

令和元年6月18日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04926

研究課題名(和文) 肝胆膵領域難治癌に対する新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Exploration of novel molecular targets in hepato-biliary-pancreatic cancers

研究代表者

田邊 稔 (TANABE, Minoru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50197513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は現在までおよそ710症例の肝細胞癌、230症例の膵臓癌、250症例の胆道癌の切除標本を有し、その大規模なバイオリソースを活用した基礎研究により難治性な肝胆膵領域癌に加え、希少疾患である膵神経内分泌腫瘍に関する新規治療薬やバイオマーカーの探索を行っている。肝細胞癌や膵臓癌における新規治療薬の臨床的有用性や抗がん剤感受性マーカー、膵神経内分泌腫瘍における疾患予後に関連した新規バイオマーカーや新規メカニズムなどの発見などに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝胆膵領域癌は早期発見や確定診断が困難であるだけでなく、腫瘍の生物学的悪性度が高い特徴を有する。そのため年々死亡数も増加傾向にあり肝胆膵領域癌は固形癌の中で難治性癌であり、さらなる新規治療薬の開発が必要な状況である。我々はいままで手術標本から得られたゲノム情報を中心としたさまざまな解析により新規治療薬の開発を推進し、また有用となる治療ターゲットを報告してきた。今後もさらなる基礎研究を推進し、新規治療薬の開発に加え、抗がん剤感受性や疾患予測など新規バイオマーカーの探索も推し進め難治癌である肝胆膵領域癌や、希少疾患である神経内分泌腫瘍に関する研究を介して医療へ貢献する。

研究成果の概要(英文)：Our research has been focused on hepatocellular, biliary, and pancreatic cancer, which are already known to be intractable diseases. Our institute possesses lots of bioresearch materials of resected cancer tissues, enabling to perform large-scale analysis. We are also trying to figure out novel findings associated with pancreatic neuroendocrine tumors, which are recognized to be rare and difficult to treat. Recently, we have published literature about clinical significance of new treatments and biological markers of susceptibility of drug therapy in hepatocellular and pancreatic cancer. In addition, we have demonstrated significant biological marker related to disease prognosis and novel mechanism which can leads to understanding of cancer progressing.

研究分野：肝胆膵領域癌

キーワード：肝細胞癌 膵臓癌 胆道癌 集学的治療 神経内分泌腫瘍 分子標的治療 分子標的マーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝胆膵癌に対する分子標的治療薬としては、膵癌に対して EGFR 阻害剤であるエルロチニブが本邦でも認可され、肝細胞癌ではマルチターゲットチロシンキナーゼ阻害剤であるソラフェニブが認可されていた。その他の分子標的治療薬の臨床試験も盛んに行われており、肝胆膵領域癌においても、ますますその重要性が高まることが予想されていた。またハイスループットスクリーニング等の技術により、新規化合物開発スピードは飛躍的に進歩しており、分子標的治療開発の分野では、臨床応用への治療展開が期待されていた。

### 2. 研究の目的

肝胆膵癌は解剖学的特性、癌の分子生物学的特性から予後不良症例が多いことが特徴である。そのため集学的治療が行われるがその効果は満足いくものではなく、有効な新規治療の開発が喫緊の課題である。我々は肝胆膵癌に対して手術標本から得られたデータに基礎解析を統合的に行い新規分子標的治療開発を目指している。本研究で得られた知見が、肝胆膵難治癌の新規治療開発に向けた臨床試験の礎となることを目標とする。

### 3. 研究の方法

#### 計画 1)

臨床検体解析による各標的分子の発現状況とその臨床病理学的因子との相関解析。

#### 計画 2)

肝胆膵癌細胞株を用い *in vitro* 解析、合成致死の組み合わせの探索および腫瘍幹細胞を標的とした治療の開発。

#### 計画 3)

ASPH 導入 ファージによる癌ワクチンの開発。

#### 計画 4,5)

肝胆膵癌同所性動物モデルによる各分子標的治療の前臨床試験。

#### 計画 6)

治療効果、認容性解析(血管新生評価、各シグナル伝達標的の評価および治療バイオマーカーの探索)

