

平成 22 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究( B )

研究期間：2007～2009

課題番号：19390106

研究課題名(和文) ヒト膵臓がんに対する分子診療標的の同定

研究課題名(英文) Identification of molecular targets for human pancreatic cancer

研究代表者

古川 徹 (FURUKAWA TORU)

東京女子医科大学・国際統合医科学インスティテュート・教授

研究者番号：30282122

研究成果の概要(和文): 膵臓がんに対し有効な新規分子診療標的を同定するために、MAPK の下流標的遺伝子群を対象に RNA 干渉法を用いた網羅的機能スクリーニングを行い、発現抑制によってがん細胞の生存増殖、造腫瘍性を強く抑制する分子を治療標的に有用な分子として同定した。がん細胞特異的に高発現を認める分子を血清中に検出するシステムを構築し、膵腫瘍患者血清で高値を示す血清診断マーカーの候補分子を同定した。治療標的に有効な短 2 重鎖 RNA 配列を「膵臓がん治療用の組成物」として特許出願した。

研究成果の概要(英文): To identify novel diagnostic and therapeutic molecular targets for pancreatic cancer, we carried out RNA interference-mediated systemic knockdown screening of downstream targets of MAPK, which led us to identify novel therapeutic molecular targets repressing survival, proliferation, and tumorigenesis of pancreatic cancer cells. We constructed a detection system in serum for overexpressed molecules in pancreatic cancer and found a candidate serum diagnostic marker that was elevated in patients' serum. Short RNA interference sequences specific for the therapeutic target molecules were filed for a patent application.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、人体病理学

キーワード：分子病理、がん、膵臓

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは我国において粗罹患数が 2000 年度 20045 と、胃がん 102785、大腸がん 92137、肺がん 67890、肝臓がん 40053 に次いで第 5 位、粗死亡数においては 2000 年度 19093 と、肺がん 53722、胃がん 50647、大腸がん 35946、肝臓がん 33979 に次いで第 5 位となっている。

上記粗罹患数と粗死亡数の対比で明らかのように膵臓がんは極端に予後不良であり、5 年相対生存率は 5.5%と、大腸がん 64.6%、胃がん 58.8%、肺がん 19.9%、肝臓がん 17.1% に比して極端に低い。罹患数は激増しており、この 25 年間に 3 倍強となっている(国立がんセンターがんの統計より)。さらには、患

者の平均余命は平均で1年半程度であり、疼痛、黄疸、消化機能不全等伴って、苦痛が極めて大きい。これらの事実は膵臓がんが医学医療上極めて大きな問題であり、現在に至ってもなお膵臓がんに対しては予防、診断、治療の何れに関しても効果的な方法がないことを示している、早急に有効な診療方法を開発することが求められている。近年、がんの診療においてはがん発生進展の分子機構をふまえた分子診療戦略が有望であることが示されているが膵臓がんに対しては有効な分子診療法は未だ知られていない。新規分子診療法の開発には膵臓がん発生進展の詳細な分子機構の解明が必要で、それによって膵臓がんの予防、診断、治療に有用な分子を同定することができると考えられる。本研究代表者はこの戦略に沿って、これまでに膵臓がんにおける分子異常の網羅的解析を行い、膵臓がんにおいてはKRASの突然変異とDUSP6の発現異常による機能低下がMAPKの恒常的活性化をもたらす、発生進展に重要な役割を果たしていることを明らかにした。活性化MAPKは種々の遺伝子発現を誘導するが、それら誘導遺伝子群が実際に膵臓がんの悪性形質を担っているものと考えられる。よってそれらMAPK下流遺伝子群を網羅的に解析して同定したところ、実際にMAPK遺伝子群にはDNA複製、細胞回転、信号伝達系等、膵臓がん細胞の生存増殖に必須の遺伝子が多数含まれていた。これらMAPK下流遺伝子群を機能的にスクリーニングすることにより分子診療標的として有用な分子を同定することができるとの着想から本研究を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究代表者の研究のゴールは膵臓がん発生進展の分子機構の解析から膵臓がんの予防、診断、治療に有用な分子を見だし、それを利用した膵臓がんに対する新規分子診療法を開発することにある。本研究課題においては、これまでに同定したMAPK1誘導遺伝子を系統的にRNA干渉法によりノックダウン(発現抑制)しその表現型を解析することにより膵臓がん細胞の増殖、腫瘍形成における役割を明らかにし、発現動態の詳細な検討による診断マーカーとしての可能性、また、ヒト膵臓がん細胞移植マウスモデルを用いた腫瘍形成抑制・治療実験による治療標的としての可能性を検討して、膵臓がんの新しい診療法確立につながる分子標的を同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) MAPK1下流標的遺伝子の網羅的ノックダウンスクリーニング

