

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20779

研究課題名（和文）膵癌におけるZNF395発現低下の機能的意義の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of functional significance of ZNF395 downregulation and development of novel therapeutic strategy for pancreatic ductal adenocarcinoma.

研究代表者

黒木 秀作（Kurogi, Shusaku）

大分大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：50905213

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：これまでの研究において、膵上皮内癌が浸潤癌へと進展する際に、8p欠失に伴ってZNF395の発現が低下していることを見出し、ZNF395の発現低下は細胞周期の脱制御を介して細胞増殖能を亢進させることを明らかにした。本研究では、ZNF395の詳細な機能的意義の解明を目的とし、網羅的遺伝子発現解析によるZNF395関連シグナル経路の同定を試みた。その結果、ZNF395発現誘導によって発現が増加している遺伝子を4遺伝子（NDRG1、ARMCX6、DDIT4、ERCC5）同定した。今後は、これらの遺伝子とZNF395の関連性をさらに詳細に解析し、膵癌の新たな治療戦略としての可能性を検証していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は5年生存率が10%未満であり、最も予後不良な癌腫である。この極めて厳しい現状を打破するためには、今までにない革新的な治療法の開発が求められる。本研究では、膵癌の進展に関わる新規がん抑制遺伝子として見出したZNF395に着目し、ZNF395に関連しているがん抑制遺伝子候補を4遺伝子同定した。これらの遺伝子の中には、膵癌の浸潤、増殖、血管新生を抑制すると報告されている遺伝子もあり、新たな治療戦略の開発に重要な知見をもたらすと考えられる。本研究が発展すれば、膵癌の治療成績を改善することが期待でき、その社会的意義は極めて大きいといえる。

研究成果の概要（英文）：In our previous studies, we found that Downregulation of ZNF395 enhances cell proliferative potential and contributes to the progression of pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive carcinoma. In the present study, we attempted to identify the signaling pathways associated with ZNF395 by comprehensive gene expression analysis to elucidate the functional significance of ZNF395. As a result, four genes (NDRG1, ARMCX6, DDIT4 and ERCC5) were identified whose expression levels were associated with ZNF395. We currently analyze the association between these genes and ZNF395 and investigate their potential as a new therapeutic strategy for pancreatic cancer.

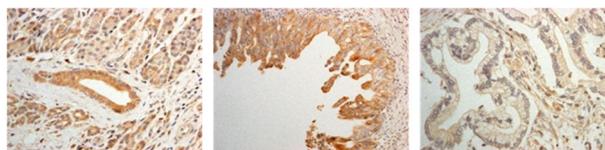
研究分野：分子病理学

キーワード：ZNF395 膵癌

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は国内で年間約 4 万人が罹患し、近年も増加傾向にある癌腫である。その 5 年生存率は 10%未滿と極めて低く、最も予後不良な難治癌と認識されている。この原因として、早期発見が困難なため根治的切除術が適応されない症例が多いことや、既存の抗癌剤が奏効しない症例が多いことが挙げられる。したがって、膵癌の浸潤に関わる分子メカニズムを解明することは、有効な早期診断法や新規治療法を開発するうえで重要である。

私は、膵癌組織内の上皮内癌部と浸潤癌部のゲノム異常を網羅的に解析してそれらを比較検討した。その結果、浸潤癌部では 8p が高頻度に欠失し、それに伴って ZNF395 の発現が低下していることを見出した(右図)。さらに、



正常膵管

上皮内癌

浸潤癌

ZNF395 の発現低下の機能的意義を調べ、以下のことを明らかにした (*Pathobiology*, 2021)。

- (1) 正常膵管や前癌病変に比べて浸潤癌では ZNF395 の発現が低下している。
- (2) ZNF395 の発現低下は G1 期の細胞周期制御を障害して細胞増殖を亢進させる。
- (3) ZNF395 の発現低下はストレス応答経路 (JNK と p38) を不活化し細胞増殖を亢進させる。

