

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592023

研究課題名(和文) 膵癌における新規治療抵抗性遺伝子の探索とその阻害剤による治療法の開発

研究課題名(英文) Novel strategy for the gene concerning chemoresistance in pancreas cancer

研究代表者

國料 俊男 (KOKURYO, TOSHIO)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：60378023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：TPX2は微小管形成や細胞周期に関連するタンパクであり、いくつかの悪性腫瘍での発現が報告されている。TPX2はヒト膵癌由来細胞株および膵癌切除標本において発現亢進していた。TPX2 siRNAはヒト膵癌細胞株において細胞増殖の抑制が可能であり、マウス皮下発癌モデルにおいても抗腫瘍効果を認めた。Insulin like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)は、TPX2 siRNA投与群で発現亢進を認めた。本研究によりTPX2の抑制による抗腫瘍効果には血管新生因子の1つであるIGFBP-3が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The targeting protein for Xklp2 (TPX2) is a microtubule- and, cell cycle-associated protein whose overexpression has been reported in various malignancies. TPX2 was overexpressed in both surgically resected specimens of pancreatic cancer and multiple pancreatic cancer cell lines. TPX2 siRNA effectively suppressed the proliferation of pancreatic cancer cells in culture, and the direct injection of TPX2 siRNA into subcutaneously implanted pancreatic cancer cells in nude mice revealed anti-proliferative effects. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) was significantly higher in TPX2 siRNA-treated tumors than in the Control siRNA-treated tumors. Our study revealed that the anti-angiogenic effect observed in TPX2 siRNA-treated pancreatic cancer cells may be partly explained by the upregulation of IGFBP-3.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：膵癌 治療抵抗性遺伝子 TPX2 IGFBP-3

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は、手術以外に根治を得ることができないにもかかわらず、局所浸潤や転移などのために切除不能になることが多く、極めて予後不良な難治癌である。近年、新たな癌治療薬が開発され、膵癌の治療においても臨床応用され(Ueno H, Br J Cancer 2009)手術不可能であった病変が縮小し手術可能となる症例を認めるようになった。しかし多くの症例では手術可能なレベルまで縮小せず、縮小したとしても、手術の待機中に再度増大し、手術不能となる場合がある。このような化学療法による効果の違いは、治療抵抗性を反映していると考えられる。治療抵抗性の解明により化学療法中の適切な手術時期が明らかになれば、手術の機会を逸することがなくなる。また術前化学療法として効果のない化学療法を行う必要もなくなる。

これまで治療抵抗性解明のために化学療法後の残存癌組織の遺伝子解析などが行われてきたが、癌細胞の選択性(selection: 抗癌剤の効かないもののみ残り、その後増殖してきた)や獲得性(acquisition: 抗癌剤の投与を契機に新たな特質として抵抗性を獲得し増殖してきた)などのメカニズムについては十分に解明されていない。これは遺伝子解析に用いた残存癌組織に問題があったと考えられる。化学療法後の残存癌組織の多くには線維化や免疫細胞の誘導など様々な修飾が加わり、そのままの残存癌組織の遺伝子解析には癌細胞以外の細胞の混入によるバイアスがかかっている。またレーザーキャプチャーマイクロダイセクションにて癌細胞のみを回収した場合でも、viability(生存能力)の検討ができないため、回収した細胞の中には、治療抵抗性を持ち今後増殖してくる生細胞と細胞死のプロセスにある死細胞が混在している。治療抵抗性の解明には、これらの問題点にとら

われない新たなアプローチによる研究が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では膵癌化学療法後に縮小した残存膵癌組織から新たなアプローチによりviability(生存能力)を有する癌細胞を分離し、網羅的遺伝子解析を行う。同定した新規治療抵抗性遺伝子を標的にした治療法の開発を行ない、膵癌の治療抵抗性を克服し生存期間を含めた治療成績を改善させることが、本研究の目的である

### 3. 研究の方法

#### 【膵癌組織の集積と保存】

名古屋大学医学部附属病院および愛知県がんセンター中央病院にて膵切除術施行された膵癌患者から正常膵組織と膵癌組織を収集した。

膵癌組織よりEpCAMをラベルしたMicroBeadsと磁気カラムを用いて癌細胞の単離を行ない、単離した癌細胞からDead Cell removal Kit (Miltenyi Biotec)を用いて死細胞を除去し、viability(生存能力)を持つ生細胞のみを分離した。

#### 【Gemcitabine耐性膵癌細胞株を樹立】

ヒト膵癌細胞株KLM1、Panc1、KP4に対してGemcitabine投与を行い、経時的に投与濃度を上昇させ、Gemcitabine耐性ヒト膵癌細胞株を樹立する。またこれら細胞株を用いてMTTアッセイによる増殖能の検討を行った。

