

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26462052

研究課題名（和文）EPhA4を標的とした膵癌バイオマーカーの探索と膵癌新規治療法の開発

研究課題名（英文）Inhibition of Eph receptor A4 by 2,5-dimethylpyrrolyl benzoic acid suppresses human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice

研究代表者

平野 聡（Hirano, Satoshi）

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号：50322813

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）：本研究では、膵癌切除検体におけるEphA4高発現は膵癌患者の独立した予後不良の規定因子であることを明らかにした。またEphA4を阻害する2,5-dimethylpyrrolyl benzoic acidは、細胞実験および動物実験において著明な膵癌増殖抑制効果があり、膵癌の新規治療薬としての可能性があることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Our study indicated that EphA4 expression was an independent prognostic factor in pancreatic cancer. Our study indicated that 2,5-dimethylpyrrolyl benzoic acid showed a cytostatic efficacy in pancreatic cancer expressing EphA4 in vitro and in vivo.

研究分野：膵癌新規治療の開発

キーワード：Ephrin receptor A4 分子標的治療 膵癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌の最も有効な治療法は外科切除だが、膵癌全体の5年生存率は約5%に過ぎず、治療成績の向上が急務である。我々は膵癌の網羅的遺伝子発現解析を元に、膵癌で特異的に発現亢進する遺伝子 EphA4 を同定し、予後との関係や、EphA4 を阻害する低分子を利用した新規治療薬の開発を行った。

2. 研究の目的

膵癌臨床検体における EphA4 の発現状況と、切除後の予後因子としての検討や、術後再発部位との関連を検討する。

また、アルツハイマーなど脳神経系の研究分野において先行して研究されている EphA4 阻害剤 4-(2,5-dimethyl-1H-pyrrol-1-yl)-2-hydroxybenzoic acid (以下、Compound 1 と略記) を用い、膵癌細胞の増殖抑制効果を検討する

3. 研究の方法

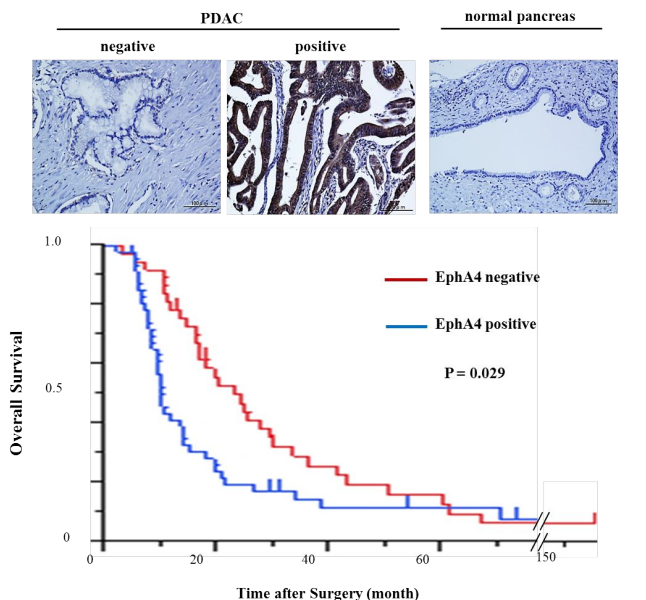
膵癌臨床検体における EphA4 発現状況と予後との関連を検討する。Tissue microarray (TMA) 法を用い、切除膵癌 99 例の臨床組織検体における EphA4 免疫染色と臨床情報を比較し予後との関連を検証する。

EphA4 阻害剤 Compound 1 を用いた膵癌細胞株並びに膵癌治療実験 (前臨床試験) を施行する。また、EphA4 阻害による膵癌増殖経路の阻害について、下流分子の発現を比較検討する。

4. 研究成果

Tissue microarray (TMA) 法を用い、膵癌 99 例の臨床組織検体における EphA4 免疫染色と臨床情報を比較した。99 例中 46 例 (46.5%) に EphA4 陽性症例を認め、陰性例と比較し Overall survival で有意に予後不良であった (Figure 1)。