#### 計画 1)

##### 臨床検体解析による各標的分子の発現状況とその臨床病理学的因子との相関解析

治療標的として有望な分子について当施設の切除症例におけるそれぞれの発現分布、臨床病理学的因子との相関を解析し治療標的の探索を行う。

#### 計画 2) 各分子標的治療の *in vitro* 解析

##### (1). 標的分子阻害効果の *in vivo* 解析

肝胆膵癌分子標的治療に有望とされる既知の分子標的または、計画 1 にて検出された新規標的分子の *in vitro* 害効果を siRNA および特異的阻害剤を用いて解析する。細胞増殖抑制試験、細胞遊走能、浸潤能の評価、細胞周期解析等の手法を用い、その抗腫瘍効果を解析する

##### (2). 合成致死性組み合わせの探索

既存の分子標的治療または、計画 1 にて得られた新規標的分子を含めて、合成致死性組み合わせの探索を行う。

##### (3). 腫瘍幹細胞を標的とした治療開発

癌幹細胞モデルを用いて分子標的治療の癌幹細胞を標的とした治療可能性を探索する。

#### 計画 3). ASPH を標的とした新規癌ワクチンの開発

#### 計画 4) *in vivo* 肝胆膵領域癌マウス腫瘍モデルによる前臨床試験の実施。

##### (1). Luciferin 導入株による腫瘍可視化モデルの作成

##### (2). ヒト肝癌細胞株由来原発性肝癌同所モデル

##### (3). ヒト膵癌細胞株由来、転移性肝癌モデル

#### 計画 5) 癌免疫治療評価のための肝胆膵癌の同系移植マウス、ラットモデルの作成。

肝胆膵癌治療評価に適した同系移植同所腫瘍モデルを作成する。

