

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15408

研究課題名（和文）膵癌の治療抵抗性に関わる責任遺伝子ANXA8の機能的意義の解明と治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of the functional role of ANXA8 in pancreatic cancer resistance to MAPK inhibitors and its therapeutic application

研究代表者

黒木 秀作（Kurogi, Shusaku）

大分大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：50905213

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：これまでの研究において、研究代表者は膵癌のMAPK阻害薬治療抵抗性に関与する分子としてANXA8を見出した。本研究では、ヒト膵癌組織におけるANXA8の発現動態と臨床病理学的因子との関連性の解析およびANXA8の機能的意義の解明を試みた。その結果、ANXA8は低分化癌で発現亢進していること、また、MAPK阻害薬に低感受性の膵癌細胞株では、MAPK阻害薬によりANXA8が誘導され、ANXA8を抑制するとMAPK阻害薬への感受性が高まることを明らかにした。今後は、ANXA8の発現を抑制する化合物を探索し、ANXA8標的治療の実用化に向けて研究を加速させたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は5年生存率が10%未満と予後不良な癌である。膵癌は、約90%の症例で活性型K-ras変異によるMAPK経路の活性化が生じており、MAPK経路は重要な治療標的と考えられているが、膵癌患者を対象とした臨床試験において有効性は得られていない。本研究では、MAPK阻害薬抵抗性に関わる分子としてANXA8を見出し、ANXA8の発現を抑制するとMAPK阻害薬の抗腫瘍効果が高まることを明らかにした。すなわち、MAPK阻害薬とANXA8標的治療を併用することで、これまでにMAPK阻害薬が無効とされた膵癌症例に新たな治療戦略を提供できる可能性が期待でき、その社会的意義は極めて大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In previous studies, we identified ANXA8 as a molecule involved in MAPK inhibitor resistance in pancreatic cancer. In this study, we investigated the association between ANXA8 expression and clinicopathological factors in pancreatic cancer tissues and attempted to elucidate the functional significance of ANXA8. We found that ANXA8 was frequently upregulated in poorly differentiated pancreatic cancer. We also found that ANXA8 was induced by MAPK inhibitors in MAPK inhibitor-resistant pancreatic cancer cell lines and that suppression of ANXA8 enhanced the anti-proliferative effect of MAPK inhibitors. We plan to conduct further studies to identify compounds that inhibit ANXA8 expression in order to develop novel ANXA8-targeted therapies for pancreatic cancer patients.