Figure. 1

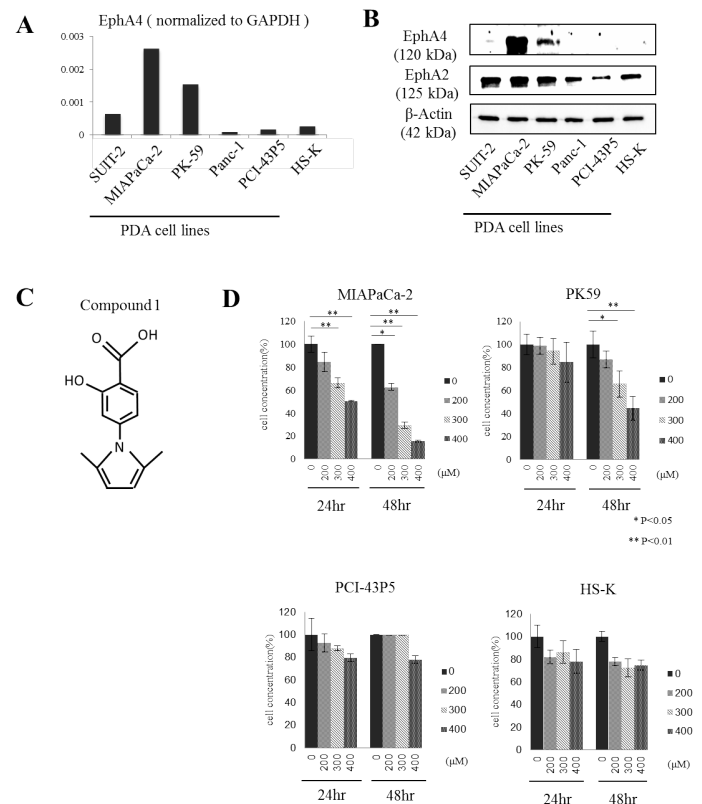


また EphA4 発現を含めた臨床病理学的因子

の多変量解析で EphA4 発現陽性は独立した予後規定因子であった。特定の再発部位との関連は認められなかった。

次に EphA4 を高発現する膵癌細胞株 MIA-PaCa2 において、Compound 1 が濃度・時間依存性に細胞増殖抑制効果を発揮するかを検証し、有効濃度を決定した。またヒト正常繊維芽細胞を用いた実験で至適濃度を決定した。結果、Compound 1 は単剤で有効な膵癌増殖抑制効果を発揮した。また、Compound 1 は、EphA4 高発現株には有効であったが、低発現株においては有効性は示さなかった。(Figure 2)

