

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591622

研究課題名（和文） 膵癌補助療法の個別化および分子標的治療を目指したアネキシン2の臨床応用

研究課題名（英文） The personalized therapy using Annexin II as a gemcitabine-resistant factor for pancreatic cancer patients after surgery.

研究代表者

高野 重紹 (TAKANO SHIGETSUGU)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20436380

研究成果の概要（和文）：

本研究では術後GEM補助化学療法が行われた膵癌切除標本92例の患者でAnx2蛋白発現を免疫染色の強弱2群に分けて検討すると、無再発生存期間で強発現群が有意に短かった。さらにGEM耐性膵癌細胞株を用い、シグナル伝達経路のリン酸化蛋白発現を測定し、GEM耐性株でp-Aktの発現が増強し、Anx2抑制にてp-Aktが抑制された。GEMとmTOR阻害剤の併用によりGEM耐性株の耐性化が解除された。膵癌細胞のGEM耐性化にAkt/mTOR経路が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Background: Although gemcitabine has been widely used as a first-line chemo reagent for patients with pancreatic cancer, the response rate still remains low. We previously identified Annexin II as a factor involved in gemcitabine resistance against pancreatic cancer. The aim of this study was to elucidate the signaling mechanism by which Annexin II induces gemcitabine resistance and to develop a new therapy which overcomes the resistance against gemcitabine.

Materials and methods: We comprehensively investigated and compared the specific profiles of 12 targeted phosphorylated signaling proteins in gemcitabine-resistant (GEM-MIA PaCa-2) and wild-type (WT-MIA PaCa-2) pancreatic cancer cell lines by the Bio-Plex phosphorylation protein assay system. We also evaluated the expression levels of Annexin II and two phosphoproteins, which showed different expression in these two cell lines, by immunohistochemistry of pancreatic cancer tissues.

Results: Annexin II overexpression in cancer cells was significantly associated with rapid recurrence after gemcitabine-adjuvant chemotherapy in patients with resected pancreatic cancer ($P = 0.0118$). Bio-Plex analysis showed upregulation of p-Akt in GEM-MIA PaCa-2 cells in which Annexin II is highly expressed. On immunohistochemistry, the expression level of p-Akt was significantly correlated with that of p-mTOR in pancreatic cancer tissues. Inhibition of mTOR phosphorylation canceled gemcitabine resistance in GEM-MIA PaCa-2 cells.

Conclusion: The Akt/mTOR pathway is involved in the mechanisms of gemcitabine resistance induced by Annexin II in pancreatic cancer cells. Annexin II as an indicator for selection of gemcitabine resistance could thus be applied to the development of novel tailor-made approaches for pancreatic cancer treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓外科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌、大腸癌、肝臓癌、膵癌などの消化器癌は、癌罹患率の大半を占め、依然予後不良の疾患である。特に膵癌は消化器癌の中でも最も予後不良の癌として知られ、その理由として早期発見が困難で、周囲臓器への浸潤・転移を来しやすく、診断時既に進行癌となり切除率が低く、有効な補助療法が確立されていないことが挙げられる。従って、唯一根治が期待される外科切除の効率を向上させる為にも、分子標的治療薬を含むより有効な化学療法を開発し、集学的治療の効果を上げることで治療成績の向上を図ることが急務である。

(2) 膵癌はさまざまな抗癌剤に対し低感受性であったが、近年 Gemcitabine (GEM) の有効性が報告され (Burris HA et al., *J Clin Oncol* 1997)、現在では膵癌に対する first-line 化学療法として国内外において広く用いられている。しかし、GEM は膵癌症例の全てに対して有効ではなく、その効果増強を目的に、様々な分子標的治療薬が GEM との combination therapy の候補薬として臨床試験が行われている。その中で、Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 阻害剤 (Erlotinib) は初めて有意な生存期間延長を認めた分子であるが (Moore MJ et al., *J Clin Oncol* 2007)、臨床的には明らかに有効と思われる結果ではなく、膵癌克服のためにはさらなる新規分子標的因子の同定が望まれる。

2. 研究の目的

膵癌は消化器癌の中でも予後不良の疾患であり、特に薬剤に対する治療抵抗性が治療成績を悪化させている一因である。そこで本研究の目的は、我々が膵癌に対するプロテオーム解析で見出した、抗癌剤耐性因子 Annexin II (Anx2) による膵癌の薬剤耐性獲得の機序を解明し、新しい標的分子として治療、特に個別化治療へ応用することである。