これまでに同定した膵臓がんにおけるMAPK1下流の標的遺伝子79遺伝子

(Oncogene 25:4831-39, 2006)を膵臓がん培養細胞において*in vitro*でRNA干渉法にて網羅的に発現抑制し、増殖活性をスクリーニングして増殖抑制効果の強いものを同定する。77遺伝子それぞれに対して特異的なshort interference RNA (siRNA)をOff-target効果を最小限にするソフトウェアで設計し、作成する。RNA干渉法の手順は既報(Cancer Res 65:2899-905, 2005)に従う。増殖活性のスクリーニングはMTT法により前述既報に従って行う。増殖抑制効果の強いものに対して検証のため異なる遺伝子配列を標的としたsiRNAおよびshort hairpin RNA (shRNA)を発現するベクターを作成し、MTT法、colony formation解析実験を前述既報に従って行う。全体の10-15%程度を目標に遺伝子を絞り込むが特に機能未知あるいは新規遺伝子に着目する。

### (2) 遺伝子発現解析

MAPK関連分子について定量PCR法、免疫染色法により膵臓がん組織における定量、局在を検索する。新規分子については遺伝子(cDNA)クローニング、特異抗体の作成を行って解析する。

### (3) 遺伝子機能の解析

同定したMAPK下流標的候補分子について以下により機能解析を行い、がん細胞の生存、増殖、造腫瘍性における機能について明らかにする。ノックダウンによる効果を細胞回転の変化について解析する。組み替えタンパク質発現による細胞内局在を細胞機能に関連して解析する。信号伝達系抑制による変化する蛋白発現について解析する。

### (4) 分子標的診断、治療の実験的検討

がん組織内発現が特異的かつ高度な分子について血清診断マーカーとしての可能性を検討するため血清中の標的分子検出系をELISAで構築し、血清濃度を解析する。標的分子特異的siRNAを用い、膵臓がん細胞移植マウスゼノグラフトモデルにおいてMAPK下流標的候補分子ノックダウンによる抗腫瘍効果について直接注入法、静脈内投与法により抗腫瘍効果の解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) MAPK1下流標的遺伝子の網羅的ノックダウンスクリーニング

MAPK下流標的遺伝子79遺伝子に対し、個別に特異的なsiRNAを設計合成し、*in vitro*において膵臓がん培養細胞に導入して標的遺伝子の発現抑制を行った。結果、標的とする遺伝子の発現抑制により細胞増殖は種々の程度に抑制された(図1)。同一遺伝子に対する異なる配列のsiRNAを用いても同様の増殖抑制効果が得られることを確認した。さらに、持続的抑制効果を検証するためshRNAを発現するベクターを構築し、それを導入して細胞のコロニー形成能を検討した結果、標