Figure. 2

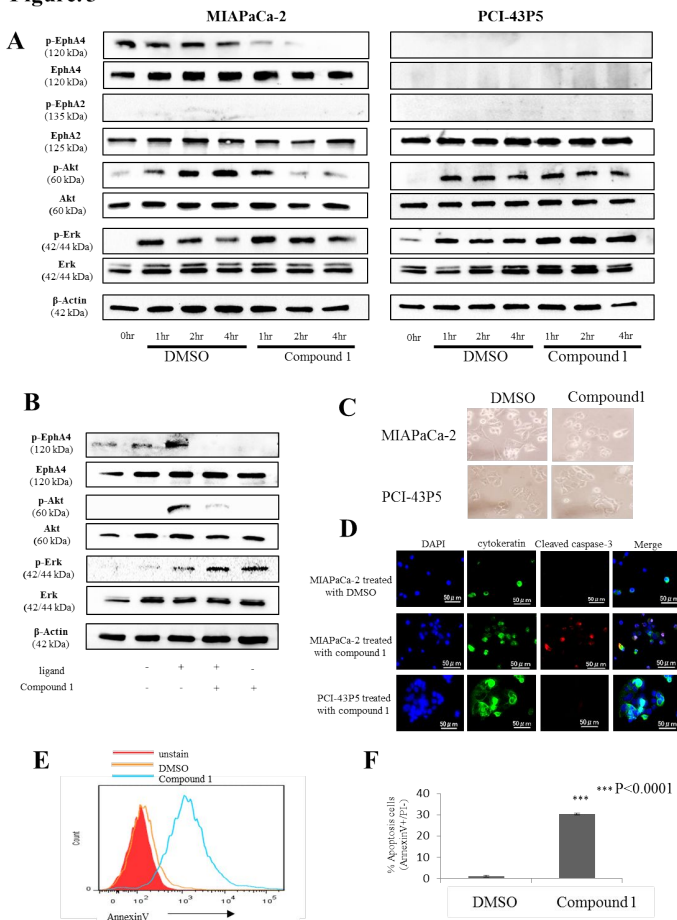


Compound 1 が示す EphA4 陽性膵癌細胞に対する増殖抑制効果の機序を明らかにする目的で癌細胞増殖に関与することが知られる 2 つの経路 (Erk/Akt 経路) に着目して検討を行った。EphA4 陽性膵癌細胞株 MIA-PaCa-2 および EphA4 陰性膵癌細胞株 PCI-43P5 のタンパクを用いて、EphA4, EphA2, Erk, Akt の発現およびそのリン酸化の有無をウエスタンブロット法にて確認した。結果、EphA4 陽性膵癌細胞株 MIA-PaCa-2 において、compound 1 (400 μM) 投与下では EphA4 のリン酸化が抑制されていることが確認できた。また、Erk/Akt 経路に関しては、Akt のリン酸化が抑制され、Erk のリン酸化がやや亢進する結果となった。EphA4 陰性膵癌細胞株 PCI-43P5 では compound 1 投与下においても、Erk/Akt 経路ともにそのリン酸化への影響は見られなかった (Figure 3A, 3B)。

次に Akt 経路は癌細胞のアポトーシス抑制に寄与していることが知られていることから、本実験においても compound 1 投与下での EphA4 陽性膵癌細胞株のアポトーシスの有無について解析した。EphA4 陽性膵癌細胞株 MIAPaCa-2 においては、compound 1 (400  $\mu$ M) 投与下で、その細胞形態に変化が見られた。同様の変化は EphA4 陰性膵癌細胞株 PCI-43P5 では見られなかった (Figure 3C)。アポトーシスの検出には、cleaved caspase-3 の発現の有無を蛍光免疫染色で確認した。結果は、EphA4 陽性膵癌細胞株 MIAPaCa-2 が compound 1 投与下において、cleaved caspase-3 の発現を認めた (Figure 3D)。またアポトーシス細胞の割合を検出する目的でフローサイトメトリーを施行した。Annexin V と PI による染色を行い、Compound 1 (400  $\mu$ M) 投与下において、EphA4 陽性膵癌細胞株 MIAPaCa-2 では Annexin V 陽性細胞数の増加を認め、早期アポトーシス細胞の割合は 30%程度とコントロール群と比較し有意に増加を認めた (Figure 3E,3F)。

