

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07962

研究課題名（和文）患者由来膵癌細胞を用いた分子標的としてのヒストン修飾機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of histone modification in patient-derived pancreatic cancer cells.

研究代表者

中井 陽介（Nakai, Yousuke）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80466755

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：エピゲノムとは、DNAの配列変化を伴わずに遺伝子転写を制御するDNAメチル化やヒストン修飾の総称であり、細胞分化、代謝状態や免疫応答と相互に関連し合うことから、多彩な機序で膵癌の性質に影響を及ぼしうる。本研究の目的は、樹立した患者由来膵癌細胞を用いて、膵癌細胞がその生存や増殖をaddictするヒストン修飾プロファイルを探査することである。同時に様々なエピゲノム阻害化合物に対する感受性をスクリーニングし、有効なエピゲノム制御因子の分子標的を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピゲノム修飾を標的とする薬剤は近年海外を中心に次々に開発され、一部の血液腫瘍ではすでにグローバルなDNAメチル化阻害薬（AZA）やHDAC阻害剤が臨床導入されている。ただし膵癌ではAZAやHDAC阻害薬の有効性は示されておらず、また様々なエピゲノム修飾酵素を阻害する特異的な分子標的薬の有効性についても未だ十分な検討はなされていない。その原因として、患者個々の膵癌細胞のエピゲノム解析が容易ではないことが一因である。今回我々は患者由来膵癌ゼノグラフトを用いた解析で、ヒト膵癌に有効なエピゲノム修飾阻害化合物を新たに同定した。本研究ではその有効性と分子学的機序について解析する。

研究成果の概要（英文）：Epigenetic regulation consists of DNA methylation or histone modification in affecting gene transcription. The system mutually relates to cellular differentiation, metabolic status or immune response, and so it governs the characteristics of pancreatic cancer cells. The purpose of this research is to unravel the profiles of histone modification to which pancreatic cancer cells addict for survival or growth. We further seek to find novel therapeutic candidates related to epigenetic regulation in pancreatic cancer cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌の”Big4” と呼ばれ共通で見られる遺伝子変異のうち *INK4A*, *TP53*, *SMAD4* の3つは機能喪失型であり、*KRAS* を含めたそれらのゲノム変異は膵癌の生物学的悪性度を規定できないことが知られている。つまり残念ながら膵癌のゲノム異常は治療標的とはなり難い。

特定の癌に対する分子標的薬の有効性は、その癌細胞における oncogene addiction を背景とするが、これは癌細胞が生存を依存する癌遺伝子変異の働きを阻害することに他ならない。一方で遺伝子変異のみならず、癌細胞は周囲の微小環境からの外部応答にさらされた結果、有利な遺伝子発現パターンを誘導するエピゲノムプロファイルを確立している可能性がある。エピゲノムとは、DNAの配列変化を伴わずに遺伝子転写を制御するDNAメチル化やヒストン修飾の総称であり、細胞分化、代謝状態や免疫応答と相互に関連し合うことから、多彩な機序で膵癌の性質に影響を及ぼしうる。

そのエピゲノム修飾を標的とする薬剤は近年海外を中心に次々に開発され、一部の血液腫瘍ではすでにグローバルなDNAメチル化阻害薬(AZA)やHDAC阻害剤が臨床導入されている。ただし膵癌ではAZAやHDAC阻害薬の有効性は示されておらず、また様々なエピゲノム修飾酵素を阻害する特異的な分子標的薬の有効性についても未だ十分な検討はなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、樹立した患者由来膵癌細胞を用いて、膵癌細胞がその生存や増殖を addict するエピゲノムプロファイルを探索することである。同時に様々なエピゲノム阻害化合物に対する感受性をスクリーニングし、有効なエピゲノム制御因子の分子標的を明らかにする。すでに本研究の先行データとしてCDK7 inhibitorの有効性を見出し、様々な患者由来膵癌細胞における有効性の再現性とその効果の分子機序について解析を行うことを目的とした。

現在の膵癌研究の殆どは既存のヒト細胞株およびマウスモデルを用いているが、患者個々の膵癌細胞のエピゲノムプロファイルは必ずしも共通ではなく、既存の細胞株では代用しえない。個々の膵癌が分子学的に層別化されうる重要性が示唆されることから(Nature 2012;91(7424):399, Nature 2015;518(7540):495)、膵癌細胞が addict しているエピゲノムと遺伝子発現プロファイルは患者個々に検討、層別化される必要があると考えられる。つまり本研究は、患者由来膵癌細胞を用いてそのエピゲノム addiction の実態を解析し、治療標的となりうるエピゲノム修飾酵素を探索する点で、十分な独自性と創造性を有すると考えられる。

