くの患者が1年以内に死亡していることを示しており、今まさに膵癌、特に進行再発膵癌に対する有効な治療法が求められている。我々はこれまでに高精度・高効率のヒト癌肝転移モデルを確立し、高肝転移性癌細胞株のゲノム解析やプロテオーム解析などで遺伝子・蛋白発現等の変化を検出し、肝転移の機序解明に努めてきた(Matsuyama M, Chijiwa T, Furukawa D, et al., *Oncol Lett* 1,431-436, 2010)。これらの結果から LIM 蛋白ファミリーの1つである zinc finger protein-185 (ZNF185)は膵臓癌・大腸癌の高肝転移性細胞株に共通する分子の1つとして同定された。すでに大腸癌の臨床病理学的検討において潜在的な肝転移を検出するマーカーとして強い相関が認められることを報告している(Furukawa et. al., *Mol Clin Oncology* 2, 709-713, 2014; 特許出願申請済 2014-20527)。我々が膵癌転移関連分子として同定してきた ZNF185 は単なる癌転移マーカーではなく、癌細胞自体の活動性を反映する重要な機能蛋白であり、アンメットメディカルニーズの高い局所進行膵癌・転移性膵癌に対する画期的治療法の分子標的となる可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的はヒト膵癌細胞における ZNF185 発現機序と遠隔転移の関連を、ヒト癌マウス肝転移モデルにより詳細に解析し、その機序を明らかにし、進行膵癌の画期的な治療法開発の可能性を探ろうとするものである。

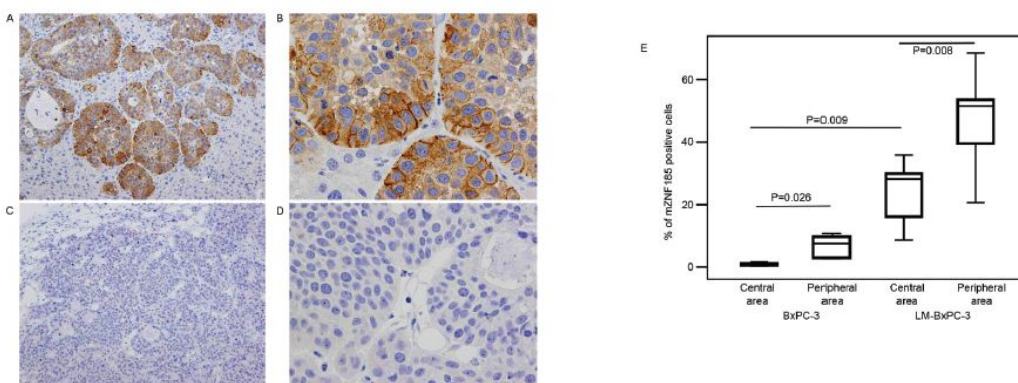
3. 研究の方法

ヒト膵癌 NOG マウス肝転移モデルを用いて低肝転移性膵癌株から高肝転移性細胞株を作成する。作出された実験的肝転移における ZNF185 等免疫組織化学的に解析し、ヒト膵癌ゼノグラフトにおける機能解析を行う。またヒト膵癌ゼノグラフトより mRNA を抽出しゲノム解析および網羅的相互作用解析(インタラクトーム解析)を実施する。膵癌転移機構に関連する相互作用の探索を行い、新規分子標的薬のターゲットあるいは個別化医療の実現の可能性を探る。

4. 研究成果

高肝転移性細胞株を作成しマウス肝転移モデルから肝転移巣を病理組織学手に解析した。膵癌細胞における ZNF185 発現には核内・細胞質・細胞膜と変化がありことをすでに発見していたが、さらに組織学的にも腫瘍中心部と辺縁部でも発現に違いがあることを発見した。高転移株における腫瘍巣辺縁部の ZNF185 細胞膜発現が有意に高かった。ZNF185 が膵癌転移浸潤にかかわる機能性蛋白であることが示唆された。