#### 計画 6) *in vivo* 治療効果解析

*in vivo* 肝胆膵癌モデルより、標本を作成し、抗腫瘍効果、作用機序を解析する。

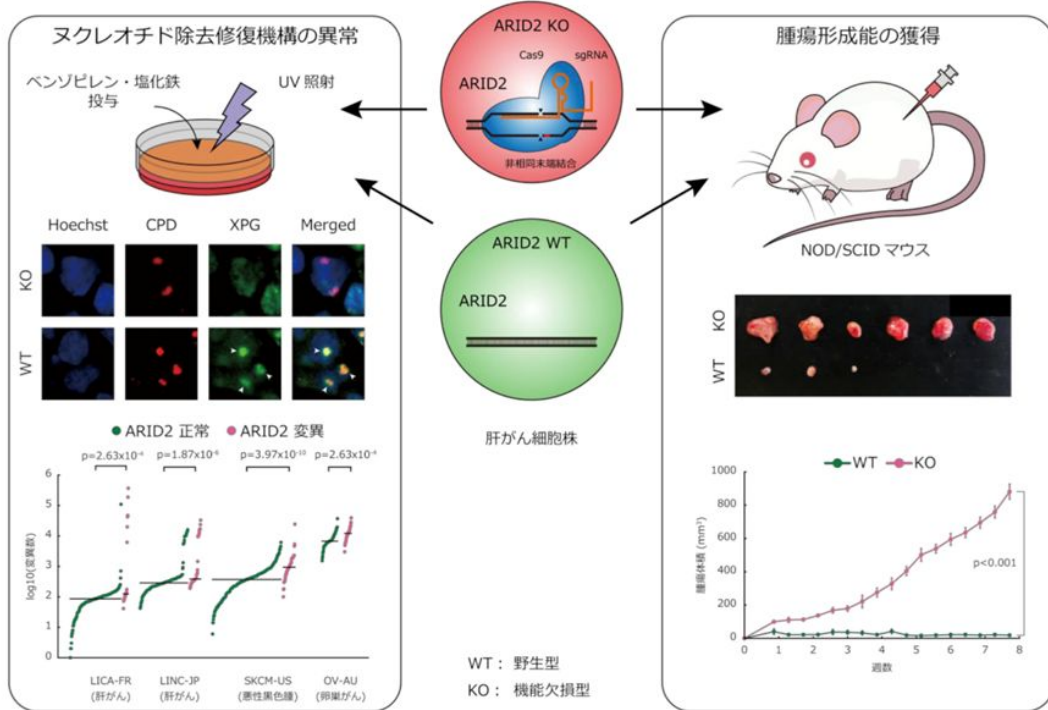
##### (1). 標的分子バイオマーカー解析

##### (2). 血管新生の評価

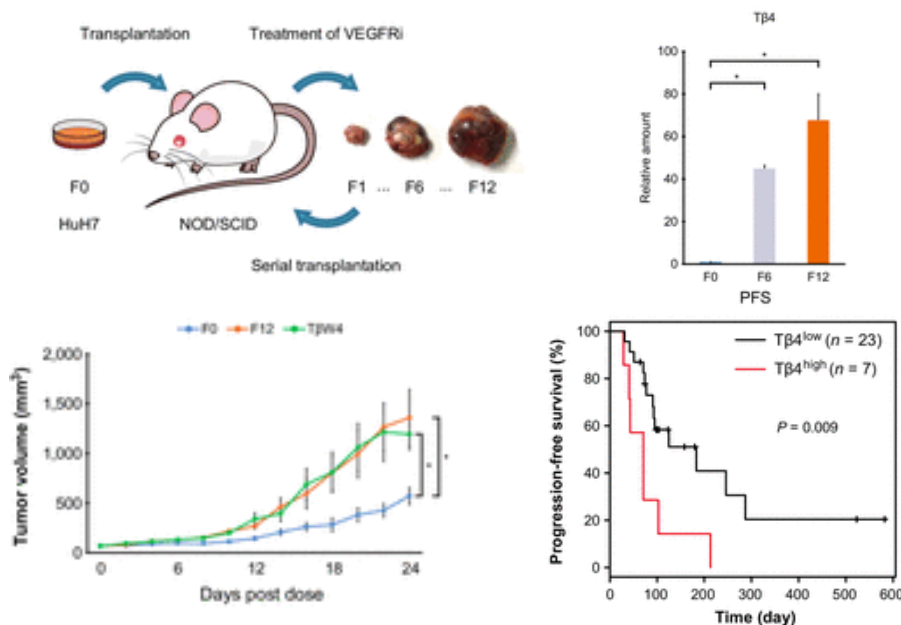
##### (3). 毒性、認容性の評価

#### 4. 研究成果

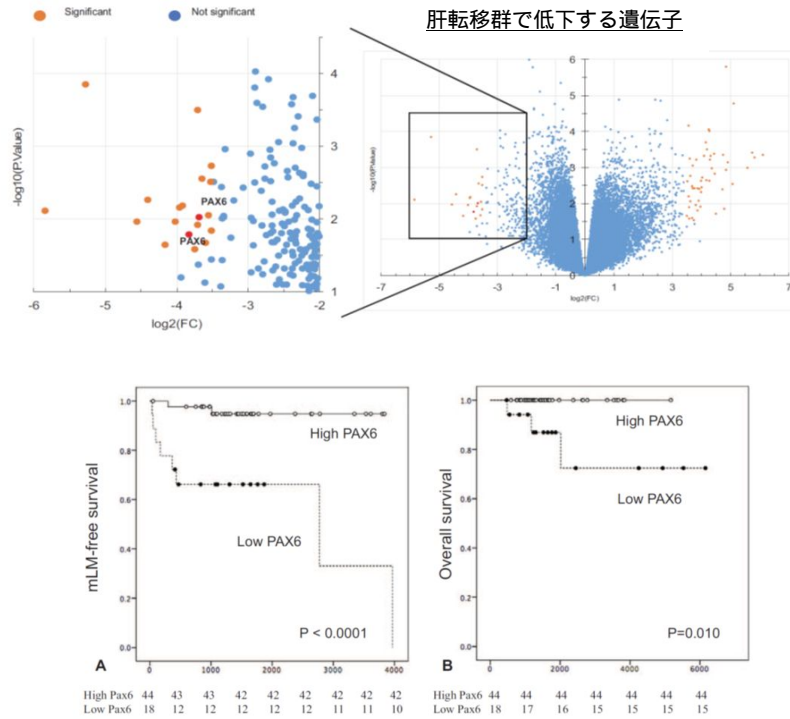
肝癌の7%にみられると報告された ARID2 変異サブタイプについて解析を行った。肝細胞癌細胞株に対して CRISPR-Cas9 を用いて作成された ARID2 ノックアウト株では造腫瘍能が亢進することを示され、ARID2 遺伝子変異サブタイプが予後不良であることと矛盾しない結果であった。さらに ARID2 ノックアウト株の網羅的発現解析の結果から DNA 修復遺伝子の機能不全が起こることが示された。公開データベースの解析からは ARID2 変異肝癌が遺伝子変異を多く持つ (hypermutant である) 傾向が示され、ARID2 変異サブタイプに対し免疫チェックポイント阻害薬などが有効となる可能性が示唆された。(Oba A et al. J Hepatol 2017)