の抑制により強いがん細胞生存阻害効果を認めた(図2)。正常細胞に対する効果を検索するため正常膀胱上皮細胞 HPDE (Dr. Tsao, Ontario Cancer Center/Princess Margaret Hospital, Toronto, ON, Canada の好意により供与)をもちいて siRNA による遺伝子ノックダウンの効果を解析した結果, 正常細胞では増殖抑制効果のがん細胞に比べて弱かった(図3)。候補表的分子に対する shRNA ベクターを恒常的に発現するがん細胞クローンを作成し, ノドマウス皮下に移植して雑腫瘍能を検討した結果, 標的分子の発現抑制により造腫瘍性が低下することを見出した(図4)。以上より, MAPK 下流遺伝子群から発現抑制によりがん細胞特異的に増殖抑制効果を示す遺伝子群を同定した。

図1: In Vitro Cell Proliferation Assay

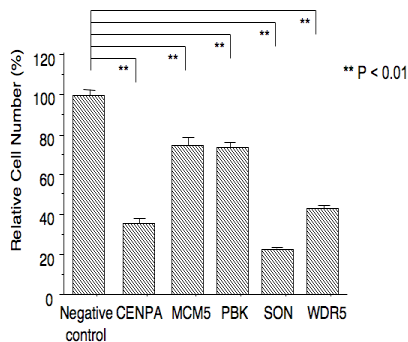


図2: Colony Formation Assay

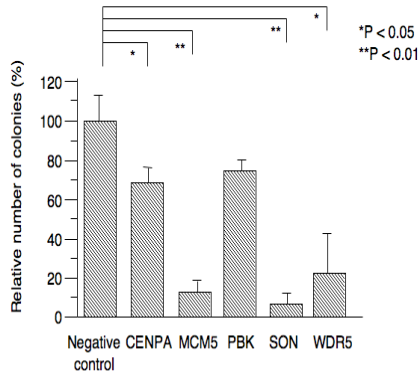


図3: In Vitro Cell Proliferation Assay

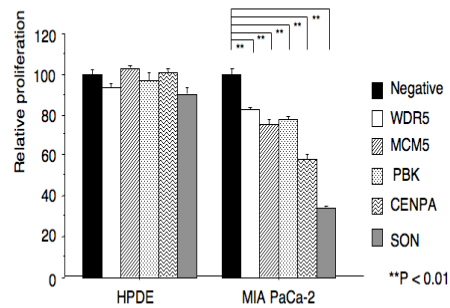
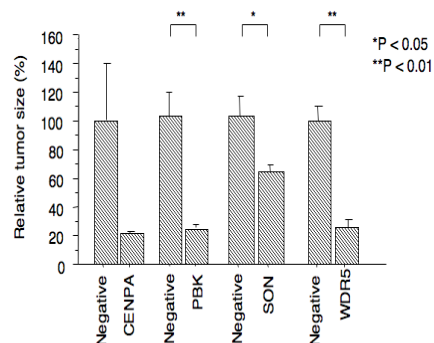


図4: In Vivo Tumorigenesis Assay



(2) 候補分子診療標的の発現解析

MAPK 下流分子群において培養がん細胞で発現が高いものについて組織内発現を解析し, 幾つかで組織内がん細胞特異的に発現が高いものを見出した。また, 一部分子の発現は臨床病理情報と関連していた。

(3) 同定分子標的候補の機能解析:

遺伝子ノックダウンの細胞回転に対する効果について解析し, 分子により G0/G1 期停止, G2/M 期停止, アポトーシス型細胞死が認められた。 GFP 結合蛋白発現ベクターを構築し, 細胞内局在と相互作用関連分子について検討し, 核内スペckルパターンを示す分子とその関連分子との関係を明らかにした。また, 同分子が細胞分裂時には細胞質内にび漫性に移行することを見出した。 MAPK 活性不活化により発現が変化する蛋白をプロテオーム法により網羅的に検索し, 特異的に変化する蛋白を複数同定した。

(4) 分子標的診断, 治療の実験的検討

組織内発現でがん細胞特異的に発現が高い分子について ELISA による血清内蛋白検出システムを構築し, 標的分子の血清内濃度を膀胱腫瘍患者、非腫瘍患者血清について測