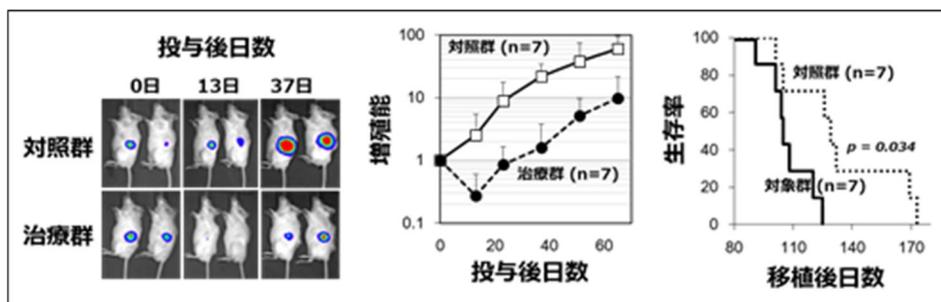
研究分野：分子病理学

キーワード：膵癌 ANXA8 MAPK阻害薬

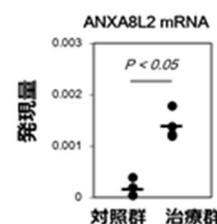
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は最も予後不良な癌のひとつで、5年生存率は10%に満たない。この絶望的な治療成績を改善するためには、膵癌の発症・進展に関わる分子メカニズムを解明して、その知見に基づく新規治療法の開発が強く望まれる。私の所属する研究室では、これまでの研究において、(1)膵癌の浸潤過程で8番染色体短腕の欠失に伴いDUSP4遺伝子の発現が低下していること、(2)DUSP4遺伝子の発現低下は、Mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化を介して膵癌細胞の浸潤能を亢進させること、(3)MAPK阻害薬が膵癌治療に有効であることを明らかにした(Cancer Res, 2016 76: 2626-2636)。しかし、これまでに施行された臨床試験では、膵癌患者に対するMAPK阻害薬の有効性は示されていない。そこで、生体での膵癌細胞に対するMAPK阻害薬の効果を検証するために、ヒト膵癌細胞を同所移植した免疫不全マウスを用いて治療実験を施行した(下左図)。治療群では投与開始直後から腫瘍の増殖が抑制されて、2週目ごろには検出限界値以下まで縮小した。しかし、すぐに抗腫瘍効果は消失して、2週目以降は治療群と対照群の腫瘍はほぼ同様な増大傾向を示した(下中図)。その結果、治療群の生存期間はわずかに延長したものの、最終的には両群のすべてのマウスが癌死に至った(下右図)。以上の結果から、治療群ではMAPK阻害薬への耐性獲得に関わる分子機序が早期に発動されることが示唆された。



「なぜMAPK阻害薬は膵癌に効かなくなるのか？」この問いに対し、私は対照群と治療群の腫瘍発現プロファイルを比較することにより、治療抵抗性に関わる候補分子としてANXA8を抽出した(右図)。しかし、「ANXA8が、どのような分子機序でMAPK阻害薬に対する抵抗性をもたらすのか？」についてはまだ明らかになっていない。ANXA8の機能的意義を解明することは、膵癌の治療抵抗性を理解して、その抵抗性を標的とした新規治療法を開発する上で、極めて重要な課題である。



2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点である。

- (1) ヒト膵癌組織におけるANXA8の発現レベルと臨床病理学的因子との相関を解析する。
- (2) 膵癌細胞におけるANXA8の機能を明らかにして標的治療の可能性を検討する。
- (3) ANXA8標的治療の動物実験モデルを確立してその有効性を検証する。

3. 研究の方法

【2022年度の計画】

- (1) 膵癌組織、細胞株におけるANXA8発現レベルを解析する。
ヒト膵癌組織におけるANXA8発現レベルを免疫組織化学で確認する。また、ANXA8発現レベルと臨床病理学的因子との相関について検討する。
膵癌細胞株におけるANXA8の発現レベルと、MAPK阻害薬に対する感受性との関連性を調べる。
- (2) ANXA8の発現変動に伴う細胞形質への影響を検証する。
ANXA8高発現細胞株について、CRISPR/Cas9システムを用いてノックアウト細胞株を樹立し、増殖能(MTS法)や浸潤能(Boyden chamber法)、生存能(アポトーシス解析)、細胞周期(FACS解析)への影響を調べる。
ANXA8低発現細胞株について、ドキシサイクリン誘導性にANXA8を発現する細胞株を樹立する。ANXA8の発現誘導によって変動する細胞形質について、と同様に調べる。
ANXA8の発現消失あるいは発現誘導によってMAPK阻害薬の薬効性が変動するかを調べる。

【2023年度以降の計画】

- (3) ANXA8の発現によって変動するシグナル経路を同定する。
樹立したANXA8ノックアウト細胞株およびANXA8発現誘導細胞株を用いて、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行う。ANXA8の発現消失あるいは発現誘導に伴って発現が変動

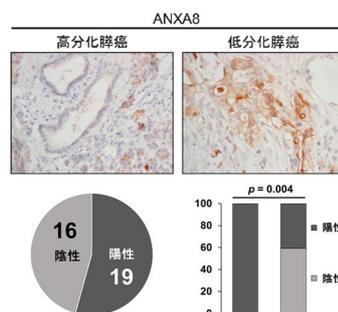
する遺伝子群を抽出し、それらが担うシグナル経路の概要を得る。得られたシグナル経路の概要を基に ANXA8 が関わるシグナル経路を同定する。同定したシグナル経路が ANXA8 の発現誘導により活性化あるいは不活化されていること、またパスウェイ解析では抽出されなかったシグナル経路が存在するかを確認するために、リン酸化タンパクアレイを用いて検証する。同定したシグナル経路を構成する分子について、すでに特異的阻害剤や活性化剤が存在する分子があれば、それらが細胞形質や MAPK 阻害薬の薬効性に関与しているかを *in vitro* で検討する。特異的阻害剤や活性化剤がない分子の場合は、ノックアウト細胞株や発現誘導細胞株を樹立し、機能解析を行う。