肝細胞癌細胞株を用いた *in vivo* による腫瘍悪性化のセレクションを行い、網羅的なゲノム発現解析を行った結果、VEGF 阻害剤に対する治療抵抗性に関する T 4(G-act in monomer binding protein thymosin 4)を同定した。本遺伝子は細胞遊走・浸潤能や増殖能を介して腫瘍悪性化に関連し、マウスを用いた *in vivo* 解析では T 4 発現が皮下増殖モデルで腫瘍増殖能が亢進することを明らかにした。さらにはソラフェニブ投与を行った肝細胞癌患者 30 症例での免疫組織染色による *in vivo* 解析では、T 4 発現上昇は発現低下するグループに比べて有意に無再発生存期間が低下している (P=0.009) ことが明らかとなり、T 4 低下は腫瘍再発を抑制する治療薬としての有用性を示唆した。(Ohata Y et al. Mol Cancer Ther 2017)

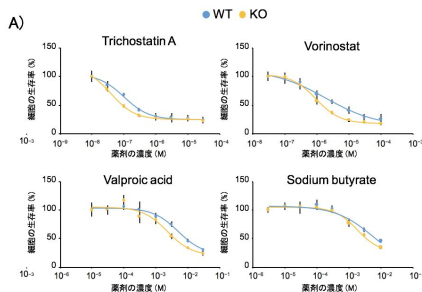


膵神経内分泌腫瘍の手術標本の腫瘍組織を用いてゲノムワイドな遺伝子解析を施行。肝転移を有した症例と肝転移を有さない症例を比較した遺伝子発現アレイから膵細胞発現プロファイルが最も顕著に変化をきたし、かつ肝転移巣を有する症例で PAX6 遺伝子発現が著明に低下することを明らかにした。PAX6 高発現の症例は PAX6 低発現の患者に比較して、無再発生存期間 ( $P < 0.0001$ ) と全生存期間 ( $P = 0.010$ ) において有意に良好な疾患予後を示した。さらには臨床病理学的な解析から PAX6 は独立した予後規定因子であることが示された。これら結果から PAX6 を含む細胞関連遺伝子の発現低下は予後不良なサインであることが示され新たなバイオマーカーとしての有用性を明らかにした。(Kudo A et al. Ann Surg 2018)



