

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09042

研究課題名(和文) 膵癌進展を規定する細胞表面分子の同定と標的化

研究課題名(英文) Identification of a molecular marker relating to the progression of pancreatic cancer cells

研究代表者

中井 陽介 (Nakai, Yousuke)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80466755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはKDM6Bの発現低下が癌抑制遺伝子CEBPAの発現を直接抑制し膵癌の悪性度増加に寄与することを明らかにした(Carcinogenesis 2014)。KDM6Bノックダウン膵癌細胞の発現解析により、KDM6Bノックダウンによって誘導される表面マーカーを見出した。その高発現細胞の生物学的特性としてin vitroでの高い腫瘍形成能を呈することを確認した。本研究によりエピジェネティクス制御分子の発現異常に基づく膵癌悪性化の分子機構の一端を明らかにしうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We reported a novel role of KDM6B in regulating PDAC progression (Carcinogenesis 2014;35(11):2404-14). KDM6B was downregulated in high grade PDACs and knockdown of KDM6B in PDAC cells increased the tumorigenicity and enhanced the aggressive phenotypes in vivo. Furthermore, CEBPA was identified as a direct target of KDM6B, and reduced KDM6B- C/EBP axis was resulted in increased aggressiveness in PDAC cells. We tried to identify a surrogate molecular marker of the cells lacking KDM6B- function. We used a cDNA microarray to compare the expression profiles of KDM6B- KD and control PDAC cells and identified the candidate molecule relating to the loss of KDM6B.

研究分野：消化器病学

キーワード：膵癌

1. 研究開始当初の背景

申請者は膵癌の化学療法を行い、その予後不良因子の臨床的知見を集積してきた。なかでも腹膜播種は化学療法などの抗腫瘍治療効果を低下させる大きな悪性化因子である。現在いまだ腹膜播種を標的としうる有効な化学療法レジメンは殆どなく、新たな治療法が望まれる。

一方申請者らは SNP アレイを用いたゲノムワイドのコピーナンバーバリエーションの解析から、ヒストン脱メチル化酵素 *KDM6B* 遺伝子が *p53* 遺伝子近傍 17p13 に存在し、膵癌において LOH を呈していることを見出した (Lin, et.al. *Oncology* 2008;75:102)。その *KDM6B* の発現低下が膵癌細胞において果たす役割を検討するため、各種膵癌細胞株において *KDM6B* をノックダウンしその表現型の解析を行った。

KDM6B ノックダウン膵がん細胞では *in vitro* での遊走能や浸潤能が増加した。また *in vivo* の検討でも皮下移植されたノックダウン細胞はコントロールでは見られない著明な腹膜播種や血性腹水をきたし、膵への同所移植では肝・肺転移を引き起こした。さらにはコントロール細胞においては見られなかった単一細胞からの sphere 形成能を獲得していた。希釈系列の細胞群を用いた *in vivo* 腫瘍形成能においても明らかな増加を示した。これらの表現型は二つの異なるノックダウン配列に共通してみられており、*KDM6B* に特異的なものと考えられた。*KDM6B* ノックダウン細胞とランダムコントロール細胞で網羅的な遺伝子発現解析を行い、その発現アレイデータを基にした GSEA 解析から、ノックダウン細胞では転写因子 C/EBPa の下流遺伝子が高い NES と有意差をもって誘導されていた。C/EBPa を *KDM6B* ノックダウン細胞にレトロウイルスで過剰発現したところ、*KDM6B* ノックダウンでみられた表現型がレスキューされ、逆に C/EBPa のノックダウ

ン細胞は *KDM6B* ノックダウン細胞の表現型を再現した。またクロマチン免疫沈降にて *KDM6B* が C/EBPa 遺伝子に直接結合し、ヒストンメチル化レベルを制御していることを示した。さらにヒト膵癌検体において、病理学的悪性度と *KDM6B* が逆相関し、*KDM6B* と C/EBPa の発現に正の相関がみられることを免疫組織学的に示した。これらから *KDM6B* 欠損が C/EBPa の機能低下を介して膵癌の悪性度増加に寄与していることを報告した (Carcinogenesis.2014;35(11):2404-14)。

2. 研究の目的

上記の検討により、*KDM6B*- C/EBPa axis の破綻が膵癌自然史における腹膜播種、癌性腹水といった重度の悪性化に関与する可能性が示唆された。本計画では *KDM6B*- C/EBPa axis の破綻による膵癌細胞の悪性化と連動する細胞表面マーカー、およびその陽性細胞集団を同定し、分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

網羅的発現アレイによる表現型関連表面マーカーの同定

網羅的発現アレイデータを詳細に検討し、二倍以上に発現上昇がみられる分子のうち、細胞表面に発現される分子群をおよそ50遺伝子同定した。さらにその中から複数の細胞クローンを用いた定量的RTPCRにより、その有意な発現上昇に再現性がみられる遺伝子を約20分子抽出しえた。

4. 研究成果

RT-PCRによって抽出された表面マーカーのうち、フローサイトメトリーで実際に細胞表面の発現が *KDM6B* ノックダウンで増加するマーカー分子を探索し、表面マーカー候補を抽出した。その高発現細胞群が *KDM6B* ノックダウンによって誘導されることが示されたことから、この新たに誘導されたマーカー高発現細胞分画とそれ以外の分画をそれぞれ sorting によ

って単離し、以下の実験検討に用いた。結果としてスクラッチアッセイでの遊走能やマトリゲルシステムを用いた浸潤能、またsphere形成アッセイによって腫瘍形成能の程度を比較検討することによりマーカー高発現細胞群がKDM6B ノックダウン細胞でみられる浸潤能や腫瘍形成能亢進を再現できるかどうか検討したところ、その高発現細胞群がin vitroでの高い腫瘍形成能を呈することを確認しえた。さらにはその細胞群の誘導機構を明らかにするため上流の細胞内リン酸化シグナルについても検討を行っている。本研究によりエピジェネティクス制御分子の発現異常に基づく膵癌悪性化の分子機構のひとつの分子メカニズムについて明らかにしうると考えられる。

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9件)

1: Ishigaki K, Nakai Y, Isayama H, Saito K, Hamada T, Takahara N, Mizuno S, Mohri D, Kogure H, Matsubara S, Yamamoto N, Tada M, Koike K.

Thromboembolisms in Advanced Pancreatic Cancer: A Retrospective Analysis of 475 Patients. *Pancreas*. 2017;46(8):1069-1075

2: Mizuno S, Isayama H, Nakai Y, Yoshikawa T, Ishigaki K, Matsubara S, Yamamoto N, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Hayashi N, Koike K.

Prevalence of Pancreatic Cystic Lesions Is Associated With Diabetes Mellitus and Obesity: An Analysis of 5296 Individuals Who Underwent a Preventive Medical Examination.

Pancreas. 2017;46(6):801-805.

3: Hamada C, Okusaka T, Ikari T, Isayama H, Furuse J, Ishii H, Nakai Y, Imai S, Okamura S.

Efficacy and safety of gemcitabine plus S-1 in pancreatic cancer: a pooled analysis of individual patient data.

Br J Cancer. 2017;116(12):1544-1550.

4: Saito T, Hirano K, Isayama H, Nakai Y, Saito K, Umefune G, Akiyama D, Watanabe T, Takagi K, Hamada T, Takahara N, Uchino R, Mizuno S, Kogure H, Matsubara S, Yamamoto N, Tada M, Koike K.

The Role of Pancreatic Enzyme Replacement Therapy in Unresectable Pancreatic Cancer: A Prospective Cohort Study. *Pancreas*. 2017;46(3):341-346.

5: Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Hoshikawa M, Tanaka M, Nakatsuka T, Fujiwara H, Miyabayashi K, Takahashi R, Tanaka Y, Ijichi H, Nakai Y, Isayama H, Morishita Y, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Fukayama M, Koike K.

Stromal remodeling by the BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses the progression of human pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016 Sep 20;7(38):61469-61484.

6: Takahara N, Isayama H, Nakai Y, Ishigami H, Satoi S, Mizuno S, Kogure H, Matsubara S, Yamamoto N, Yamaguchi H, Tada M, Kitayama J, Watanabe T, Koike K.

Intravenous and intraperitoneal paclitaxel with S-1 for treatment of refractory pancreatic cancer with malignant ascites. *Invest New Drugs*. 2016 ;34(5):636-42.

7: Takahara N, Isayama H, Nakai Y, Sasaki T, Saito K, Hamada T, Mizuno S, Miyabayashi K, Mohri D, Kogure H, Matsubara S, Yamamoto N, Hirano K, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Koike K.

Pancreatic cancer with malignant ascites: clinical features and outcomes. *Pancreas*. 2015;44(3):380-5.

8: Nakai Y, Iwashita T, Park DH, Samarasena JB, Lee JG, Chang KJ. Diagnosis of pancreatic cysts: EUS-guided, through-the-needle confocal laser-induced endomicroscopy and cystoscopy trial: DETECT study. *Gastrointest Endosc.* 2015;81(5):1204-14.

9: Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Takahara N, Saito K, Ishigaki K, Hamada T, Mizuno S, Miyabayashi K, Yamamoto K, Mohri D, Kogure H, Yamamoto N, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Koike K. The inhibition of renin-angiotensin system in advanced pancreatic cancer: an exploratory analysis in 349 patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(5):933-9.

[学会発表](計6件)

1. Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Ijichi H, Nakai Y, Isayama H, Tanaka Y, Kokudo N, Fukayama M, Koike K. Epigenetic reprogramming of cancer-associated fibroblasts suppresses human pancreatic cancer progression *Pancreas* "Cell/Molecular Biology/Pathology Asian Pacific Digestive Week (APDW) 2016 2016/11/03 Kobe, Japan

2. 山本恵介, 立石敬介, 工藤洋太郎, 星川真有美, 田中麻理子, 中塚拓馬, 藤原弘明, 宮林弘至, 高橋良太, 伊地知秀明, 中井陽介, 伊佐山浩通, 森下保幸, 青木琢, 阪本良弘, 長谷川潔, 國土典宏, 深山正久, 小池和彦. Stromal remodeling by the BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses the progression of human pancreatic cancer. 第47回日本膵臓学会大会 Forum 10: Pancreatic Cancer Basic 1 2016/08/04 仙台

3. Mizuno S, Nakai Y, Isayama H, Yoshikawa T, Ishigaki K, Umefune G, Watanabe T, Takagi K, Akiyama D, Uchino R,

Takahara N, Kogure H, Matsubara S, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Hayashi N, Koike K. Pancreatic cystic lesions as one of the obesity-related diseases: an interesting association with metabolic syndrome IPMN & Cystic Neoplasm International Association of Pancreatology (IAP) 2016/08/05 Sendai, Japan

4. Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Hoshikawa M, Tanaka M, Nakatsuka T, Fujiwara H, Miyabayashi K, Takahashi R, Tanaka Y, Ijichi H, Nakai Y, Isayama H, Morishita Y, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Fukayama M, and Koike K. BET inhibition remodels tumor stroma and suppresses progression of human pancreatic cancer The 35th Sapporo International Cancer Symposium 2016 Cancer Epigenome: from discovery to translation 2016/06/24 Sapporo, Japan

5. Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Hoshikawa M, Tanaka M, Nakatsuka T, Fujiwara H, Miyabayashi K, Takahashi R, Tanaka Y, Ijichi H, Nakai Y, Isayama H, Morishita Y, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Fukayama M, and Koike K. BET inhibition remodels tumor stroma and suppresses progression of human pancreatic cancer American Association for Cancer Research (AACR) Special Conference: Pancreatic Cancer: Advances in Science and Clinical Care 2016/05/14 Orlando, FL

6. Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Miyabayashi K, Takahashi R, Nakatsuka T, Fujiwara H, Nakai Y, Tanaka Y, Ijichi H, Isayama H, Koike K. Emergence of CD47-high expression cells confers enhanced tumorigenicity upon KDM6B suppression in pancreatic cancer

American Association for Cancer Research
(AACR) Special Conference on Chromatin and
Epigenetics in Cancer 2016/5 Atlanta, GA

〔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

中井 陽介 (NAKAI YOUSUKE)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80466755

(2) 研究分担者

立石 敬介 (TATEISHI KEISUKE)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20396948

(2) 研究分担者

山本 恵介 (YAMAMOTO KEISUKE)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10608532

(2) 研究分担者

松原 三郎 (MATSUBARA SABURO)
埼玉医科大学・准教授
研究者番号：40750550

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()