定した。結果，がん患者において血清濃度高値を示すことがある分子を見出した。

2 本鎖干渉 RNA を用い，マウスゼノグラフィモデルにおいて *in vivo* での MAPK 下流標的候補分子の抗腫瘍効果について直接注入法，静脈内投与法により抗腫瘍効果の解析を行った結果，腫瘍縮小傾向を認めたが統計学的有意差を認めるには至らなかった。投与方法をさらに工夫する必要があった。本研究の結果，膵臓癌治療に有用な新規分子標的として，SON, PBK, CENPA, WDR5, MCM5 を同定し，各々に対し有効な短 2 重鎖 RNA 配列を「膵臓がん治療用の組成物」として特許出願した(特願 2009-229503)。

#### 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 35 件)

Furukawa T, Hatori T, Yamamoto M,  
(他 9 名, 1 番目). Non-invasive and minimally invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Pathology Case Rev*, 査読有、*in press*

Kuboki Y, Hatori T, Yamamoto M, Furukawa T (他 4 名, 8 番目). Association of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase with cystic neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol*, 査読有、*in press*

Higuchi R, Furukawa T, Yamamoto M (他 3 名, 5 番目). Prognostic Relevance of Ductal Margins in Surgery of Bile Duct Cancer. *Surgery* 査読有、*in press*

Oishi H, Furukawa T, (他 6 名, 6 番目). Blockade of DLL4 signaling inhibits both growth and angiogenesis of pancreatic cancer. *Pancreas* 査読有、*in press*

Hatori T, Furukawa T, Yamamoto M,  
(他 2 名, 4 番目).

Duodenum-preserving total pancreatectomy for pancreatic neoplasms. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 査読有、*in press*  
Tabata T, Furukawa T, (他 10 名, 6 番目). RNA Interference Targeting against S100A4 Suppresses Cell Growth and Motility and Induces Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、390:475-80, 2009

Ogawa T, Furukawa T, (他 5 名, 2 番目). A cDNA microarray analysis identifies 52 genes associated with cis-diamminedichloroplatinum susceptibility in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 査読有、*In press*

Yamaguchi H, Hatori T, Yamamoto M, Furukawa T, (他 18 名, 22 番目). Intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas distinct from pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 査読有、Vol. 33, 2009, 1164-72.

Sasaki Y, Furukawa T, (他 6 名, 6 番目). Molecular events in human T cells treated with diesel exhaust particles or formaldehyde that underlie their diminished interferon-gamma and interleukin-10 production. *Int*

Arch Allergy Immunol 査読有、Vol. 148, 2009, 239-50.

Lefter LP, Furukawa T, (他 7 名, 4 番目). Transcriptional silencing of ETS-1 efficiently suppresses angiogenesis of pancreatic cancer. Cancer Gene Ther 査読有、Vol. 16, 2009, 137-48.

Ishigaki S, Hatori T, Furukawa T, (他 6 名, 5 番目). Insulinoma with six islet cell tumors associated with severe hypoglycemia. Inter Med 査読有、Vol. 48, 2009, 1041-6.

Furukawa T, Hatori T, Yamamoto M, (他 2 名, 1 番目). Intraductal tubular carcinoma of the pancreas: case report with molecular analysis. Pancreas 査読有、Vol. 38, 2009, 235-7.

Furukawa T. Molecular pathology of pancreatic cancer: Implications for molecular targeting therapy. Clin Gastroenterol Hepatol 査読有、Vol. 7, 2009, S35-9.

Furukawa T, (他 3 名, 1 番目). Feedback regulation of *DUSP6* transcription responding to MAPK1 via ETS2 in human cells. Biochem Biophys Res Commun 査読有、Vol. 377, 2008, 317-20.