これらの知見は、膵癌において ZNF395 が増殖抑制に関与する新規がん抑制遺伝子であることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の 3 点である。

- (1) ZNF395 の発現低下に伴うストレス応答経路の不活化の意義を明らかにする。
- (2) ZNF395 の発現低下によって変動する細胞周期関連分子やシグナル経路を同定する。
- (3) ZNF395 関連分子を標的とした治療の有効性を検証し臨床応用の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) ZNF395 発現低下によるストレス応答 MAP キナーゼ経路不活化の意義

ZNF395 の発現誘導は、ストレス応答 MAP キナーゼである JNK を活性化して、細胞増殖能を抑制することを明らかにした。さらに、阻害剤を用いて JNK を不活化すると、抑制されていた増殖能が回復することを示した。これらの知見は、JNK の活性化が膵癌の治療法として応用できることを示唆する。本研究では、ZNF395 がどのようなメカニズムで JNK を活性化させるのかを明らかにするため、JNK の上流シグナルについて検討する。

同定したシグナル経路を構成する分子の中で、増殖能の抑制に最も重要な役割を担っている分子、あるいは、治療標的として最も効果が期待できる分子を、阻害剤や遺伝子ノックアウト細胞株を用いて明らかにする。

### (2) ZNF395 の発現・欠失に伴って変動する細胞周期関連分子やシグナル経路の同定

ZNF395 の誘導性発現細胞あるいはノックアウト細胞を樹立して、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析を行う。ZNF395 の発現亢進あるいは発現消失に伴って発現が変動する遺伝子群を抽出し、それらが担うシグナル経路の概要を得る。得られた候補分子やシグナル経路が、臨床検体においても発現や活性化レベルが変動していることを確認する。そして確認された分子を診断や治療の標的分子候補とする。

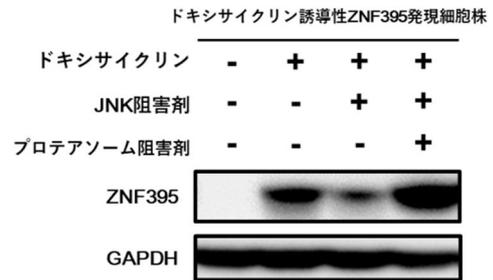
標的分子候補の中で、すでに特異的阻害剤や活性化剤が存在する分子があれば、その抗腫瘍効果を *in vitro* で検討する。特異的阻害剤や活性化剤がない分子の場合は、ノックアウト細胞株や発現誘導細胞株を樹立し、機能解析を行う。

- (3) 同所移植モデルを用いた ZNF395 の機能的意義の検証と新規標的治療法の基礎実験  
 ドキシサイクリン誘導性ZNF395発現膵癌細胞株とその親株をそれぞれ免疫不全マウス10匹に同所移植する。移植3週後からドキシサイクリンを投与する。投与2ヶ月後に全例犠死させ、ZNF395発現誘導による腫瘍の増殖能や転移能、生存期間の変化を観察する。  
 膵癌細胞株 (PANC-1, MIA-Paca2など) を免疫不全マウス25匹に同所移植する。移植3週後から候補治療薬を投与して (各薬剤につき5匹ずつ) 投与1ヶ月後に全例犠死させる。未治療群と比較することにより各治療薬の抗腫瘍効果と副反応について検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ZNF395 発現低下と安定化の分子機序

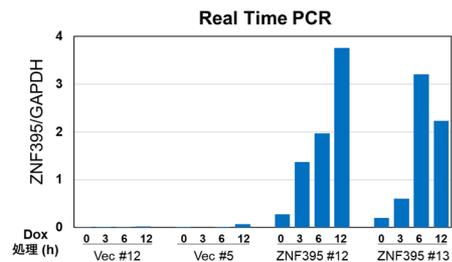
ZNF395 の発現低下は、ストレス応答 MAP キナーゼ経路の JNK の不活化をもたらし、これが増殖能の亢進に寄与することを見出した。また、JNK 阻害剤を用いて JNK を不活化すると ZNF395 の発現が低下し、その ZNF395 の発現低下はプロテアソーム阻害剤により回復することを明らかにした (右図)。以上の結果から、ZNF395 は JNK を