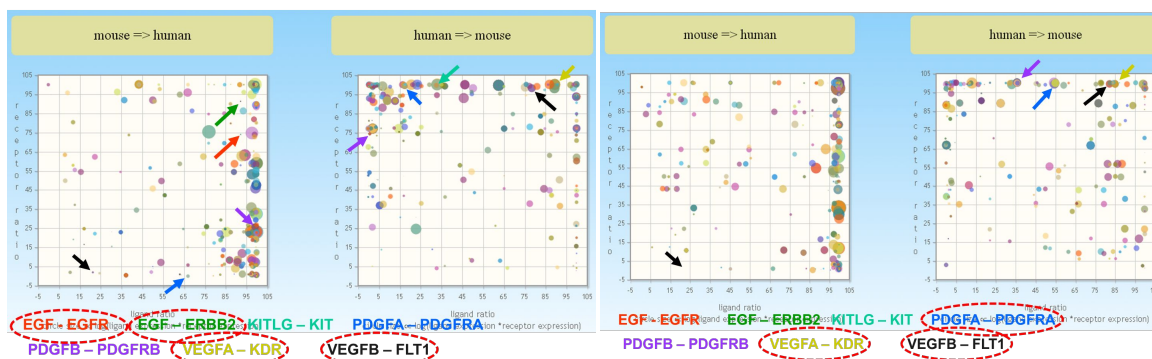
図1 実験的肝転移巣における ZNF185 腫瘍内発現の違い



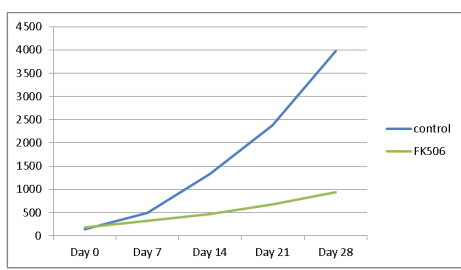
臨床症例に限りなく近いがん患者由来ゼノグラフト(PDX)用いた実験を行った。膵癌株 PDX10株をNOGマウスに移植し、生着した腫瘍から mRNA を抽出しゲノム解析結果およびインタラクトーム(相互作用)解析を行った。膵癌の相互作用プロファイルは非常に多様性があり、これまで我々が発表してきた大腸癌や肺癌とは大きく異なる結果であった(図2)。この膵癌の相互作用多様性が治療抵抗性、難治性の原因であることが考えられ、それゆえに個別化医療への応用が最適であると考えられた。膵癌 PDX の解析により、最も効果的な抗がん剤・分子標的薬の選択が可能となる。

図2 膵癌 PDX インタラクトーム結果(一部抜粋)

左 47 歳男性、右 70 歳男性。相互作用プロファイルには多様性があり、一定した傾向は認められなかった。



個別化医療に対応する PDX の樹立はまだまだ困難も多い。PDX 樹立失敗の一因にヒトリンパ球増殖状態(LPL)の発生がある。LPL-PDX のインタラクトーム解析結果により、Lymphotoxin-alpha 関連の強い相互作用を認めた。これらの相互作用を抑制する FK506 にて LPL の増殖を有意に抑制した(図3)。



	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
control (n=4)	134.0	491.3	1336.7	2382.9	3973.8
FK506 (n=5)	183.8	317.8	472.4**	676.9	940.0*

図3 FK506 による LPL-PDX 抑制実験

FK506 (1.0 mg/kg/day, 4 weeks)にて LPL の増殖を有意に抑制した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Furukawa D, Chijiwa T, Matsuyama M, Mukai M, Matsuo E, Nishimura O, Kawai K, Suemizu H, Nakagohri T, Yasuda S, Shimada K, Hiraoka N, Nakamura M. Plasma membrane expression of ZNF185 is a prognostic factor in pancreatic ductal carcinoma. Oncol let 14:3633-40, 2017 査読あり
2. Hashimoto H, Mizushima T, Chijiwa T, Nakamura M, Suemizu H. Efficient production of recombinant adeno-associated viral vector, serotype DJ/8, carrying the GFP gene. Virus Res 238: 63-68, 2017 査読あり
3. Hashimoto H, Mizushima T, Ogura T, Kagawa T, Tomiyama K, Takahashi R, Yagoto M, Kawai K, Chijiwa T, Nakamura M, Suemizu H. Study on AAV-mediated Gene Therapy for Diabetes in Humanized Liver Mouse to Predict Efficacy in Humans. BBRC 478:1254-60, 2016 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. Chijiwa T, Komura D, Haraguchi M, Hashimoto H, Suemizu H, Katayama M, Nakamura Y, Furukawa D, Isagawa T, Kato H, Moriya T, Ishikawa S, Nakamura M, Miyagi Y. Lymphotoxin-alpha plays key roles in lymphoproliferative lesions arising in patient-derived cancer. AACR Annual Meeting 2018 (国際学会)
2. Chijiwa T, Komura D, Haraguchi M, Noguchi A, Sato H, Ito H, Nakayama H, Katayama M, Miyao N, Matsui N, Tateishi Y, Suemizu H, Nakamura Y, Furukawa D, Isagawa T, Katoh H, Moriya T, Ishikawa S, Nakamura M, Miyagi Y. An interactome analysis for personalized chemotherapy using PDX/NOG models of non-small cell lung cancer. AACR Annual Meeting 2017 (国際学会)

3. Chijiwa T, Noguchi A, Komura D, Katayama M, Haraguchi M, Hashimoto H, Suemizu H, Nakamura Y, Furukawa D, Isagawa T, Katoh H, Moriya T, Ishikawa S, Nakamura M, Miyagi Y. The prevention of lymphoproliferative lesions arising in patient-derived cancer enografts by anti-graft-verss-host-disease agents. AACR Advances in Modeling Cancer in Mice: Technology, Biology, and Beyond 2017 (国際学会)

4. Chijiwa T, Komura D, Haraguchi M, Noguchi A, Sato H, Ito H, Nakayama H, Katayama M, Miyao N, Suemizu H, Nakamura Y, Furukawa D, Moriya T, Isagawa T, Katoh H, Ishikawa S, Nakamura M, Miyagi Y. The possibility of personalized chemotherapy for non-small cell lung cancer using interactome analyses of PDX/NOG models. ESMO Asia 2017 (国際学会)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

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)

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

6. 研究組織

(1)研究分担者

平岡 伸介 (HIRAOKA Nobuyoshi)

国立がん研究センター中央病院病理科科長

研究者番号: 40276217

河村 大輔 (KOMURA Daisuke)

東京医科歯科大学難治疾患研究所助教

研究者番号: 10776082

千々和 剛 (CHIJIWA Tsuyoshi)

自治医科大学医学部講師

研究者番号: 70642180

鈴木 涼平 (SUZUKI Ryohei)

自治医科大学医学部助教

研究者番号: 30621809

(2)研究協力者

中村 雅登 (NAKAMURA Masato)

東海大学医学部教授

研究者番号: 00164335