### 3. 研究の方法

倫理委員会承認のもとで患者自身の微量検体を増幅培養し、その特性および腫瘍内多様性を維持したまま解析可能なPDX/PDOシステムを構築した。PDXとはPatient-derived Direct Xenograft、PDXはPDX-Derived Organoidの略であり、PDXは患者個々の原発巣の性質を良く再現・維持し、さらに *in vitro* でPDOとして培養された状態で

も原発巣の腺管構造をそのまま維持していた。さらにこの系では継代を経ても遺伝子変異に大きな差がないことを確認している。つまり PDX/PDO システムは患者各々の膵癌組織を用いた解析を可能とする。膵癌に有効なエピゲノム関連分子阻害薬を発掘するため、このヒト膵癌 *in vitro* PDO 培養系を用いた抗腫瘍効果のスクリーニングを行った。患者ごとの膵癌細胞の評価モデルを確立するうえでの困難な点として、膵癌は desmoplasia とよばれる間質増生に極めて富む特徴的な組織像を示すため、組織全体から抽出した DNA/RNA には周囲の腫瘍随伴性線維芽細胞や炎症細胞などに由来する DNA/RNA が多く混入し、膵癌細胞のみを選択的に解析することが容易でない点があげられる。その点では本研究で導入している *in vitro* の PDO システムは個々の患者由来の膵癌細胞が純化される点で大きなアドバンテージを有する。

#### 4. 研究成果

3 ラインのオルガノイドを対象に約 100 種類のエピゲノム因子阻害化合物のスクリーニングを行った結果、濃度 200nM の検討では大部分の化合物は単独での増殖抑制効果を示しなかったものの、3 ラインでいずれも抑制効果を認める化合物 1 ~ 4 を同定した。とくに化合物 3 については膵癌細胞と比較して正常線維芽細胞に対する増殖抑制効果が弱いことから、膵がん細胞特異的な増殖抑制効果を示唆すると期待された。

これら化合物の増殖抑制効果のメカニズムについては、DNA 合成阻害による増殖抑制の有無、あるいはアポトーシス誘導の有無などについて、増殖アッセイ、フローサイトメーターによる DNA 合成能評価、Caspase の活性化や cleaved PARP の増加の有無、TUNEL アッセイなどにより検討した。今回の研究では、とくに化合物 3 である CDK7 inhibitor に特に焦点を当て、その有効性と分子学的機序について解析した。