Ishida M, Furukawa T, (他 13 名, 15 番目). Synchronous and metachronous extra-pancreatic malignant neoplasms in patients with intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. Pancreatology 査読有、Vol. 8, 2008, 577-82.

Chan DW, Furukawa T, (他 5 名, 5 番目). Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells.

Carcinogenesis 査読有、Vol. 29, 2008, 1742-50.

Ishida M, Furukawa T, (他 7 名, 3 番目). The PMAIP1 gene on chromosome 18 is a candidate tumor suppressor gene in human pancreatic cancer. Digest Dis Sci 査読有、Vol. 53, 2008, 2576-82.

Furukawa T. Molecular targeting therapy for pancreatic cancer: current knowledge and perspectives from bench to bedside. J Gastroenterol 査読有、Vol. 43, 2008, 905-11.

Ishida M, Furukawa T, (他 11 名, 13 番目). Characteristic clinicopathological features of the types of intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. Pancreas 査読有、Vol. 35, 2007, 348-52.

Ishida M, Furukawa T, (他 7 名, 3 番目). Elucidation of the relationship of BNIP3 expression to gemcitabine chemosensitivity and prognosis. World J Gastroenterol 査読有、Vol. 13, 2007, 4593-7.

21 Ishida M, Furukawa T, (他 8 名, 9 番目). Intraductal papillary-mucinous adenocarcinoma in the remnant pancreas after pancreaticoduodenectomy for cancer of Vater ' s papilla associated with

intraductal papillary-mucinous adenoma. J Hepatobiliary Pancreat Surg 査読有、Vol. 14, 2007, 522-5.  
22 Furukawa T. Molecular genetics of intraductal papillary-mucinous neoplasms. J Hepatobiliary Pancreat Surg 査読有、14 卷、2007, 233-7.

[学会発表](計49件)

Furukawa T., Tanji E. *SON* is a novel therapeutic target for pancreatic cancer. 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research Washington DC 2010. 4.17-21.

Furukawa T. Molecular pathology of pancreatic cancer: Implications to molecular targeting. The Joint 40th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan Pancreas Society. Honolulu 2009. 11. 4-7.

Furukawa T., Hatori T., Yamamoto M., (他14名,1番目) Prognostic relevance of morphologic types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. The Joint 40th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan Pancreas Society. Honolulu 2009. 11. 4-7

Furukawa T. Pancreatic carcinogenesis: Mechanisms and implications for diagnosis and therapy. Tokyo Symposium on Pancreatic Cancer. Tokyo 2009. 8.1.

[図書](計5件)

Furukawa T. Springer-Verlag GmbH & Co. KG, (Heidelberg) Cystic

neoplasms of the pancreas. Pathological aspects. In: Beger HG, Matsuno S, Cameron JL (eds) Disease of the pancreas. 2008, pp 839-842.  
Furukawa T. International Research and Educational Institute for Integrated Medical Sciences, Tokyo Women's Medical University (Tokyo) Targeting targets of MAPK to treat cancer. In: Nadal-Ginard B, Takakura K (eds) Future aspects of medical sciences and education "Challenge of integrated medical sciences." 2007, pp 136-138.

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 膵臓がん治療用の組成物

発明者: 古川 徹

権利者: 東京女子医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-229503

出願年月日: H21.10.1

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.twmu.ac.jp/IREIIMS/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 徹 (FURUKAWA TORU)

東京女子医科大学・国際統合医科学インスティテュート・教授

研究者番号: 30282122

(2) 研究分担者

高垣 洋太郎 (TAKAGAKI YOHTARO)

東京女子医科大学・国際統合医科学インスティテュート・教授

研究者番号: 50281324

眞崎 知生 (MASAKI TOMOO)

東京女子医科大学・国際統合医科学インスティテュート・教授

研究者番号: 60009991

山本 雅一 (YAMAMOTO MASAKAZU)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60220498

羽鳥 隆 (HATORI TAKASHI)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50208550