- (4) ヒト膵癌細胞移植モデルを用いて ANXA8 標的治療法の有効性を検証する。ANXA8 ノックアウト細胞株およびその親株を、それぞれ免疫不全マウスに移植する。細胞が生着して腫瘍を形成した後に MAPK 阻害薬の投与を開始して、投与 1 ヶ月後に全例犠死させる。ANXA8 発現消失による治療効果の変化と副反応について検討する。ドキシサイクリン誘導性に ANXA8 を発現する細胞株およびその親株を、それぞれ免疫不全マウスに移植する。細胞が生着して腫瘍を形成した後に、ドキシサイクリンを投与して ANXA8 の発現を誘導する。投与 2 ヶ月後に全例犠死させ、ANXA8 発現に伴う腫瘍の大きさ、転移巣形成、生存期間の変化などを観察する。マウス同所移植モデルを用いて ANXA8 の発現を誘導し、MAPK 阻害薬の薬効性が変動するかを調べる。また、ANXA8 の発現によって変動するシグナル経路を標的とした治療実験を行い、単独治療による効果や MAPK 阻害薬との併用療法による効果を検証する。

4. 研究成果

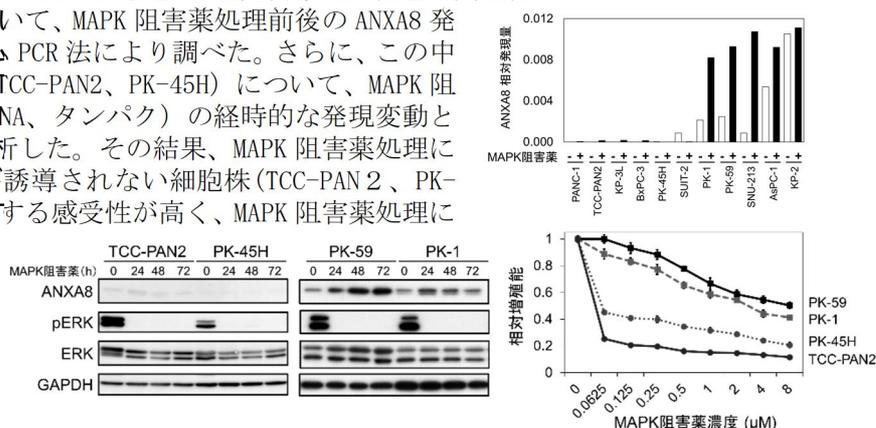
- (1) ヒト膵癌組織における ANXA8 発現動態と臨床病理学的因子との関連性

ヒト膵癌組織 35 例を用いて免疫組織化学を施行し、ヒト膵癌における ANXA8 発現動態を解析した。ANXA8 陽性症例は、35 例中 19 例 (約 54%) でみられた。また、臨床病理学的因子との関連性について解析を行い、分化度との有意な相関を認め、低分化癌では ANXA8 の発現が亢進していることを明らかにした (右図)。



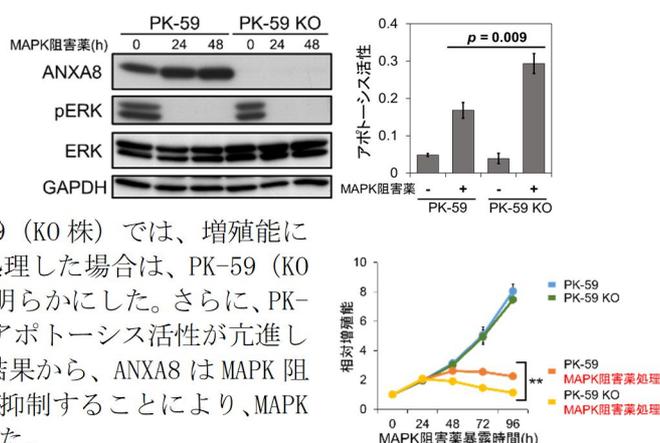
- (2) 膵癌細胞株における ANXA8 発現動態と MAPK 阻害薬感受性との関連性