活性化すると同時に、JNK のフィードバック作用によってプロテアソームでの分解が回避され安定化し、細胞周期や細胞増殖の制御に関与していることが示唆された。

##### (2) ZNF395 発現低下によって変動するシグナル経路の同定

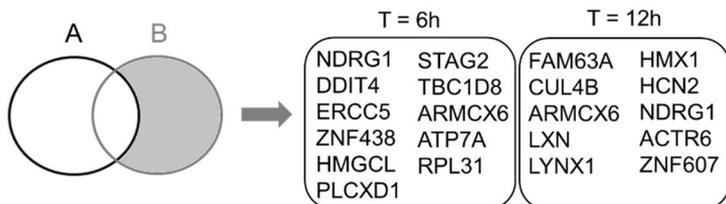
ドキシサイクリン誘導性に ZNF395 を発現する膵癌細胞株 (右図) を用いて、ZNF395 発現誘導前と誘導 6 時間後、誘導 12 時間後の RNA を回収し、網羅的遺伝子発現解析を施行した。コントロール細胞株としては、ドキシサイクリン誘導性に RFP を発現する細胞株 (2 株) を使用した。ZNF395 は転写因子として機能することが報告されていること

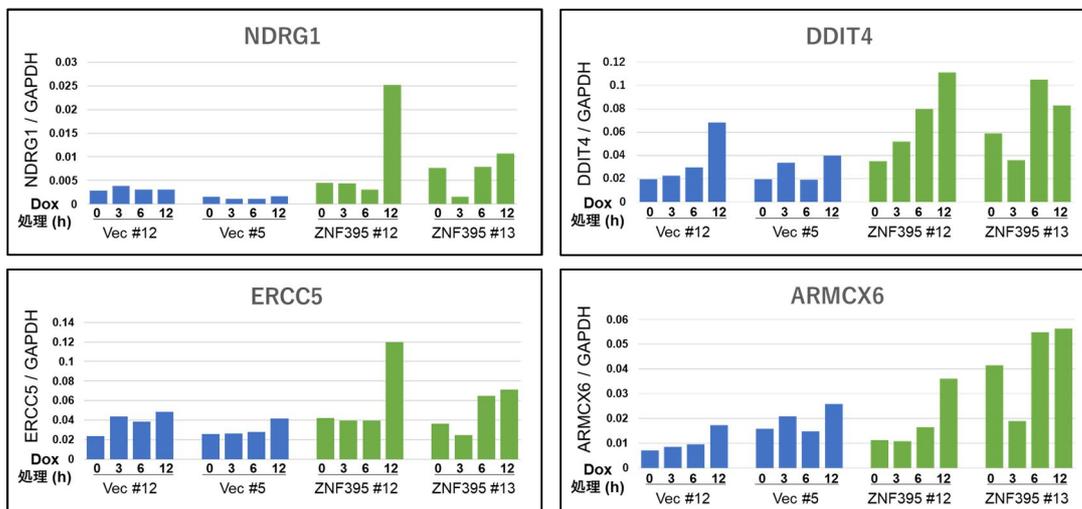


から、ZNF395 の発現誘導によって発現亢進する遺伝子に着目した。そして、ZNF395 発現誘導 6 時間後に発現が 4 倍増加した遺伝子を 11 遺伝子抽出し、ZNF395 発現誘導 12 時間後に発現が 4 倍増加した遺伝子を 10 遺伝子抽出した (右図)。これらのうち ZNF395 発現誘導 6 時間後と 12 時間後で共通して発現増加