以上の結果から、compound 1 投与にて

Figure. 3



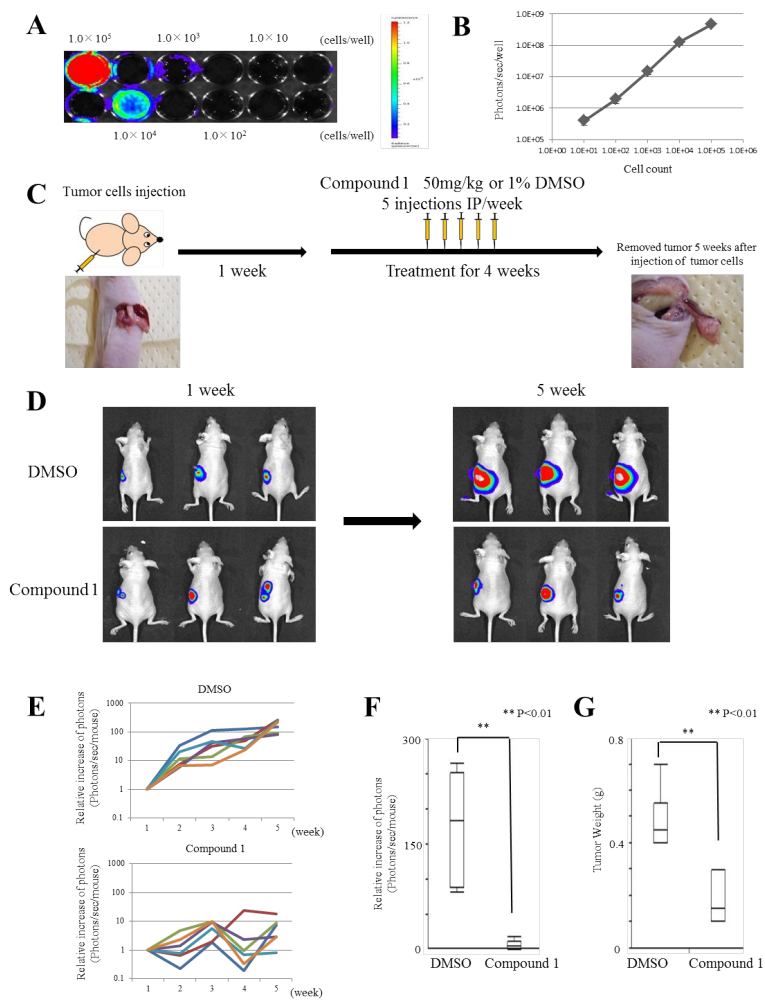
EphA4 陽性膵癌細胞においては EphA4 のリン酸化および Akt のリン酸化が抑制されることで、膵癌細胞のアポトーシスが誘導されていることが示された。また EphA4 陰性膵癌細胞株は compound 1 投与では同様の反応は見られなかった。

さらに、ヒト膵癌細胞株によるマウス同所移植モデルを用い、Compound 1 投与による膵癌治療実験を施行し、抗腫瘍効果を確認した。

In vivo での治療実験に先立ち、ルシフェラーゼを導入した膵癌細胞株 MIAPaCa-2 のルシフェラーゼ発現を確認した。MIAPaCa-2 細胞を  $1 \times 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1$  個に培養仕分け、ルシフェリンを投与し、in vivo 実験で用いる IVIS を用いて発光を確認した。ルシフェラーゼを導入した膵癌細胞 MIAPaCa-2 の発光が確認でき、その発光強度は培養細胞数に比例していた (Figure 4A,4B)。