現在まで、我々は当科で根治手術施行され術後 GEM による補助化学療法が行われた膵癌切除標本の免疫染色を行い、Anx2 発現の強弱により 2 群に分けて比較検討すると、強発現群は弱発現群に比べ、無再発生存期間が有意に短く (P=0.0078)、臨床病理学的

因子との多変量解析で強発現群は独立した再発予後因子である (P=0.0047) という結果を得ている。(Takano S et al., *Ann Surg Oncol*. 2008)

これらの結果をふまえて、本研究においては生体内での Anx2 の機能を抑制する方法を模索し、臨床応用可能な治療法の開発を目指す。その方法として近年の遺伝子導入技術を用い、より効果的な生体投与を可能とし癌組織内での Anx2 発現を抑制する方法を模索し、新しい遺伝子治療として臨床応用に活用する。また一方で、その他の阻害方法についても検討する。以上のような研究を通して新しい膵癌の分子標的治療法および個別化治療を確立し、膵癌患者の予後改善へ大きく寄与するよう目指す。

3. 研究の方法

本研究の計画・方法は プロテオミクスの手法により見出し、同定された新規膵癌抗癌剤耐性因子である Annexin II (Anx2) を標的分子として活用することにより、膵癌切除標本の Anx2 免疫染色法で GEM の効果を予測することによる術後補助療法の最適化を行うこと。Anx2 の薬剤耐性機序を詳細に解明し、中和抗体や RNAi を用いて膵癌細胞の Anx2 発現阻害・抑制したときの GEM 殺細胞効果の増強を確認し、さらにどのシグナル伝達経路が GEM 耐性化に関連しているかを明らかにすることで、GEM 耐性膵癌に対する新規分子標的治療薬の有効な臨床応用を目指した。

(1) 免疫組織染色法による術後補助化学療法の効果予測

我々は以前、当科で確立された GEM 耐性膵癌細胞株とその野生株の間での蛋白発現をアガロース 2 次元電気泳動法を用い展開、2 株間で差異を認めたスポットを同定し、その 1 つが Anx2 であることを見出した。そこで、当科で根治手術施行され術後 GEM による補助化学療法が行われた 62 例の膵癌切除標本の免疫染色を行い、Anx2 発現の染色性を強弱の 2 群に分けて比較検討すると、強発現群は弱発現群に比べ、Kaplan-Meier 法で無再発生存期間が有意に短く、臨床病理学的因子との多変量解析で強発現群は独立した再発予後因子であった。以上の結果をふま

え、今回症例数を蓄積し、follow-up 期間を延長することにより同様の結果が得られるか、さらに術後 GEM を行っていない群との比較も加え validation を行った。

(2) 膵癌細胞における Anx2 の cell signal pathway への関与の解明

Anx2 の膵癌細胞における Anx2 は EGFR と共に t-PA の結合部位として膵癌細胞膜に発現しており、膵癌の浸潤能に関与している

(Diaz VM et al., *Gut* 2004) という報告がなされ、2007 年になり初めて、EGFR と同様に Anx2 を介した ERK signal 経路の活性化が報告された。我々は Anx2 に特異的 siRNA を用いて Anx2 発現を抑制することで膵癌細胞においてどの signal pathway が活性化もしくは不活化されるかを GEM 耐性膵癌細胞株とその親株のリン酸化蛋白発現を網羅的に測定し比較検討することにより見出す。

4. 研究成果

(1) 免疫組織染色法による術後補助化学療法の効果予測；当科で根治手術施行され術後 GEM による補助化学療法が行われた膵癌切除標本 9 2 例の患者群において Anx2 蛋白の免疫染色を行い、発現の染色性を強弱の 2 群に分けて Kaplan-Meier 法により比較検討したところ、以前と同様に無再発生存期間で Anx2 強発現群が有意に短かった ($p=0.0118$)。一方、術後 GEM を用いなかった群 15 例を対象に解析すると無再発生存期間において差異を認めず、むしろ Anx2 弱発現群の無再発生存期間の方が短い傾向にあった。

(2) In vitro における Anx2 阻害による GEM 殺細胞効果増強の検討；当科で確立した GEM 耐性膵癌細胞株を用い、Anx2 の細胞内の働きをみるため Anx2 特異的な siRNA を用いて Anx2 蛋白発現を抑制したときの細胞内シグナル伝達経路の解明を行った。代表的な細胞内シグナル伝達経路のリン酸化蛋白発現を網羅的に計測すると、GEM 耐性膵癌細胞においては p-Akt の発現がコントロールと比較し増強していること、さらに Anx2 を抑制した時に p-Akt が抑制されることが判明した。