膵癌細胞株 11 株について、MAPK 阻害薬処理前後の ANXA8 発現レベルをリアルタイム PCR 法により調べた。さらに、この中の 4 株 (PK-59、PK-1、TCC-PAN2、PK-45H) について、MAPK 阻害薬処理後の ANXA8 (RNA、タンパク) の経時的な発現変動と MAPK 阻害薬感受性を解析した。その結果、MAPK 阻害薬処理によって ANXA8 の発現が誘導されない細胞株 (TCC-PAN2、PK-45H) は MAPK 阻害薬に対する感受性が高く、MAPK 阻害薬処理によって ANXA8 の発現が誘導される細胞株 (PK-59、PK-1) は MAPK 阻害薬に対する感受性が低いことを明らかにした (右図)。



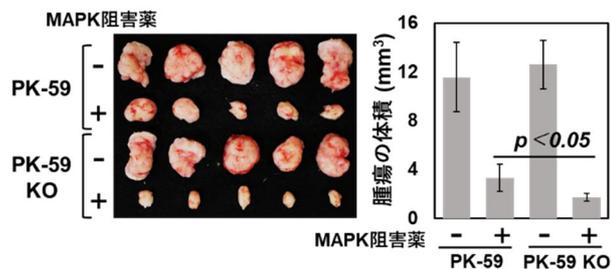
- (3) ANXA8 ノックアウトによる細胞形質への影響

MAPK 阻害薬処理によって ANXA8 の発現が誘導され、MAPK 阻害薬に低感受性を示す膵癌細胞株 (PK-59) について、CRISPR/Cas9 システムを用いて ANXA8 ノックアウト細胞株 (PK-59 KO 株) を樹立し、MAPK 阻害薬感受性や増殖能、生存能に与える影響について解析した。その結果、PK-59 (親株) と PK-59 (KO 株) では、増殖能に変化は認められなかったが、MAPK 阻害薬で処理した場合は、PK-59 (KO 株) において有意に増殖が抑制されることを明らかにした。さらに、PK-59 (KO 株) では、MAPK 阻害薬処理によってアポトーシス活性が亢進していることを明らかにした (右図)。以上の結果から、ANXA8 は MAPK 阻害薬によって引き起こされるアポトーシスを抑制することにより、MAPK 阻害薬抵抗性に関与していることが示唆された。



(4) 膵癌細胞株マウス皮下移植モデルによる ANXA8 標的治療の効果の検証

これまでの *in vitro* での実験において、MAPK 阻害薬処理によって ANXA8 の発現が誘導される膵癌細胞株では、MAPK 阻害薬に抵抗性を示すこと、さらに、ANXA8 の発現を欠失させると、MAPK 阻害薬の増殖抑制効果が高まることを明らかにした。そこで、*in vivo* においても ANXA8 が MAPK 阻害薬抵抗性に関与しているか調べるために、膵癌細胞株マウス皮下移植モデルを用いて、MAPK 阻害薬による治療実験を施行した。膵癌細胞株は、MAPK 阻害薬に抵抗性を示す PK-59 (親株) と、PK-59 の ANXA8 ノックアウト株 (PK-59 KO 株) を使用した。未治療群においては、PK-59 (親株) と PK-59 (KO 株) の腫瘍形成能に有意な差は認められなかった。一方、MAPK 阻害薬治療群では、PK-59 (KO 株) において、腫瘍形成能が有意に抑制されることを明らかにした (右図)。以上の結果から、ANXA8 は *in vivo* においても MAPK 阻害薬抵抗性に関与していることが示唆された。