新規エピゲノム標的化合物の効果についてはその阻害対象となるエピゲノム分子のノックダウンを行い、同様の抑制効果が見られるかを調べることで作用の特異性を検証した。同時に阻害薬とノックダウンの両方で発現が変化する分子群を網羅的発現解析により抽出し、そのエピゲノム阻害薬の効果を担う下流の標的分子を明らかにした。上記で抽出された標的遺伝子候補については、その遺伝子プロモーターおよびエンハンサー領域のヒストン修飾プロファイルへの影響について、クロマチン免疫沈降などで解析した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito K, Isayama H, Nakai Y, Takahara N, Ishigaki K, Hamada T, Mizuno S, Sasaki T, Kogure H, Matsubara S, Yamamoto N, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Koike K.	4. 巻 37
2. 論文標題 A phase II trial of gemcitabine, S-1 and LV combination (GSL) therapy in patients with advanced pancreatic cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Invest New Drugs.	6. 最初と最後の頁 338-344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sano Makoto, Ijichi Hideaki, Takahashi Ryota, Miyabayashi Koji, Fujiwara Hiroaki, Yamada Tomoharu, Kato Hiroyuki, Nakatsuka Takuma, Tanaka Yasuo, Tateishi Keisuke, Morishita Yasuyuki, Moses Harold L., Isayama Hiroyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Blocking CXCLs-CXCR2 axis in tumor-stromal interactions contributes to survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma through reduced cell invasion/migration and a shift of immune-inflammatory microenvironment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-018-0117-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizuno Suguru, Isayama Hiroyuki, Nakai Yousuke, Ishigaki Kazunaga, Saito Kei, Sato Tatsuya, Takeda Tsuyoshi, Tateishi Keisuke, Tada Minoru, Shikata Nahoko, Tagami Tomoyuki, Kikuchi Shinya, Yamamoto Hiroshi, Yamakado Minoru, Koike Kazuhiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Diagnostic yield of the plasma free amino acid index for pancreatic cancer in patients with diabetes mellitus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 695 ~ 698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pan.2019.07.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Hiroaki, Tateishi Keisuke, Kato Hiroyuki, Nakatsuka Takuma, Yamamoto Keisuke, Tanaka Yasuo, Ijichi Hideaki, Takahara Naminatsu, Mizuno Suguru, Kogure Hirofumi, Matsubara Saburo, Nakai Yousuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 109
2. 論文標題 Isocitrate dehydrogenase 1 mutation sensitizes intrahepatic cholangiocarcinoma to the BET inhibitor JQ1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3602 ~ 3610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13784	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Kei, Isayama Hiroyuki, Sakamoto Yoshihiro, Nakai Yousuke, Ishigaki Kazunaga, Tanaka Mariko, Watadani Takeyuki, Arita Junichi, Takahara Naminatsu, Mizuno Suguru, Kogure Hirofumi, Ijichi Hideaki, Tateishi Keisuke, Tada Minoru, Hasegawa Kiyoshi, Fukayama Masashi, Kokudo Norihiro, Koike Kazuhiko	4. 巻 35
2. 論文標題 A phase II trial of gemcitabine, S-1 and LV combination (GSL) neoadjuvant chemotherapy for patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12032-018-1158-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Ryota, Ijichi Hideaki, Sano Makoto, Miyabayashi Koji, Mohri Dai, Kim Jinsuk, Kimura Gen, Nakatsuka Takuma, Fujiwara Hiroaki, Yamamoto Keisuke, Kudo Yotaro, Tanaka Yasuo, Tateishi Keisuke, Nakai Yousuke, Morishita Yasuyuki, Soma Katsura, Takeda Norihiko, Moses Harold L., Isayama Hiroyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Soluble VCAM-1 promotes gemcitabine resistance via macrophage infiltration and predicts therapeutic response in pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78320-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 KATO HIROYUKI, TATEISHI KEISUKE, FUJIWARA HIROAKI, IJICHI HIDEAKI, YAMAMOTO KEISUKE, NAKATSUKA TAKUMA, KAKIUCHI MIWAKO, SANO MAKOTO, KUDO YOTARO, HAYAKAWA YOKU, NAKAGAWA HAYATO, TANAKA YASUO, OTSUKA MOTOYUKI, HIRATA YOSHIHIRO, TACHIBANA MAKOTO, SHINKAI YOICHI, KOIKE KAZUHIKO	4. 巻 17
2. 論文標題 Deletion of Histone Methyltransferase G9a Suppresses Mutant Kras-driven Pancreatic Carcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 695 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐野誠, 高橋良太, 伊地知秀明, 石垣和祥, 山田友春, 宮林弘至, 水野卓, 中塚拓馬, 田中康雄, 眞杉洋平, 森下保幸, 田中麻理子, 立石敬介, Harold L Moses, 小池和彦
2. 発表標題 VCAM-1阻害は膵癌の進展と癌関連血栓症/血栓塞栓症を抑制し予後に寄与する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sano M, Ijichi H, Ishigaki K, Takahashi R, Miyabayashi K, Tateishi K, Isayama H, Koike K
2. 発表標題 Plasma ANP and soluble cell adhesion molecule X are novel risk factors for pancreatic cancer-associated thrombosis
3. 学会等名 AACR Special Conference on Pancreatic Cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本恵介, 立石敬介, 加藤裕之, 藤原弘明, 伊地知秀明, 佐野誠, 田中麻理子, 有田淳一, 白田龍之介, 石垣和祥, 齊藤圭, 齋藤友隆, 高原楠晃, 水野卓, 木暮宏史, 中井陽介, 多田稔, 長谷川潔, 伊佐山浩通, 小池和彦
2. 発表標題 膵癌patient derived xenograft(PDX)を用いた薬剤感受性の検討
3. 学会等名 第50回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤原 弘明  (Fujiwara Hiroaki)  (00814500)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員    (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	立石 敬介  (Tateishi Keisuke)  (20396948)	東京大学・医学部附属病院・講師     (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関