**A: Vec #5, 12 (T=0) vs Vec #5, 12 (T=6h or 12h)**  
 4倍増加  
 Vec (T=6h or 12h) Raw  $\geq 3000$

**B: ZNF395 #12, 13 (T=0) vs ZNF395 #12, 13 (T=6h or 12h)**  
 4倍増加  
 ZNF395 (T=6h or 12h) Raw  $\geq 3000$





している遺伝子は2遺伝子 (NDRG1、ARMCX6) であった。また、抽出された19遺伝子について、リアルタイムPCR法によりバリデーションを実施し、ZNF395発現誘導によって発現が増加している遺伝子を4遺伝子 (NDRG1、ARMCX6、DDIT4、ERCC5) 同定した (上図)。これらのうちNDRG1は膵癌の浸潤、増殖、血管新生を抑制することや、大腸癌の転移を抑制すること、DDIT4はmTORパスウェイを抑制して癌細胞の増殖を抑制することが報告されている。今後は、これらの遺伝子とZNF395の関連性をさらに詳細に解析し、膵癌の新たな治療戦略としての可能性を検証していきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Amada Kohei, Hijiya Naoki, Ikarimoto Sawa, Yanagihara Kazuyoshi, Hanada Toshikatsu, Hidano Shinya, Kurogi Shusaku, Tsukamoto Yoshiyuki, Nakada Chisato, Kinoshita Keisuke, Hirashita Yuka, Uchida Tomohisa, 他10名.	4. 巻 114
2. 論文標題 Involvement of clusterin expression in the refractory response of pancreatic cancer cells to a MEK inhibitor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2189 ~ 2202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15735	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 Tsukamoto Yoshiyuki, Kurogi Shusaku, Shibata Tomotaka, Suzuki Kosuke, Hirashita Yuka, Fumoto Shoichi, Yano Shinji, Yanagihara Kazuyoshi, Nakada Chisato, Mieno Fumi, Kinoshita Keisuke, Fuchino Takafumi, Mizukami Kazuhiro, Ueda Yoshitake, Etoh Tsuyoshi, 他10名.	4. 巻 102
2. 論文標題 Enhanced phosphorylation of c-Jun by cisplatin treatment as a potential predictive biomarker for cisplatin response in combination with patient-derived tumor organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1355 ~ 1366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-022-00827-2	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 Kinoshita Keisuke, Tsukamoto Yoshiyuki, Hirashita Yuka, Fuchino Takafumi, Kurogi Shusaku, Uchida Tomohisa, Nakada Chisato, Matsumoto Takashi, Okamoto Kazuhisa, Motomura Mitsuteru, Fukuchi Satoshi, Sagami Ryota, 他10名.	4. 巻 103
2. 論文標題 Efficient Establishment of Bile-Derived Organoids From Patients With Biliary Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 100105 ~ 100105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.labinv.2023.100105	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 Kurogi Shusaku, Hijiya Naoki, Hidano Shinya, Sato Seiya, Uchida Tomohisa, Tsukamoto Yoshiyuki, Nakada Chisato, Yada Kazuhiro, Hirashita Teijiro, Inomata Masafumi, Murakami Kazunari, Takahashi Naohiko, Kobayashi Takashi, Moriyama Masatsugu	4. 巻 88
2. 論文標題 Downregulation of ZNF395 Drives Progression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma through Enhancement of Growth Potential	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 374 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000514593	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒木 秀作、泥谷 直樹、塚本 善之、中田 知里、猪股 雅史、小林 隆志、守山 正胤
2. 発表標題 ZNF395の発現低下はJNKの不活性化を介して膀胱癌細胞の増殖を促進する
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本 善之、柴田 智隆、麓 祥一、黒木 秀作、平下 有香、柳原 五吉、矢野 信次、中田 知里、泥谷 直樹、衛藤 剛、廣中 秀一、村上 和成、猪股 雅史、守山 正胤
2. 発表標題 c-Junリン酸化亢進はシスプラチン感受性と相関する
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------