#### 【OIP5に関する基礎的研究】

ヒト膵癌細胞株KLM1、Panc1、KP4でのOIP5の発現をreal timePCRにて検討した。

また名古屋大学医学部附属病院での膵癌症例70例でのOIP5の発現をreal timePCRにて検討した。

OIP5を標的にしたsiRNAを作成し、OIP5 siRNAによる遺伝子抑制効果について検討

した。またOIP5 siRNAの膵癌細胞株KLM1、Panc1、KP4へ導入し、増殖能(MTTアッセイ法)浸潤能(インベーションアッセイ法)、運動能(スクラッチアッセイ法)、アポトーシス誘導能(TUNEL法)を検討した。

#### 【TPX2に関する基礎的研究】

ヒト膵癌由来細胞株KLM1、KP4、panc1、PK45H、PK8、PK9、MIAPaca2、正常膵組織由来細胞株ACB R1515でのTPX2の発現をreal timePCRにて検討した。

名古屋大学医学部附属病院での膵癌症例70例でのTPX2の発現をreal timePCRにて検討した。

TPX2を標的にしたsiRNAを作成し、TPX2 siRNAによる遺伝子抑制効果についてreal timePCRにて検討した。

TPX2 siRNAの膵癌細胞株KLM1、KP4、panc1への導入後、増殖能(MTTアッセイ法)、浸潤能(インベーションアッセイ法)、運動能(スクラッチアッセイ法)、アポトーシス誘導能(TUNEL法)を検討した。

マウス皮下発癌モデルに対してTPX2 siRNAの腫瘍増殖抑制効果を検討した。

また腫瘍におけるTPX2発現、血管新生について検討した。

protein arrayによる血管新生に関する発現解析を行なった。

## 4. 研究成果

### 【膵癌組織の集積と保存】

名古屋大学医学部附属病院にて膵切除術施行された膵癌患者3例から正常膵組織と膵癌組織を収集した。膵癌組織より死細胞の除去により、viability(生存能力)を持つ生細胞の分離が可能であった。初代培養は可能であったが、継代はできず保存を行なった。

### 【Gemcitabine耐性膵癌細胞株を樹立】

膵癌細胞株KLM1のGemcitabineを含む培養液での継代培養により、1mMのGemcitabine

を含む培養液中でも生存可能な

Gemcitabine耐性膵癌細胞株KLM1を樹立した。MTTアッセイによる増殖能の検討で、樹立したGemcitabine耐性膵癌細胞株KLM1はGemcitabine投与下の環境においても通常の膵癌細胞株と同様の増殖能を有していた。

### 【OIP5に関する基礎的研究】

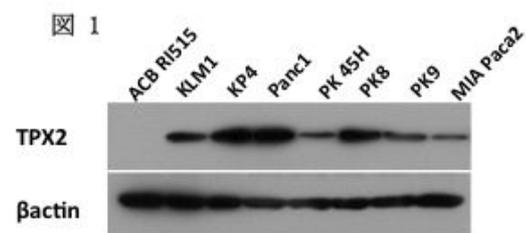
OIP5(Opa Interacting Protein 5)は、Cancer-testis Specific Geneとして知られている。OIP5はヒト膵癌細胞株KLM1、Panc1、KP4で高発現していた。また名古屋大学医学部附属病院での膵癌症例70例において、OIP5の発現は正常組織と比較して癌組織で有意に亢進していた。しかし予後との相関は認めなかった。

OIP5を標的に合成したsiRNAであるOIP5 siRNAは、ヒト膵癌細胞株KLM1、Panc1、KP4においてOIP5の発現抑制に有効であった。OIP5 siRNAは膵癌細胞株KLM1、Panc1、KP4において細胞増殖の抑制が可能であった。しかし、細胞死誘導能、浸潤能には有意差を認めなかった。

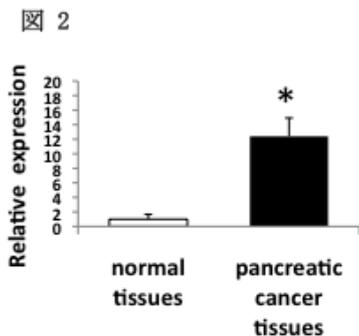
### 【TPX2に関する基礎的研究】

TPX2はAURORA Aキナーゼとの関連が報告されており、細胞分裂時の微小管形成や細胞周期に関連するタンパクである。いくつかの悪性腫瘍において発現抑制による抗腫瘍効果が報告されているが、作用機序は解明されていない。

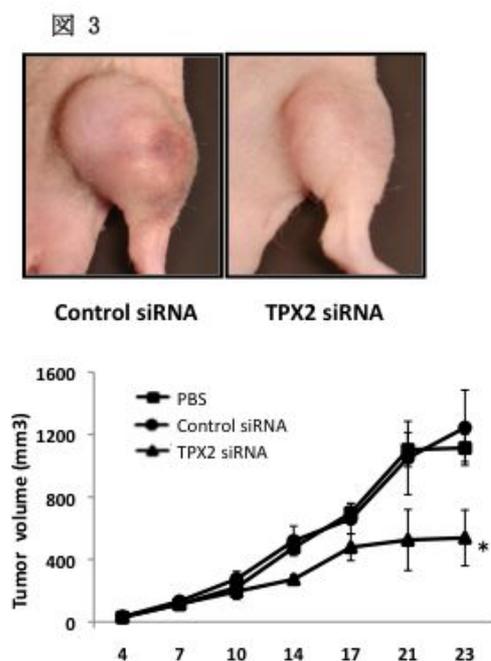
TPX2はヒト膵癌由来細胞株KLM1、KP4、panc1、PK45H、PK8、PK9、MIAPaca2において高発現していた(図1)。



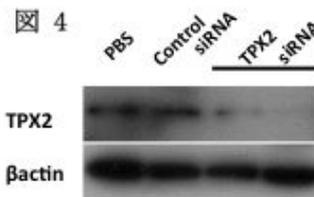
一方で正常膵組織由来細胞株ACB RI515ではTPX2の発現を認めなかった。名古屋大学医学部附属病院での膵癌症例70例では、TPX2の発現は正常組織と比較して癌組織で有意に亢進していた(図2)。



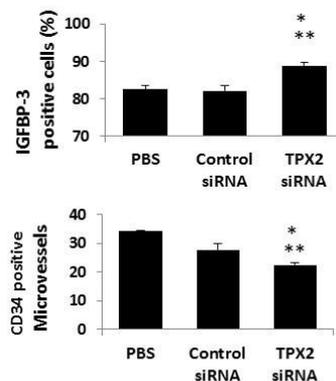
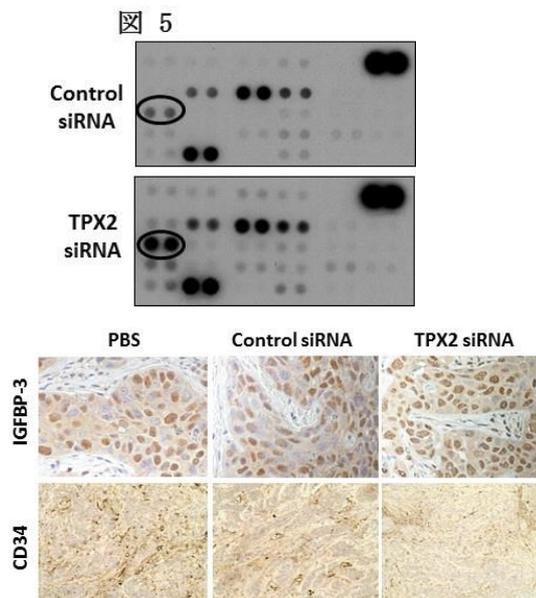
しかし予後との相関は認めなかった。TPX2を標的に合成したsiRNAであるTPX2 siRNAは、ヒト膵癌細胞株KLM 1、Panc1、KP4においてTPX2の発現抑制に有効であった。TPX2 siRNAは膵癌細胞株KLM 1、Panc1、KP4において細胞増殖の抑制が可能であり、細胞死を誘導し、浸潤運動能の抑制も可能であった。マウス皮下発癌モデルにおいて TPX2 siRNA は腫瘍の増殖抑制が可能であった(図3)。



また TPX2 siRNA 投与後の腫瘍において TPX2 発現は抑制されていた(図4)。



切除標本の組織学的検討では TPX2 siRNA 投与群での腫瘍内の血管新生が乏しかった。また切除標本の血管新生因子の解析により TPX2 siRNA 投与群では、Insulin like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) の発現亢進を認めた(図5)。



IGFBP-3 は、Insulin like growth factor (IGF) に特異的に結合するタンパクであり、抗腫瘍効果、抗血管新生作用などの報告がされている。

本研究により TPX2 の抑制による抗腫瘍効果には血管新生因子の 1 つである IGFBP-3 が関与していることを明らかにした。

## 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 1 件)

Miwa T, Kokuryo T, Yokoyama Y, Yamaguchi J, Nagino M. Therapeutic potential of targeting protein for Xklp2 silencing for pancreatic cancer. Cancer Med. 2015 Apr 27. in press (査読有)

[学会発表](計 1 件)

三輪 知弘、國料 俊男、横山 幸浩、山口 淳平、榑野 正人、Targeting protein for Xklp2( TPX2 )を標的にした膵癌治療法の開発、115 回日本外科学会定期学術集会、2015.4.16. 名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

國料 俊男 (KOKURYO TOSHIO)  
名古屋大学・医学系研究科・特任講師  
研究者番号：60378023

### (2)研究分担者

榑野 正人 (NAGINO MASATO)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20237564

横山 幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80378091

千賀 威 (SENGA TAKESHI)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：80419431

板津 慶太 (ITATSU KEITA)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90534842

清水 泰博 (SHIMIZU YASUHIRO)  
愛知県がんセンター・消化器外科・部長  
研究者番号：40470166