免疫染色で膵癌切除標本における p-Akt と p-mTOR 発現の関連を確認すると正の相関関係が認められた ($p=0.0005$)。

膵癌における p-Akt 発現と p-mTOR 発現の関連が認められたことから、mTOR 阻害剤を用いて GEM 耐性株の殺細胞効果を検討すると、GEM と mTOR 阻害剤の combination を行うことにより、GEM 耐性株においても親株と同様の殺細胞効果が得られることが示された。

これらの結果より膵癌細胞の GEM 耐性化に PI3K/Akt/mTOR pathway の活性化が関与

していることが判明した。今後、切除標本における Anx2 の発現が GEM 耐性膵癌に対する術後補助療法選択の 1 つの指標となり、有効な個別化治療へ応用できる可能性が示唆された。

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 8 件)

1. Takano S, Sogawa K, Yoshitomi H, Shida T, Mogushi K, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Ishihara T, Tanaka H, Yokosuka O, Nomura F, Miyazaki M. Increased circulating cell signalling phosphoproteins in sera are useful for the detection of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2010, 103(2), 223-31. 査読有り
2. Miyazaki M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Otuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Takano S. One hundred seven consecutive surgical resections for hilar cholangiocarcinoma of Bismuth types II, III, IV between 2001 and 2008. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010, 17(4), 470-5. 査読有り
3. Shida T, Kishimoto T, Furuya M, Nikaido T, Koda K, Takano S, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Tanizawa T, Nakatani Y, Miyazaki M. Expression of an activated mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010, 65(5), 889-93. 査読有り
4. Takano S, Yoshitomi H, Togawa A, Sogawa K, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Tomonaga T, Nomura F, Miyazaki M. Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 2008, 27(20), 2810-22. 査読有り
5. Takano S, Togawa A, Yoshitomi H, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Tomonaga T, Nomura F, Miyazaki M. Annexin II overexpression predicts rapid recurrence after surgery in pancreatic cancer patients undergoing gemcitabine -adjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2008, 15(11), 3157-68. 査読有り
6. Nomura S, Yoshitomi H, Takano S, Shida

- T, Kobayashi S, Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Kato A, Miyazaki M. FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2008, 99(2), 305-13. 査読有り
7. Shida T, Furuya M, Kishimoto T, Nikaido T, Tanizawa T, Koda K, Oda K, Takano S, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Nakatani Y, Miyazaki M. The expression of NeuroD and mASH1 in the gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumors. *Mod Pathol*. 2008, 21(11), 1363-70. 査読有り
8. Seimiya M, Tomonaga T, Matsushita K, Sunaga M, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T, Takano S, Togawa A, Yoshitomi H, Otsuka M, Yamamoto M, Nakano M, Miyazaki M, Nomura F. Identification of novel immunohisto-chemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and formiminotransferase cyclodeaminase. *Hepatology*. 2008, 48(2), 519-530. 査読有り

[学会発表] (計3件)

- ①高野 重紹
膵癌個別化治療の臨床応用を目指した translational research
第110回日本外科学会総会
平成22年4月9日
名古屋
- ②高野 重紹
個別化治療を目指した膵癌における Gemcitabine 術後補助化学療法の効果予測
第71回日本臨床外科学会総会
平成21年11月21日
京都
- ③高野 重紹
膵癌分子標的治療薬としての Annexin II 臨床応用への挑戦
第108回日本外科学会総会
平成20年5月17日
長崎

[産業財産権]

- 取得状況 (計1件)
名称：膵癌用抗癌剤の耐性検査マーカー、膵癌用抗癌剤の補助治療薬
発明者：高野重紹、外川 明、野村文夫
宮崎 勝
権利者：国立大学法人 千葉大学
種類：特許
番号：第4621923号
取得年月日：平成22年11月12日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 重紹 (TAKANO SHIGETSUGU)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20436380

(2) 研究分担者

吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60375631
古川 勝規 (FURUKAWA KATSUNORI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00400987
加藤 厚 (KATO ATSUSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70344984
清水 宏明 (SHIMIZU HIROAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：80272318
宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70166156
志田 崇 (SHIDA TAKASHI)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：60456019