

令和元年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10447

研究課題名(和文) 膵癌におけるバイオマーカーの探索および新規治療法の開発

研究課題名(英文) Discovering the biomarkers and development of new therapeutics in pancreatic cancer

研究代表者

浅野 賢道 (Asano, Toshimichi)

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：10756688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：免疫染色を用いた膵癌切除95症例のTK-1蛋白発現解析で、臨床情報との比較では陽性例と陰性例で予後に差を認めなかった($p=0.47$)。患者血清を用いた血中TK-1蛋白発現解析では、成人正常血清の陽性率7.7%と比較し高い値を示したがROC曲線ではAUC=0.64と低値となった。膵癌細胞株におけるFTDの細胞増殖に与える抑制効果に関する解析では、real time PCRおよびwestern blotting assayを行い、mRNA、タンパクとも高発現であるMIAPac2、PK-9と低発現のPanc-1、AsPc1を用い、MTT assayにて細胞増殖に与える影響を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TK-1 (thymidine kinase-1)に着目し、膵癌新規腫瘍マーカーの可能性を検討した。TK-1蛋白発現は膵癌患者血清中の38.4%で上昇(>80 U/L)し、成人正常血清の陽性率7.7%と比較し高値を示した。また抗癌剤のトリフルリジンは作用機序にTK-1を必須とするため、TK-1を発現亢進する膵癌細胞株に対する効果を検討した。トリフルリジンは他癌種で臨床使用されているが、膵癌への応用が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In TK-1 protein expression analysis of 95 cases of pancreatic cancer resected using immunostaining, 41 cases (43.2%) were positive and 54 cases (56.8%) were negative. There was no difference in prognosis between positive and negative cases compared with clinical information ($p = 0.47$). Blood TK-1 protein expression analysis using patient's serum increased in 38.4% of pancreatic cancer cases (> 80 U / L) and showed a high value compared with 7.7% positive rate of adult normal serum, but ROC curve Then, it became a low value with AUC = 0.64. Real time PCR and western blotting assays were performed to analyze the inhibitory effect of FTD on cell proliferation in pancreatic cancer cell lines, using MIAPac2 and PK-9, which are both highly expressed mRNA and protein, and Panc-1 and AsPc1 which are lowly expressed. The effect on cell proliferation was examined by MTT assay.

研究分野：消化器外科学

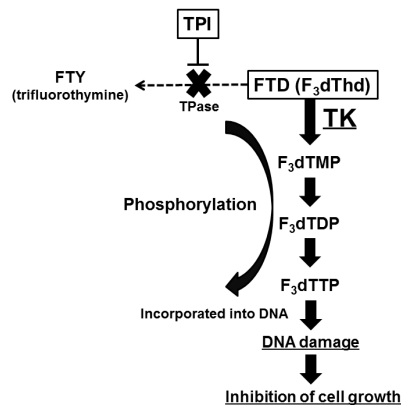
キーワード：膵癌 バイオマーカー 治療候補遺伝子

1. 研究開始当初の背景

現在の膵癌に対する最も有効な治療法は外科的切除である。しかし、膵癌は診断時にすでに肝転移や腹膜播種をきたし、高度進行状態となっていることが多く、切除可能症例は約 20%程度にとどまる。非切除症例を含めた膵癌全体の 5 年生存率は、わずか 8%に過ぎず、また我が国の膵癌死亡者数は年々増加傾向にあり、年間約 4 万人に達している。このような現状を打開するためには、可及的早期に膵癌を診断することが必須であり、より鋭敏な biomarker の確立が重要である。そして治療成績を飛躍的に向上させるためには、より有効な抗癌剤の新規治療法の開発が急務である。

これまで申請者らはマイクロダイセクションと cDNA マイクロアレイを用いた臨床検体の遺伝子発現の解析により、膵癌で特異的に発現亢進する遺伝子を複数同定した (Nakamura T, Hirano S, et al. Oncogene. 2004)。この網羅的遺伝子発現情報解析において膵癌で発現亢進する遺伝子 *TK-1* (*thymidine kinase-1*) を同定した。*TK-1* は膵癌組織において高頻度、高レベルに発現が上昇する遺伝子である。*TK-1* は細胞周期関連酵素であり、G1/S 期に増加し始め、S/G2 期にピークに達し、血清中に放出される。細胞分裂が盛んな癌細胞において *TK-1* は増加し、鋭敏な biomarker となる可能性がある。現在、CA19-9 が膵癌の腫瘍マーカーとして頻用されているが、慢性膵炎・胆管炎・慢性肝炎等の良性疾患で偽陽性を呈することがあり、日本人の約 10% が該当する Lewis 抗原 (a-b-) の場合には CA19-9 が産生されないため偽陰性になるなどの問題点も有している。*TK-1* は他の要因に影響されることがなく、有用な biomarker となる可能性が高い。また、非小細胞肺癌において *TK-1* は早期の病期から上昇すると報告されており (Alerge MM, et al. Anticancer Res. 2014)、膵癌においても同様の状況が明らかにされれば、極めて有用な早期診断法となり、多大な利益をもたらすことができる。