今後は、MAPK 阻害薬治療抵抗性関連分子である ANXA8 を標的とした新規治療法を開発するために、ANXA8 の発現を抑制する化合物の探索と ANXA8 発現制御メカニズムの解明に向けて研究を進展させていく計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fuchino T, Kurogi S, Tsukamoto Y, Shibata T, Fumoto S, Fujishima H, Kinoshita K, Hirashita Y, Fukuda M, Nakada C, Itai Y, Suzuki K, Uchida T, Shiroshita H, Matsumoto T, Yamaoka Y, Tsutsumi K, Fukuda K, Ogawa R, Mizukami K, Kodama M, Inomata M, Murakami K, Moriyama M, Hijiya N	4. 巻 37
2. 論文標題 Characterization of residual cancer by comparison of a pair of organoids established from a patient with esophageal squamous cell carcinoma before and after neoadjuvant chemotherapy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 491 ~ 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-023-01020-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aiba T, Hijiya N, Akagi T, Tsukamoto Y, Hirashita Y, Kinoshita K, Uchida T, Nakada C, Kurogi S, Ueda Y, Shiroshita H, Shiraishi N, Murakami K, Inomata M, Moriyama M	4. 巻 91
2. 論文標題 Overexpression of VSNL1 Enhances Cell Proliferation in Colorectal Carcinogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 121 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000533877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Y, Kurogi S, Fujishima H, Shibata T, Fumoto S, Nishiki K, Suzuki K, Etoh T, Shiraishi N, Fuchino T, Hirashita Y, Nakada C, Uchida T, Inomata M, Moriyama M, Hijiya N	4. 巻 114
2. 論文標題 Association of immune related expression profile with sensitivity to chemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4459 ~ 4474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15942	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Y, Hirashita Y, Shibata T, Fumoto S, Kurogi S, Nakada C, Kinoshita K, Fuchino T, Murakami K, Inomata M, Moriyama M, Hijiya N	4. 巻 15
2. 論文標題 Patient-Derived Ex Vivo Cultures and Endpoint Assays with Surrogate Biomarkers in Functional Testing for Prediction of Therapeutic Response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4104 ~ 4104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15164104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita K, Tsukamoto Y, Hirashita Y, Fuchino T, Kurogi S, Uchida T, Nakada C, Matsumoto T, Okamoto K, Motomura M, Fukuchi S, Sagami R, Nagai T, Gotoh Y, Fukuda K, Ogawa R, Mizukami K, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Moriyama M, Hijiya N	4. 巻 103
2. 論文標題 Efficient Establishment of Bile-Derived Organoids From Biliary Cancer Patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 100105 ~ 100105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.labinv.2023.100105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Amada K, Hijiya N, Ikarimoto S, Yanagihara K, Hanada T, Hidano S, Kurogi S, Tsukamoto Y, Nakada C, Kinoshita K, Hirashita Y, Uchida T, Shin T, Yada K, Hirashita T, Kobayashi T, Murakami K, Inomata M, Shirao K, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M	4. 巻 114
2. 論文標題 Involvement of clusterin expression in the refractory response of pancreatic cancer cells to a MEK inhibitor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2189 ~ 2202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15735	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Y, Kurogi S, Shibata T, Suzuki K, Hirashita Y, Fumoto S, Yano S, Yanagihara K, Nakada C, Mieno F, Kinoshita K, Fuchino T, Mizukami K, Ueda Y, Etoh T, Uchida T, Hanada T, Takekawa M, Daa T, Shirao K, Hironaka S, Murakami K, Inomata M, Hijiya N, Moriyama M	4. 巻 102
2. 論文標題 Enhanced phosphorylation of c-Jun by cisplatin treatment as a potential predictive biomarker for cisplatin response in combination with patient-derived tumor organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1355 ~ 1366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-022-00827-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒木秀作、泥谷直樹、塚本善之、中田知里、猪股雅史、小林隆志、守山正胤
2. 発表標題 膵癌においてANXA8はMAPK阻害薬耐性に関与する
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 泥谷直樹、塚本善之、黒木秀作、中田知里、守山正胤
2. 発表標題 Clusterinは膵癌細胞のMAPキナーゼ不応性に関する
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塚本善之、瀧野貴文、黒木秀作、柴田智隆、藤島紀、板井勇介、麓祥一、猪股雅史、村上和成、泥谷直樹
2. 発表標題 術前化学療法の効果が低かった食道癌1例の化学療法前・後から樹立した癌オルガノイドの解析
3. 学会等名 第41回 日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塚本善之、黒木秀作、柴田智隆、鈴木浩輔、藤島紀、麓祥一、平下有香、中田知里、泥谷直樹、守山正胤
2. 発表標題 シスプラチン処理後のc-Junリン酸化亢進をバイオマーカーとした食道癌術前化学療法の効果予測
3. 学会等名 第112回 日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗癌剤の治療効果を予測するためのデータの取得方法、抗癌剤のスクリーニング方法、および、抗癌剤の効果予測バイオマーカーのスクリーニング方法	発明者 塚本善之、黒木秀作、平下有香	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2023-048755	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------