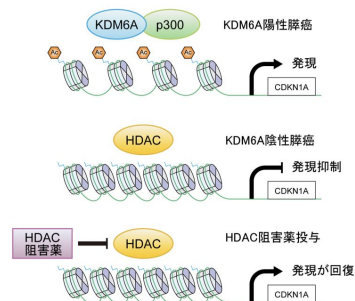
膵癌の 25%を占めるとされ特に予後不良な subtype とされる Quasimesenchymal (QM subtype) Subtype において特徴的に見られる KDM6A 遺伝子変異の解析を行った。臨床検体を用いた解析で KDM6A 発現陰性群において有意に予後が不良であることを示し、公開データベースの解析と矛盾しない結果が示された。膵癌細胞株について CRISPR-Cas9 を用いた KDM6A ノックアウトを行うことにより造腫瘍能の亢進がみとめられ、網羅的遺伝子解析の結果から TP53 pathway 関連の腫瘍抑制因子の低下があり、機序としてエピゲノム修飾因子の変化が示されるとともにエピゲノム修飾因子阻害薬が特異的治療効果をもつことを示した。(Watanabe S et al. Int J Cancer 2019)

図. KDM6Aノックアウト膵癌へのHDAC阻害薬の効果



KDM6Aをノックアウト(KO)した細胞株は通常(WT)よりもHDAC阻害薬への感受性が高かった(A)。HDAC阻害薬はKDM6Aノックアウト株を移植したマウス皮下腫瘍でも著大な効果があり、投与によりCDKN1Aが発現した(B)。

図. KDM6A陰性膵癌に対するHDAC阻害薬の作用メカニズム



KDM6A陰性膵癌ではヒストンアセチル化が障害され癌抑制遺伝子が発現低下することで悪性化する。HDAC阻害薬はヒストンアセチル化を増加させることで癌抑制遺伝子の発現を回復する。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 31 件)

英語論文

2015 年度 7 件

2016 年度 6 件

2017 年度 8 件

2018 年度 10 件

主たる論文

1. Downregulated Pancreatic Beta Cell Genes Indicate Poor Prognosis in Patients With Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms.

Kudo A, Akahoshi K, Ito S, Akashi T, Shimada S, Ogura T, Ogawa K, Ono H, Mitsunori Y, Ban D, Tateishi U, Tanaka S, **Tanabe M**.

Ann Surg. 2018 Jul 3. doi: 10.1097/SLA.0000000000002911.

2. Acquired Resistance with Epigenetic Alterations Under Long-Term Antiangiogenic Therapy for Hepatocellular Carcinoma.

Ohata Y, Shimada S, Akiyama Y, Mogushi K, Nakao K, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Arii S, **Tanabe M**, Tanaka S.

Mol Cancer Ther. 2017 Jun;16(6):1155-1165. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0728. Epub 2017 Feb 28.

3. ARID2 modulates DNA damage response in human hepatocellular carcinoma cells.

Oba A, Shimada S, Akiyama Y, Nishikawaji T, Mogushi K, Ito H, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Asahara H, Kaida A, Miura M, **Tanabe M**, Tanaka S.

J Hepatol. 2017 May;66(5):942-951. doi: 10.1016/j.jhep.2016.12.026. Epub 2017 Feb 24.

8.

〔学会発表〕(計 152 件)

2015 年度 40 件

2016 年度 48 件

2017 年度 21 件

2018 年度 43 件

主たる学会発表

1. 2016 年 4 月 第 116 回 日本外科学会：肝細胞癌に対する Aurora/VEGFR 二重特異的阻害剤の前臨床試験、藍原 有弘、中尾 圭介、松永 浩子、光法 雄介、松村 聡、伊藤 浩光、伴 大輔、落合 高德、工藤 篤、有井 滋樹、田中 真二、**田邊 稔**

2. 2016 年 7 月 第 71 回 日本消化器外科学会：ヒト膵癌幹細胞可視化システムを用いた転移メカニズムの解析 伊藤 浩光、秋山 好光、島田 周、松村 聡、藍原 有弘、伴 大輔、落合 高德、工藤 篤、田中 真二、**田邊 稔**

3. 2017 年 2 月 12th Annual Academic Surgical Congress：OPRT as a Prdictor of Benefit form S-1 Adjuvant Chemotherapy for Cholangiocarcinoma Patients Akahoshi K, Ban D, Kuboki R, Matsumura S, Mitsunori Y, Ochiai T, Kudo A, **Tanabe M**

〔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：

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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。