また、切除不能膵癌に対する化学療法については、ゲムシタピン塩酸塩とナブパクリタキセル併用療法や FOLFIRINOX 療法が一次化学療法として位置づけられているが、ゲムシタピン塩酸塩無効例や奏効後再燃例に対する十分な化学的根拠を有する化学療法は確立されていない。2014 年、DNA 機能阻害型のトリフルリジン (trifluridine; 以下、FTD) にその分解酵素であるチミジンホスホリラーゼを阻害する機能を有するチピラシル塩酸塩 (tipiracil hydrochloride; 以下、TPI) を配合した新規抗癌剤 (トリフルリジン・チピラシル塩酸塩配合錠) が、結腸・直腸癌に対し臨床適応となった。FTD はその作用機序に *TK-1* を必須としており、チミジル酸合成酵素を阻害するとともに DNA に取り込まれることで腫瘍増殖抑制作用を發揮する。*TK-1* は膵癌細胞にも高度に発現していることから、同新規抗癌剤は膵癌にも抗腫瘍効果を示すものと考えられ、FOLFIRINOX 療法あるいはゲムシタピン塩酸塩不応例や奏効後再燃例の二次化学療法の選択肢の一つとなり得ると思われる。さらに *TK-1* の血清中濃度は癌の volume に相関するとされ (Xiang Y, et al. Biomed Rep. 2013)、その血中濃度の推移から抗癌剤投与による治療効果の判断基準 (サロゲートマーカー) になり得るものと予想される。



2. 研究の目的

TK-1 (*thymidine kinase-1*) の遺伝子およびタンパク質発現の研究を通し、膵癌に対する新規バイオマーカーおよび新規治療法の開発することが本研究の最終目的である。具体的には、血清中 *TK-1* 活性および切除検体での *TK-1* 発現と膵癌患者の肝転移や予後との関連を検証し、また FTD の細胞増殖に与える影響について膵癌細胞株を用いて検討し、FTD の膵癌治療への応用について検証することを目的とする。

3. 研究の方法

【方法 1】

膵癌患者の血清における *TK-1* 活性および組織検体における *TK-1* 免疫染色と臨床情報を比較し、膵癌肝転移再発や予後との関連を検証した。組織検体の検討には TMA 法を用い、抗体は抗 *TK-1* モノクローナル抗体 (ab76495, abcam) を使用した。また血中の *TK-1* 測定は、血清中 Thymidine kinase 測定キット (ELISA) Divi Tum Kit (フナコシ販売) を用いた。

エーデン製)を使用した。

【方法2】

TK-1を高発現する膵癌細胞株 PCI43p5、Panc1 を用い FTD 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する。HeLa 細胞を用いた IC₅₀ の検討において FTD 濃度は 24 時間暴露で 13.4 μM であり、72 時間暴露で 4.9 μM であった (Tanaka N, et al. Oncol Rep. 2014)。以上を参考とし、本研究においては 1~20 μM の濃度での投与から検討した。細胞増殖に与える影響は MTT Assay を用いた。

4. 研究成果

【成果1】臨床検体における TK-1 発現状況と予後との関連、血清 TK-1 測定

半定量的 PCR 測定では、膵癌切除臨床検体において 12 例中 10 例で正常膵管上皮と比較して TK-1 m-RNA の発現亢進を認めた。また膵癌細胞株の Western blot では、全ての細胞株で TK-1 蛋白の高発現を認めるとともに、特に当科で樹立した高腹膜転移株である PCI43P5 での発現が高く、TK-1 が悪性度に関わる可能性が示唆された (図 1A-C)。また切除検体における TK-1 の免疫染色の条件検討を行い、鮮明な染色条件を確立した (図 1D)。

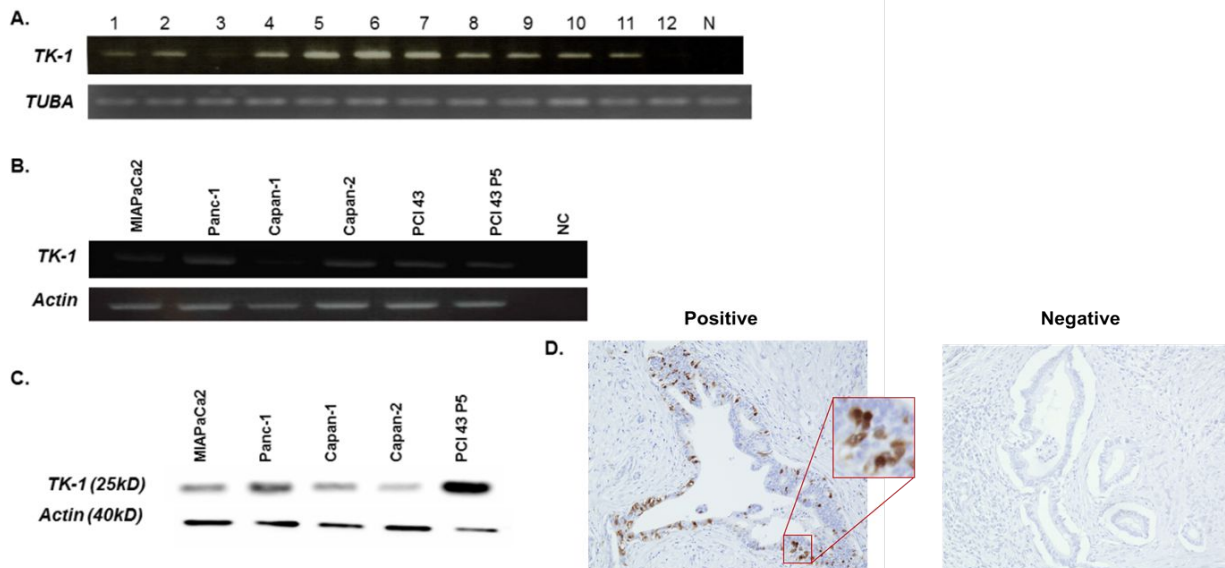


図 1. TK-1 の m-RNA (A, B) 発現と蛋白発現 (C, D)
A, B: RT-PCR, C: western blot, D: immunohistochemistry

この条件を基に、免疫染色を用いた膵癌切除 95 症例の TK-1 蛋白発現解析を施行したところ、陽性例が 41 例 (43.2%)、陰性例が 54 例 (56.8%) であった。臨床情報との比較では陽性例と陰性例で Overall survival に差は認めなかった ($p=0.47$)。今回の検討で、膵癌切除症例におけるより正確な TK-1 発現分布が約 40% であるとの結果が示された。

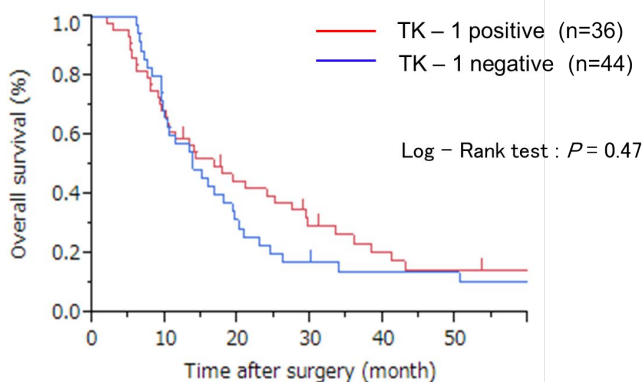


図 2 TK-1 蛋白発現と膵癌切除例の予後との関連

次に、ELISA 法を用い、膵癌患者血清での血中 TK-1 蛋白発現解析を検討した。
 Cut off 値を 5 U/L に設定すると、膵癌 13 症例の 38.4%で血清中の TK-1 上昇 (>80 U/L) を認め、成人正常血清 13 例の陽性率 7.7%と比較し高い値を示した。
 しかし、ROC 曲線では AUC=0.64 と期待したほどの高い値を示すには至らず、症例数を増やした今後の検討課題となった (図 3)。

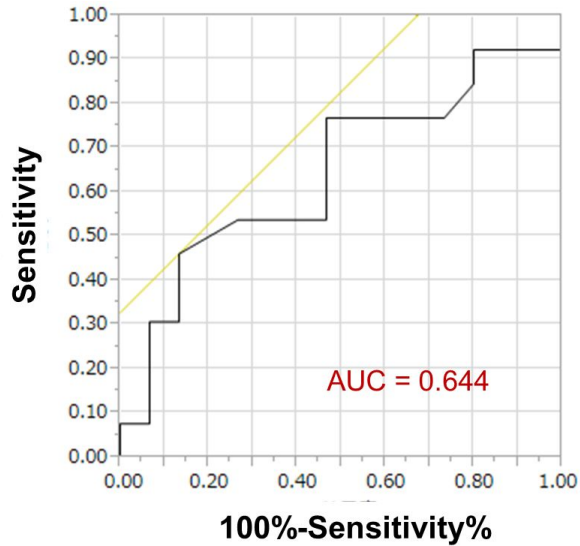


図3 TK-1蛋白発現と膵癌陽性率 (ROC曲線)

【成果 2】 膵癌細胞株における FTD の細胞増殖に与える抑制効果に関する検討

Real time PCR および western blotting assay を行い、mRNA、タンパクとも高発現である MIAPac2、PK-9 と低発現の Panc-1、AsPc1 を選択し (図 4)、MTT assay にて FTD 投与による細胞増殖に与える影響を検討した。

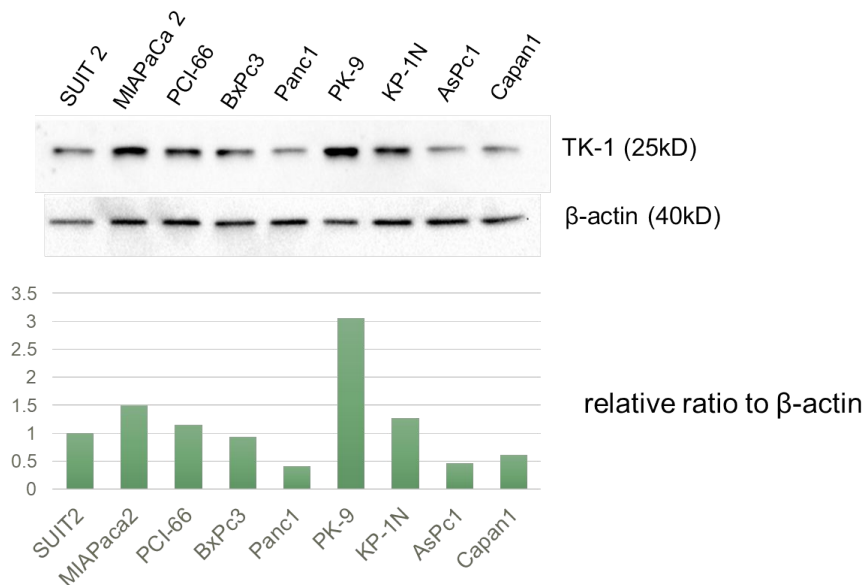


図4 膵癌細胞株におけるTK-1蛋白発現

T
 K-1 蛋白高発現の PK-9、MIAPac2 細胞株では、IC 50 はそれぞれ 10 μM/L、30 μM/L であった

のに対し、TK-1 低発現株の Panc-1、AsPc1 では IC 50 はそれぞれ 200 μ M/L、1000 μ M/L であり、TK-1 高発現細胞株では TK-1 低発現株と比較し 20 倍から 100 倍近くの効果の差があり、TK-1 の発現状況により、FTD の効果を予測可能と考えられた。

現在、FTD は結腸・直腸癌に対し臨床適応となっているが、本研究の成果から、新たに膵癌への臨床応用が期待され、TK-1 の発現状況に応じた至適化学療法の可能性を示唆する結果が示された。

以上より、TK-1 蛋白高発現を用いた膵癌の診断マーカーの開発は、ある一定の可能性が示されたが、腫瘍マーカーとしての有用性に関しては、疑問が残る結果であった。最近、欧米のグループから 500 例を超える大規模な膵癌を対象とした TK-1 を用いた血清マーカー研究の結果が示されたが (Pancreas 2018; 47: 72-79)、ROC 曲線における AUC は 0.63 であり、本研究結果と同様の結果であった。したがって、症例数を増加した場合でも、同様の傾向は変わらず、TK-1 の早期診断を目的とした腫瘍マーカーの可能性は低いと言わざるを得ない。

一方、FTD を用いた治療実験では、TK-1 の発現量に応じて細胞増殖抑制効果が示され、現状将来的に膵癌への適応拡大の可能性を提示できたと考える。さらにその際、血清もしくは組織生検により、TK-1 発現をモニタリングすることで、薬剤感受性に基づいた化学療法選択が可能となる。現在、一部の分子標的治療薬を除き、化学療法の選択は治療効果が予測できないまま同様の薬剤をすべての患者に投与する方法が主流である。しかし、効果の乏しい患者にとっては苦痛のみが付加され、全くメリットのない治療となってしまう。今回の結果から、効果が期待される患者にのみ投与が可能となれば、プレジジョンメディシンの実現が可能となり、無駄な投与が回避できることから、結果的に医療費の削減にもつながるものと考えられる。

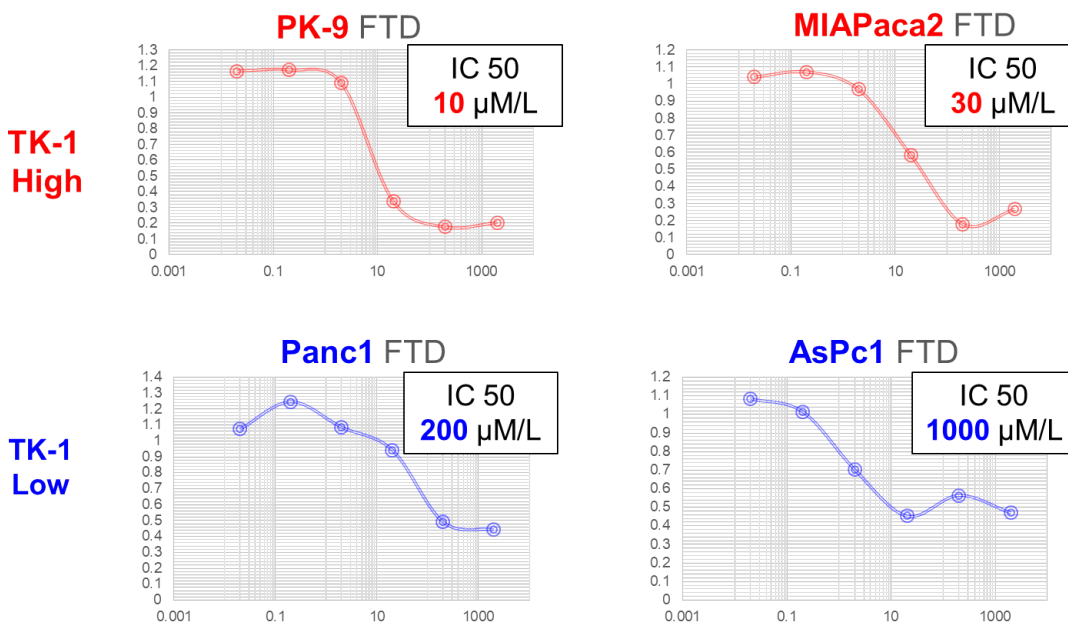


図5 膵癌細胞株におけるTK-1蛋白発現とFTDの効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 77 回日本癌学会(大阪)2018 年 9 月 29 日 J14-7 Pancreatic cancer 4;Thymidine Kinase-1 is potential target for tumor marker and therapy of pancreatic cancer, Toru Nakamura, Asano Toshimichi, Takahiro Tsuchikawa, Keisuke Okamura, Soichi Murakami, Yuma Ebihara, Yo Kurashima, Takehiro Noji, Yoshitugu Nakanishi, Kimitaka Tanaka, Toshiaki Shichinohe and Satoshi Hirano

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔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：平野 聡

ローマ字氏名：Hirano Satoshi

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院医学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：50322813

研究分担者氏名：中村 透

ローマ字氏名：Nakamura Toru

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院医学研究院

職名：助教

研究者番号（8桁）：70645796

研究分担者氏名：土川 貴裕

ローマ字氏名：Tsuchikawa Takahiro

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院医学研究院

職名：講師

研究者番号（8桁）：50507572

研究分担者氏名：平岡 圭

ローマ字氏名：Hiraoka Kei

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院医学研究院

職名：客員研究員

研究者番号（8桁）：10719587

(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。