膵癌同所移植マウスモデルを作成し、

Figure. 4

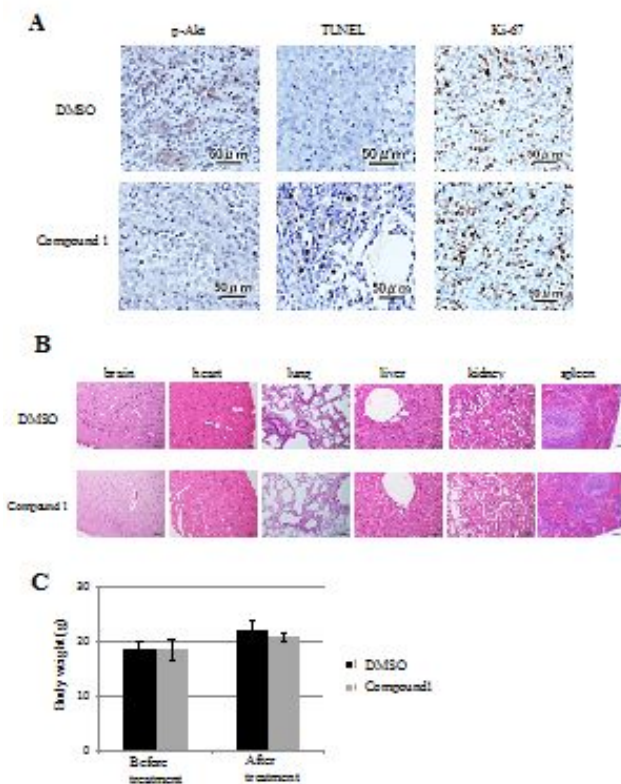


compound 1 (50mg/kg) または 1% DMSO を週 5 回、腹腔内投与する 2 群での比較を行った。各々のマウスは膵癌細胞株 MIAPaCa-2 移植後 1 週間で腫瘍の生着が確認されたマウスのみ前述のスケジュールに沿った治療を行い、各群 6 匹ずつでの比較検討を行った。Compound 1 治療群においては、IVIS により検出された腫瘍細胞の信号強度が腫瘍生着時点 (腫瘍細胞移植後 1 週間) の値を 1 とした場合の相対値においてコントロール群に比して有意に低値を示した。また、4 週間の治療後 (腫瘍細胞移植から 5 週間後) に摘出した腫瘍の重量の比較でも compound 1 治療群では有意に低値を示し、compound 1 の腹腔内投与は膵癌

同所移植マウスモデルにおいて、その治療効果（膵癌細胞増殖抑制効果）があることが示唆された（Figure 4D, 4E, 4F, 4G）。

In vivo での 4 週間の治療終了後（腫瘍細胞移植から 5 週間後）に、各マウスを安楽死させ腫瘍を摘出し重量を測定後、in vivo での腫瘍において in vitro で示された Akt のリン酸化抑制およびアポトーシスの誘導が見られるかの評価を免疫組織化学染色にて行った。摘出腫瘍をホルマリン固定後に薄切切片を作成し、前述の方法および抗体を使用し行った。アポトーシスの評価には前述の Apoptosis in situ Detection Kit Wako (WAKO) を使用し、腫瘍細胞増殖マーカーとして Ki-67 を使用した。結果は、摘出腫瘍組織において compound 1 群の腫瘍では p-Akt の染色がコントロール群に比べ弱く、アポトーシスを検出する TUNEL 染色細胞が多く見られた ( $P < 0.01$ )。腫瘍細胞増殖を反映する Ki-67 染色では両群に差を認めなかった。このことから、in vivo においても in vitro の結果と同様に、compound 1 投与によって腫瘍細胞の Akt リン酸化が抑制されアポトーシスが誘導されていることが示唆された。腫瘍細胞の増殖能に差が見られないことから、in vivo 実験において腫瘍細胞増殖に差が見られたのはアポトーシス誘導の結果であることが推察された（Figure 5A）。

Figure. 5



Compound 1 の副作用の観点から、心臓、肺、肝臓、腎臓といった生命維持に重要な臓器や、神経細胞に与える影響についても観察終了後の摘出臓器において検討を行い、明らかな

障害を認めなかった。また体重に関しては、両群で治療後に体重低下などの兆候はなく、治療前後の体重変化についても両群で有意差は認めなかった。（Figure 5B, 5C）。

実臨床において、膵癌に対する既存の分子標的治療薬は単剤で効果がなく、化学療法との併用療法で承認されている。このため Gemcitabine と Compound 1 の併用療法を施行した。Gemcitabine 単剤と比較し、Compound 1 との併用療法は、in vitro、in vivo においていずれも高い抗腫瘍効果を発揮した。

## 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)

1. Takano H, Nakamura T, Tsuchikawa T, Kushibiki T, Hontani K, Inoko K, Takahashi M, Sato S, Abe H, Takeuchi S, Sato N, Hiraoka K, Nishihara H, Shichinohe T, Hirano S. Inhibition of Eph receptor A4 by 2,5-dimethylpyrrolyl benzoic acid suppresses human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. *Oncotarget* 6(38)2015, 41063-76. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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) 研究代表者

平野 聡 (HIRANO SATOSHI)  
北海道大学・医学研究科・教授  
研究者番号：50322813

(2) 研究分担者

土川 貴裕 (TSUCHIKAWA TAKAHIRO)  
北海道大学・病院・講師  
研究者番号：50507572

中村 透 (NAKAMURA TORU)  
北海道大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70645796

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )