

201438074A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

新規バイオマーカーPRDM14による難治性乳がん・すい臓がんの診断法の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 今井 浩三

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人東京大学 総長 濱田 純一 代理人 国立大学法人東京大学 医科学研究所 事務部長 紺野 喜久恵 が実施した平成26年度「新規バイオマーカーPRDM14による難治性乳がん・すい臓がんの診断法の開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
新規バイオマーカーPRDM14による難治性乳がん・すい臓がんの診断法の開発 ……	1
今井浩三	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. PRDM14分子の組織診断（病理診断バイオマーカー）の検証 ……	7
宮城洋平	
2. 統合的オミックス解析によるPRDM14の発現と高い相関性を有する 分泌タンパク遺伝子（血清診断バイオマーカー候補）のスクリーニング ……	9
前佛 均	
3. 統合的オミックス解析による診断バイオマーカー同定、CTC分取・解析 ……	13
谷口博昭	
III. 学会等発表実績 ……	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……	23

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

新規バイオマーカーPRDM14による難治性乳がん・すい臓がんの診断法の開発

業務主任者 今井 浩三 東京大学医科学研究所 特任教授

研究要旨

我々は、有効な治療法が未開発、早期発見することが困難なため難治性となっているトリプルネガティブ乳がん、膵臓がんにおいて発現亢進する標的分子 PRDM14 を同定した。同分子の乳がん、膵臓がん臨床検体における POC をすでに取得、さらに、遠隔転移、抗がん剤耐性を制御していることが判明し特許出願した。以上の成果に基づき、① PRDM14 分子を組織診断に用いて病理診断バイオマーカーとして最適を検証する、② 統合的オミックス解析により、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子をスクリーニングする。③ 同一患者血清を用いて、ELISA 法により血清診断バイオマーカー候補と PRDM14 分子の相関性をバリデーションする。これまでの実績から確実に、トリプルネガティブ乳がん、膵臓がんの病理診断バイオマーカー、血清診断バイオマーカーの確立が見込まれ、日本から国際的に通用するバイオマーカー、コンパニオンマーカーが発信できる。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

- ・ 今井浩三 東京大学医科学研究所 特任教授
- ・ 宮城洋平 神奈川県立がんセンター臨床研究所 部長
- ・ 前佛均 国立がん研究センター研究所 ユニット長
- ・ 谷口博昭 東京大学医科学研究所 特任准教授

A. 研究目的

標的分子 PRDM14 は、がん部特異的に発現亢進するため診断バイオマーカーとして最適である。我々は同分子の乳がんに関する診断に関する基本特許（2012-253108 号）を成立させ、さらに、乳がん、膵臓がんの臨床検体を使用して PRDM14 の過剰発現と病理組織学的因子との関連性に関する特許を申請中（2014-141278 号）である。

以上の我々の基礎研究の結果から、有効な治療法が未開発、早期発見が困難なため難治性とな

っているがんであるトリプルネガティブ乳がん (TNBC) や膵臓がんにおいて発現亢進する特性を有している PRDM14 分子は、難治性がんを対象とした診断バイオマーカーとして最適な候補と言える。

最近、アントラサイクリン、タキサン系薬剤に高感受性の TNBC がサブカテゴリーとして判明しているが、一方でこれらに耐性を示す TNBC が半数存在する。これらを判別するバイオマーカーは現存しないため、臨床現場において治療薬の選択に難渋している。

さらに、膵臓がんにおいては、早期検出可能なバイオマーカーの欠如、抗がん剤耐性、遠隔転移が難治性の要因である。

これら臨床的課題の克服を目的に、PRDM14 分子を TNBC や膵臓がんの診断バイオマーカーとして開発を行う。

B. 研究方法

共同研究者と共に以下の研究を実施した。

【組織・血清の入手】

共同分担者の所属・旧所属である神奈川県立がん研究センター(宮城)、及び、札幌医科大学(前佛)で得られた臨床情報を伴う乳がん、膵がん組織、血清を倫理審査を経た後、適切に入手した。

【組織診断】

上記で得られた臨床情報を伴う乳がん、膵がん組織をすでに評価がすすんでいる PRDM14 の抗体を使用して免疫組織学的評価を行う(谷口・今井)。特に、乳がん組織に関してはトリプルマーカーを同様に免疫組織学的に評価した(宮城・今井)。乳がん、膵がん組織に関して、病理組織学的因子との相関性を評価する(谷口・今井)。

【分子生物学的評価】

共同研究先(谷口・今井)において、乳がん細胞株、膵臓がん細胞株を使用して、cDNA 発現アレイ、ChIP-seq を行いその中より分泌タンパク質に該当するものを絞り込んだ。

また、PRDM14 遺伝子導入株において、in vitro / in vivo の検討を行い、本遺伝子が腫瘍の転移・浸潤に関与することを明らかとした。

【臨床検体における遺伝子発現アレイによるマーカー候補の絞り込みと ELISA 法による検証】

乳がん患者に関して、臨床検体を使用した cDNA 発現アレイのデータにより、PRDM14 遺伝子発現と相関する分泌タンパク遺伝子をスクリーニングした。その候補遺伝子に関して、実際に対応する患者血清を用いて、ELISA 法により検証を行った(前佛)。

【統合的オミックス解析】

患者血清に関してサスペンションアレイ(サイトカイン、ケモカイン、マトリクスプロテアーゼ、がんパネル)にサンプルを供し、PRDM14 遺伝子産物の発現と相関性のある血清中蛋白質を絞り込んだ(谷口・前佛・今井)。

【末梢血循環腫瘍細胞の解析】

分子生物学的、細胞生物学的解析の結果、本遺伝子が腫瘍の転移にも強く関与することから、CTC 分取目的に開発を進めている特異性の高い PRDM14 抗体(谷口・今井)を使用し、流血中の腫瘍細胞 (CTC: Circulating Tumor Cells) の分取を行い、PRDM14 陽性 CTC を検出できるか検討を行う計画である(宮城・谷口・今井)。

(倫理面への配慮)

研究に使用する検体に関しては、インフォームドコンセントに十分留意し、患者の同意を得る。対象者の自由意思での検体提供が前提であり、また、協力を撤回することが可能である。さらに東京大学、共同研究先の倫理審査委員会の承認を経た後に使用する。

提供された試料は、解析前に試料の整理簿から住所・氏名・生年月日などの個人情報情報を削除し、代わりに新しく符号を付ける。提供者とこの符号を結びつける対応表は、東京大学、共同研究先(神奈川県立がんセンター、札幌医大、国立がん研究センター)、公的組織バンク内の個人情報管理システムにおいて厳重に保管される。また、情報管理用コンピューターは、外部との接続が無いものを使用し、また、夜間は施錠される環境にある。よって、研究の遂行により提供者の個人情報が漏洩する可能性はない。

登録責任者は、本研究において個人情報管理者としての役割を兼ねる。

組織検体の由来する患者の臨床病理学的情報を解析する場合には、組織を入手した患者の臨床に直接戻って解析することが無いよう、患者のプライバシーに配慮し、匿名化を行った上で解析を行う。

また、本研究においては、癌などの病変部のみにも出現し、遺伝子の一次構造の異常を伴わない、遺伝子発現解析等の研究が主であり、生殖細胞系列変異や多型など、次世代に引き継がれる遺伝情報の解析は行わない。解析後の試料は、複

数のサンプルを混合することによって連結不可能匿名化し、オートクレーブで確実に滅菌した上、焼却処分する。

マウスを用いた実験に関しては、東京大学動物実験規定に従い、動物実験委員会で動物実験計画の審査を経た後に行ない、実験に際しては、必要最低限の個体数を使用し、疼痛・苦痛を極力与えない方法で研究を進めることとする。

C. 研究結果

我々は、幹細胞特性を担う転写因子である PRDM14 (Nature 2010) が、乳癌において癌部特異的に発現亢進しており、腫瘍の悪性形質に関連することを証明していた (Cancer Res 2007)。これらの知見をもとに申請した乳がんの診断に関する特許が成立している (特許 2012 - 253108 号)。

さらに、乳がん、膵臓がんの臨床検体を使用して PRDM14 の過剰発現と悪性腫瘍の関連性を解析し特許申請している (特許申請中 2014 - 141278 号)。

- ① 乳がん臨床検体による PRDM14 分子の発現解析を進め、(A) 早期ステージからの発現亢進を認め、(B) TNBC において発現亢進を認めた。
- ② 膵臓がん臨床検体において PRDM14 分子の発現亢進を認めた。
- ③ がん細胞において PRDM14 分子は抗がん剤耐性・転移に関与する。

さらに、平成 26 年度の成果として下記を得ており、計画通り完了している。

- ④ 臨床検体数を増やし、病理組織学的因子との関連を検討した。乳がんにおいては、トリプルマーカーと強い相関は認められなかった。
- ⑤ 本プロジェクトの課題の達成に必要な病理組織とそれに対応する手術・化学療法前の患者血清を倫理審査を経て必要数確保。さらに、共同研究先で、追加検体を用いたマイクロアレイによる PRDM14 発現相関遺伝子の検証

を継続している。

- ⑥ 腫瘍細胞モデルを使用し、発現マイクロアレイ、ChIP-seq によるスクリーニングを行った。PRDM14 と発現相関をもつ遺伝子で分泌タンパク遺伝子にカテゴライズされる遺伝子を候補遺伝子として同定した。
- ⑦ Microarray data において、PRDM14 遺伝子の発現量と 0.95 以上の相関係数を示し、回帰直線の傾きが 0.5~2.0 であり、データベース上分泌タンパクであることが知られている候補を ELISA 法にて検証を行った。
- ⑧ ⑤の検体を用いて統合的オミックス解析 (サスペンションアレイ) により、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子 (血清診断バイオマーカー候補) のスクリーニングを行った。

D. 考察

ホルモン受容体陰性かつ HER2 過剰発現のないトリプルネガティブ (TNBC) の乳がんは、乳癌全体の 10~20% を占め、若年者に多く、悪性度が高いとされており、分子標的治療法が確立していない。現在、化学療法のみが適用であるが、抗がん剤高感受性の TNBC と抗がん剤耐性を示す TNBC が存在する。これらを判別するバイオマーカーは現存せず、臨床現場において治療薬の選択に難渋している。したがって、これまででない独創的な診断法が切望されている。

膵臓がんは国際的にも罹患数・死亡数が非常に多いがんであるにもかかわらず、早期膵癌の検出に有用な診断バイオマーカーは皆無である。また、ジェムザール、TS-1 が臨床現場で使用されているが、この2剤の効果に乏しい患者群の治療継続が困難となっている。

申請者らは、TNBC、膵臓がんやそれらの抗癌剤耐性に関与する新規標的分子 PRDM14 の発見に恵まれた。その知財を基本に、PRDM14 分子を TNBC、膵臓がんの診断バイオマーカーとして開発する価値が高いと判断する有望なデータを得ている。具体的には、遺伝子発現アレイ、ChIP-seq、統合的オミックス解析を統合することに

より、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子候補が得られた。

これらの候補は同時に、抗がん剤耐性やがん転移のマーカーとなる可能性が高い。

本シーズは抗癌剤感受性が低い TNBC、並びに、膵臓がんの患者の診断に有効性が高いことが想定され、国民のニーズを十分に満たす。

橋渡し研究、企業へのライセンスアウトを出口とする非臨床試験へと進むことにより、その成果は、患者 QOL の向上、死亡数の減少へ至るため、医療現場における必要度は高い。

E. 結論

PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子候補が得られており、さらに実臨床を視野に入れて開発研究を展開する。

F. 健康危険情報

特記すべきことは無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nasuno M, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, **Imai K**, Shinomura Y. Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation. **STEM CELLS** 32(4):913-25, 2014.
- 2) Ito M, Mitsuhashi K, Igarashi H, Noshō K, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Fujita M, Sukawa Y, Yamamoto E, Takahashi T, Adachi Y, Nojima M, Sasaki Y, Tokino T, Baba Y, Maruyama R, Suzuki H, **Imai K**, Yamamoto H, Shinomura Y. MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. **Int J Cancer**. 135(11):2507-15, 2014.
- 3) Adachi Y, Ohashi H, Imsumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, Taniguchi H, Noshō K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, **Imai K**, Shinomura Y. The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **Tumor Biol** 35(2): 973-85, 2014.
- 4) Yasui H, Ishida T, **Imai K**. The role of DNA methylation in the genetics and epigenetics of multiple myeloma. In: Steve Holt, editors. Multiple myeloma: risk factors, diagnosis and treatments. :Series: **Cancer Etiology, Diagnosis and Treatments**. Hauppauge NY: Nova Science Publishers. 147-156, 2014.
- 5) Harada T, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada E, Takagi R, Tanaka Y, Aoki H, Nishizono M, Nakaoka M, Tuyada A, Niinuma T, Kai M, Shimoda K, Shinomura Y, Sugai T, **Imai K**, Suzuki H. Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer. **Cancer Prevention Research** (Philadelphia, Pa.), 7(10):1002-10, 2014.
- 6) **Imai K**. Overview and Future prospect of “Promotion plan for the platform of human resource development for cancer”. **Juntendo Medical Journal**, 60(3): 234-237, 2014.
- 7) Yamamoto M, Yajima H, Takahashi H, Yokoyama Y, Ishigami K, Shimizu Y, Tabeya T, Suzuki C, Naishiro Y, Takano K, Yamashita K, Hashimoto M, Keira Y, Honda S, Abe T, Suzuki Y, Mukai M, Himi T, Hasegawa T, **Imai K**, Shinomura Y. Everyday clinical practice in IgG4-related dacryoadenitis and/or sialadenitis: Result from the SMART database. **Modern Rheumatology**. 27:1-6, 2014.
- 8) Naito T, Noshō K, Ito M, Igarashi H, Mitsuhashi K, Yoshii S, Aoki H, Nomura M, Sukawa Y, Yamamoto E, Adachi Y, Takahashi H, Hosokawa M, Fujita M, Takenouchi T, Maruyama R, Suzuki H, Baba Y, **Imai K**, Yamamoto H, Ogino S, Shinomura Y. IGF2

- differentially methylated region hypomethylation in relation to pathological and molecular features of serrated lesions. **World J Gastroenterol.** 20(29): 10050-61, 2014.
- 9) Yamamoto M, Shimizu Y, Takahashi H, Yajima H, Yokoyama Y, Ishigami K, Tabeya T, Suzuki C, Matsui M, Naishiro Y, **Imai K**, Shinomura Y. CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α)+ M2 macrophages contribute to fibrosis in IgG4-related disease? **Mod Rheumatol**, 2:1-3, 2014.
 - 10) Yasui H, Tsurita G, **Imai K**. DNA synthesis inhibitors for the treatment of gastrointestinal cancer. **Expert Opin Pharmacother.** 15(16):2361-72, 2014.
 - 11) Kagami H, Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N, **Imai K**. The Use of Bone Marrow Stromal Cells (Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells) for Alveolar Bone Tissue Engineering: Basic Science to Clinical Translation. **Tissue Engineering Part B: Reviews.** 20(3): 229-232, 2014.
 - 12) Igarashi H, Kurihara H, Mitsuhashi K, Ito M, Okuda H, Kanno S, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Kusumi T, Hasegawa T, Sukawa Y, Adachi Y, Okita K, Hirata K, Imamura Y, Baba Y, **Imai K**, Suzuki H, Yamamoto H, Nosho K, Shinomura Y. Association of microRNA-31-5p with clinical efficacy of anti-EGFR therapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Annals of Surgical Oncology.** [Epub ahead of print], 2014.
 - 13) Yamamoto S, Otsu M, Matsuzaka E, Konishi C, Takagi H, Hanada S, Mochizuki S, Nakauchi H, **Imai K**, Tsuji K, Ebihara Y. Screening of drugs to treat 8p11 myeloproliferative syndrome using patient-derived induced pluripotent stem cells with fusion gene CEP110-FGFR1. **Plos One**, in press, 2015.
 - 14) Nosho K, Igarashi H, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yoshii S, Mikami M, Takahashi H, Kusumi T, Hosokawa M, Sukawa Y, Adachi Y, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, **Imai K**, Yamamoto H, Shinomura Y. Clinicopathological and molecular characteristics of serrated lesions in Japanese elderly patients. **Digestion.** 91(1):57-63. 2015.
 - 15) Yamamoto M, Nojima M, Takahashi H, Yokoyama Y, Ishigami K, Yajima H, Shimizu Y, Tabeya T, Matsui M, Suzuki C, Naishiro Y, Takano KI, Himi T, **Imai K**, Shinomura Y. Identification of relapse predictors in IgG4-related disease using multivariate analysis of clinical data at the first visit and initial treatment. **Rheumatology.** 54(1):45-9, 2015.
 - 16) Yamamoto M, Takahashi H, Shimizu Y, Yajima H, Suzuki C, Naishiro Y, **Imai K**, Shinomura Y. Seasonal allergies and serial changes of serum levels of IgG4 in cases treated with maintenance therapy for IgG4-related disease. **Modern Rheumatology.** 13:1-2. 2015.
 - 17) Yamamoto H, **Imai K**. Microsatellite instability. **Archives of Toxicology.** in press, 2015.
 - 18) Mitsuhashi K, Nosho K, Sukawa Y, Matsunaga Y, Ito M, Kurihara H, Kanno S, Igarashi H, Naito T, Adachi Y, Tachibana M, Tanuma T, Maguchi H, Shinohara T, Hasegawa T, Imamura M, Kimura Y, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, **Imai K**, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. **Oncotarget.** in press, 2015.
 - 19) Nakagaki S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Nasuno M, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, **Imai K**, Shinomura Y. Contextual niche signals towards colorectal tumor

progression by mesenchymal stem cell in the mouse xenograft model. **J Gastroenterol**, [Epub ahead of print], 2015.

- 20) 今井浩三. 総説 橋渡し研究の展開と我が国の医療. 東京都病院薬剤師会雑誌 63(2): 5-8, 2014.
- 21) 湯地晃一郎, 井元清哉, 山口類, 宮野悟, 上昌広, 今井浩三. 人口動態に基づいた日本医療の未来予測—高齢多死社会の到来, 特集「超高齢者に対する外科治療の問題点」南江堂臨床雑誌「外科」, 76(5) : 457-463, 2014.
- 22) 能正勝彦, 五十嵐央祥, 伊藤美樹, 三橋 慧, 栗原弘義, 菅野伸一, 内藤崇史, 須河安恭敬, 松永康孝, 足立 靖, 野島正寛, 今井浩三, 丸山玲緒, 鈴木 拓, 山本博幸, 篠村恭久. 大規模コホートをを用いた大腸癌のノンコーディングRNA発現異常と生活習慣の分子疫学的解析. 日本癌病態治療研究会誌, 20(1):60-63, 2014.
- 23) 今井浩三. 私とリウマチ学. 分子リウマチ治療, vol.7 no4, 244-246, 2014.
- 24) 鈴木拓, 今井浩三. がんエピゲノム異常を理解し、応用し、そして制御するために. 実験医学 Vol.32 No.19, 3024-3029, 2014.
- 25) 安井寛, 今井浩三. 抗体医薬, **DDS 研究 30年**, PHARMA TECH JAPAN 臨時増刊号, 31(2): 94-101, 2015.
- 26) 佐々木茂, 篠村恭久, 今井浩三. 抗体治療特集「DDS がもたらした新しい臨床の風景」. **Drug Delivery System**, 30(1): 16-24, 2015.

2. 学会発表

【国際学会】

- 1) Kato Y, Hiromi H, Tujisaki M, Matsune T, Sasaki S, Hinoda Y, Shinomura Y, **Imai K**. A combination of the anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody and interferon-a/b suppresses human hepatic cancer

cells in vitro and in vivo. 41st Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers. 2014, Barcelona.

【国内学会】

- 1) 今井浩三. 東京大学医科学研究所におけるTRの現状と展望. シンポジウム 2 「我が国におけるトランスレーショナルリサーチの現状とこれからの展望」第 51 回日本臨床分子医学会学術集会, 東京国際フォーラム. 2014, 東京
- 2) 今井浩三. 招聘講演「東大医科研における橋渡し研究とその発展」第 103 回日本病理学会総会 特別企画, 広島国際会議場フェニックスホール. 2014, 広島
- 3) 今井浩三. 特別講演「最先端医療の開発とDNA情報に基づく新たな社会」. 多摩大学寺島実郎監修リレー講座. 2014, 東京
- 4) 今井浩三. 東京理科大学生命医科学研究所シンポジウム「東京大学医科学研究所における橋渡し研究の現状とその展開」、東京理科大学ヒト疾患モデル研究センター, 2014, 千葉県.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
谷口博昭、今井浩三、片岡一則、西山伸宏、宮田完二郎、前田芳周、「がん幹細胞分子マーカー」発明等の届出書提出日:2014 年 07 月 09 日 (出願番号 2014-141278)
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究費委託（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

新規バイオマーカーPRDM14による難治性乳がん・すい臓がんの診断法の開発
PRDM14分子の組織診断（病理診断バイオマーカー）の検証

担当責任者 宮城洋平 神奈川県立がんセンター臨床研究所 がん分子病態学部 部長

研究要旨

PRDM14分子を、難治性がんであるトリプルネガティブ乳がん TNBC や膵がん PC の治療法・治療薬の選に関わる病理診断マーカー、或いは、早期診断の血清マーカーとして確立するために、IRB での研究計画の承認の取得、乳がん 125 症例の手術前、担がん状態での血清、及び病理組織切片、膵がん 210 症例の FFPE 腫瘍組織アレイ、一部の対応する血清 20 検体を整備し解析に供した。

A. 研究目的

PRDM14分子を、難治性がんである TNBC や PC の治療法・治療薬の選に関わる病理診断マーカー、或いは、早期診断の血清マーカーとして確立するために、治療に対する反応に関する臨床情報がある外科切除がん組織、手術前、担がん状態での血液試料、を多数準備し検証する必要がある。必要な倫理審査の申請と承認の取得、臨床情報の収集、血清の確保、病理組織切片、或いは、組織アレイの作製、を実施、本研究で解析を担当する担当責任者に提供する。

B. 研究方法

既に倫理委員会の承認を得て、がん研究への協力の包括的同意が得られている研究試料から、本委託事業の研究目的に合致する症例を選別し、具体的な研究計画について、Institutional Review Board (IRB)に提出、承認を得る。血清を確保し、また、外科切除がん組織のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から、組織アレイを作製する。必要に応じて、適宜、がん組織の遺伝子変異基礎情報などを準備する。

C. 研究結果

IRB で研究計画の承認を得て研究遂行上の倫理面を整備した。研究対象となる乳がん 125 症例の手

術前、担がん状態での血清、及び病理組織切片を準備した。膵癌症例については、現在の標準治療である外科切除後ゲムシタピン、或いは、S-1 による術後補助療法の有無、予後、の情報を収集、210 症例について FFPE 組織の組織アレイを作製し準備を完了した。対応する血清 20 検体を確保した。

D. 考察

乳がん外科切除術は縮小手術が主流で病変が小さく組織アレイの作製に制限があり、whole section での対応が余儀なくされる症例が少なくない。膵癌症例は、患者さんの状態など十分な研究用採血が難しい場合もあり、微量検体での診断用 modality の開発が必要と考えられる。

E. 結論

PRDM14 を用いた病理診断マーカー開発に必要な TNBC、PC の検体セットを整備することができた。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

新規バイオマーカーPRDM14による難治性乳がん・すい臓がんの診断法の開発
統合的オミックス解析による PRDM14 の発現と高い相関性を有する
分泌タンパク遺伝子（血清診断バイオマーカー候補）のスクリーニング

担当責任者 前佛 均 国立がん研究センター研究所 遺伝医学研究分野 ユニット長

研究要旨

難治性のトリプルネガティブ乳がん(TNBC)や膵がん(PC)において高頻度に高発現している PRDM14 分子は、難治性がんを対象とした診断バイオマーカーとして最適な候補である。アントラサイクリン、タキサン系薬剤に高感受性の TNBC がサブカテゴリーとして判明しているが、一方でこれらに耐性を示す TNBC が半数存在するが、これらを判別するバイオマーカーは現存しないため、臨床現場において治療薬の選択に難渋している。さらに、PC においては、早期検出可能なバイオマーカーの欠如、抗がん剤耐性、遠隔転移などが低い治療成績の原因となっている。本研究では、これらの臨床的課題の克服を目的に、PRDM14 分子を TNBC や PC の診断バイオマーカーとして開発する研究を実施する。

A. 研究目的

患者数が増加し社会的に解決が急務である「乳がん」を対象に、PRDM14 を標的とした核酸治療薬が開発されつつある。一方 PRDM14 は薬剤耐性乳がんと深く関係していることも報告されており、PRDM14 をバイオマーカーとした治療法の選択は TNBC など難治性乳がんの有効な治療法につながるものと期待されている。本研究では、難治性乳がん、膵がんの治療成績向上のため、PRDM14 を診断バイオマーカーとした治療法の開発と同時に、PRDM14 の発現量と強く相関する分泌タンパクを同定することで、実用的なバイオマーカーを同定し、臨床応用可能なコンパニオン診断薬の開発を目指す。

B. 研究方法

- ① 組織型など臨床情報を有する凍結乳癌組織より mRNA を抽出し、quality check を行う。
- ② 網羅的な遺伝子発現プロファイルを解析するためにマイクロアレイ解析を行う。

- ③ PRDM14 遺伝子発現量と強い相関をもつ分泌タンパクと考えられている遺伝子を同定する。
- ④ 他の乳がんマイクロアレイデータとの比較から発現量の高相関が再現されている遺伝子を同定する。
- ⑤ マイクロアレイ解析に用いた乳がん症例の血清検体を用いて ELISA 法などを用いて、PRDM14 遺伝子発現量と相関の高い分泌タンパクの定量を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立がん研究センター審査委員会の承認を得て実施し、臨床検体の取り扱いについては同委員会の指針に従って行った。（研究課題番号 2014-158）

C. 研究結果

これまでに乳がん臨床検体 112 例を用いた PRDM14 の発現解析が終了した。その結果ほとんどの乳がん臨床組織において、正常乳腺に比べて

PRDM14 の発現が亢進していることが明らかとなった。

また、112 例中 79 例については独立した 2 サンプルセット(乳がん臨床検体 29 例および 50 例)にてマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現プロファイル解析が行われた。その結果 29 例のマイクロアレイ解析結果より PRDM14 遺伝子の発現量と相関を有し、かつ分泌タンパクをコードする遺伝子として、ENOX2 (Ecto-NOX Disulfide-Thiol Exchanger 2) 遺伝子が同定された(相関係数 $r=0.75$)。乳がん組織における PRDM14 遺伝子の発現量と同一乳がん患者の血清を用いて、ELISA 法にて血中 ENOX2 タンパクの定量を行ったが、有意な相関を認めなかった。また、血中 CEA タンパク量と同一患者の乳がん組織における PRDM14 の発現量を検討したが、有意な相関を認めなかった。

D. 考察

転写因子である PRDM14 遺伝子は転写制御を受ける遺伝子がいくつか報告されてはいるものの、PRDM14 による転写制御を受けることが知られていない、未知の遺伝子が多数存在し得ることが推測されている。PRDM14 遺伝子は分泌タンパクである可能性は低く、血中 PRDM14 タンパクを定量化した報告は存在しない。そのため、PRDM14 の発現量と強い相関を有する分泌タンパク、つまり PRDM14 発現量の surrogate marker を同定することで、薬剤耐性を示す難治性の乳がんや膀胱がんに対する適切な治療法を選択するうえで、非常に臨床有用性が高いものと期待されている。

E. 結論

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現情報より、PRDM14 遺伝子の発現量と強い相関を示す候補分泌タンパク遺伝子を同定した。今後これらの候補タンパクについて ELISA などの血中タンパク定量により、PRDM14 の surrogate marker となるようなタンパクを同定し、血中マーカーの測定系を確立する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) **Zembutsu H.** Pharmacogenomics toward personalized tamoxifen therapy for breast cancer. *Pharmacogenomics*. 2015 Mar;16(3):287-96.
 - 2) Kutomi G, Ohmura T, Satomi F, Takamaru T, Shima H, Suzuki Y, Otokozaawa S, **Zembutsu H**, Mori M, Hirata K. Lymph node shape in computed tomography imaging as a predictor for axillary lymph node metastasis in patients with breast cancer. *Exp Ther Med*. 2014 Aug;8(2):681-685.
 - 3) Aguilar H, Urruticoechea A, Halonen P, Kiyotani K, Mushiroda T, Barril X, Serra-Musach J, Islam A, Caizzi L, Di Croce L, Nevedomskaya E, Zwart W, Bostner J, Karlsson E, Pérez Tenorio G, Fornander T, Sgroi DC, Garcia-Mata R, Jansen MP, García N, Bonifaci N, Climent F, Soler MT, Rodríguez-Vida A, Gil M, Brunet J, Martrat G, Gómez-Baldó L, Extremera AI, Figueras A, Balart J, Clarke R, Burnstein KL, Carlson KE, Katzenellenbogen JA, Vizoso M, Esteller M, Villanueva A, Rodríguez-Peña AB, Bustelo XR, Nakamura Y, **Zembutsu H**, Stål O, Beijersbergen RL, Pujana MA. VAV3 mediates resistance to breast cancer endocrine therapy. *Breast Cancer Res*. 2014 May 28;16(3):R53.
 - 4) Chhibber A, Mefford J, Stahl EA, Pendergrass SA, Baldwin RM, Owzar K, Li M, Winer EP, Hudis CA, **Zembutsu H**, Kubo M, Nakamura Y, McLeod HL, Ratain MJ, Shulman LN, Ritchie MD, Plenge RM, Witte JS, Kroetz DL. Polygenic inheritance of paclitaxel-induced sensory peripheral neuropathy driven by axon outgrowth gene sets in CALGB 40101 (Alliance). *Pharmacogenomics J*. 2014 Aug;14(4):336-42
 - 5) Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R, Suman VJ, Schroth W, Winter S, **Zembutsu H**, Mushiroda T, Newman WG, Lee MT, Ambrosone CB,

Beckmann MW, Choi JY, Dieudonné AS, Fasching PA, Ferraldeschi R, Gong L, Haschke-Becher E, Howell A, Jordan LB, Hamann U, Kiyotani K, Krippel P, Lambrechts D, Latif A, Langsenlehner U, Lorzio W, Neven P, Nguyen AT, Park BW, Purdie CA, Quinlan P, Renner W, Schmidt M, Schwab M, Shin JG, Stingl JC, Wegman P, Wingren S, Wu AH, Ziv E, Zirpoli G, Thompson AM, Jordan VC, Nakamura Y, Altman RB, Ames MM, Weinshilboum RM, Eichelbaum M, Ingle JN, Klein TE; International Tamoxifen Pharmacogenomics Consortium. CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. Clin Pharmacol Ther. 2014 Feb;95(2):216-27.

- 6) **Zembutsu H.** Precision Medicine for Cancer and Pharmacogenomics. 血液内科 2015 in pres.

2. 学会発表

- 1) **前佛 均**、中村 清吾、明石 定子、桑山 隆志、渡邊 知映、武井 寛幸、石川 孝、長谷川 善枝、リー スーチン、松方 絢美、松本 広志、九 富 五 郎、中村 祐 輔 . CYP2D6 genotype とタモキシフェン治療反応性の関係を解明する多施設共同前向き研究. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2014.9)
- 2) 高田 亮、加藤 陽一郎、**前佛 均**、片桐 豊雅、角田 達彦、藤岡 知昭、中村 祐輔、小原 航網羅的遺伝子発現解析による筋層浸潤性膀胱がんのオーダーメイド医療. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2014.9)
- 3) 清谷 一馬、蒔田 泰誠、**前佛 均**、中村 祐輔. PGx によるタモキシフェン治療効果予測: CYP2D6 研究から学ぶこと. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2014.9)
- 4) **前佛 均**、中村 清吾、明石 定子、桑山 隆志、渡邊 知映、武井 寛幸、石川 孝、長谷川 善枝、リー スーチン、松方 絢美、松本 広志、九 富 五 郎、中村 祐 輔 . CYP2D6

genotype とタモキシフェン治療反応性の関係を解明する多施設共同前向き研究. 日本人類遺伝学会 第 59 回大会、東京都 (2014.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

新規バイオマーカーPRDM14による難治性乳がん・すい臓がんの診断法の開発
統合的オミックス解析による診断バイオマーカー同定、CTC 分取・解析

担当責任者 谷口 博昭 東京大学医科学研究所 抗体ワクチン治療研究部門 特任准教授

研究要旨

我々は、有効な治療法が未開発、早期発見することが困難なため難治性となっているトリプルネガティブ乳がん、膵臓がんにおいて発現亢進する標的分子 PRDM14 を同定した。同分子の乳がん、膵臓がん臨床検体における POC をすでに取得、さらに、遠隔転移、抗がん剤耐性を制御していることが判明し特許出願した。

以上の成果に基づき、① PRDM14 分子を組織診断に用いて病理診断バイオマーカーとして最適か検証する、② 統合的オミックス解析により、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子をスクリーニングする。③ 同一患者血清を用いて、ELISA 法により血清診断バイオマーカー候補と PRDM14 分子の相関性をバリデーションする。上記①②を研究分担し、目的とする疾患の病理診断バイオマーカー、血清診断バイオマーカーの候補を得ることができた。

A. 研究目的

PRDM14 分子は、有効な治療法が未開発、早期発見が困難なため難治性となっているがんであるトリプルネガティブ乳がん (TNBC) や膵臓がんにおいて発現亢進する特性を有している。

最近、アントラサイクリン、タキサン系薬剤に高感受性の TNBC がサブカテゴリーとして判明しているが、一方でこれらに耐性を示す TNBC が半数存在する。これらを判別するバイオマーカーは現存しないため、臨床現場において治療薬の選択に難渋している。

さらに、膵臓がんにおいては、早期検出可能なバイオマーカーの欠如、抗がん剤耐性、遠隔転移が難治性の要因である。

これら臨床的課題の克服を目的に、PRDM14 分子を TNBC や膵臓がんの診断バイオマーカーとして開発することを目的とする。

B. 研究方法

【組織・血清の入手】

共同研究先で得られた臨床情報を伴う乳がん、膵臓がん組織、血清を倫理審査を経た後、適切に入手した。

【組織診断】

共同研究先で得られた臨床情報を伴う乳がん、膵臓がん組織をすでに評価がすすんでいる PRDM14 の抗体 (7 種類の市販抗体を比較検討) を使用して免疫組織学的評価を行う。特に、乳がん組織に関してはトリプルマーカーを同様に免疫組織学的に評価する。乳がん、膵臓がん組織に関して、病理組織学的因子との相関性を評価する。

【分子生物学的評価】

転写因子 PRDM14 の標的となる分子を同定するため、乳がん細胞株、膵臓がん細胞株を使用して、cDNA 発現アレイ、ChIP-seq を行いその中より分泌タンパク質に該当するものを絞り込んだ。乳がん患者血清に関しては、異なる臨床検体を使用している共同研究者の cDNA 発

現アレイと比較してさらに候補を絞り込んだ。

また、PRDM14 遺伝子導入株において、in vitro / in vivo の検討を行い、本遺伝子が腫瘍の転移・浸潤に関与することを明らかとした。

【統合的オミックス解析】

患者血清に関してサスペンションアレイ(サイトカイン、ケモカイン、マトリクスプロテアーゼ、がんパネル)にサンプルを供し、PRDM14 遺伝子産物の発現と相関性のある血清中蛋白質を絞り込んだ。

【末梢血循環腫瘍細胞の解析】

分子生物学的、細胞生物学的解析の結果、本遺伝子が腫瘍の転移にも強く関与することから、CTC 分取目的に開発を進めている特異性の高いPRDM14抗体を使用し、流血中の腫瘍細胞 (CTC: Circulating Tumor Cells) の分取を行い、PRDM14 陽性 CTCを検出できるか検討を行う計画である。

(倫理面への配慮)

研究に使用する検体に関しては、インフォームドコンセントに十分留意し、患者の同意を得る。対象者の自由意思での検体提供が前提であり、また、協力を撤回することが可能である。さらに東京大学の倫理審査委員会の承認を経た後に使用する。提供された試料は、解析前に試料の整理簿から住所・氏名・生年月日などの個人情報情報を削除し、代わりに新しく符号を付ける。提供者とこの符号を結びつける対応表は、東京大学、共同研究先(神奈川県立がんセンター、札幌医大)、公的組織バンク内の個人情報管理システムにおいて厳重に保管される。また、情報管理用コンピューターは、外部との接続が無いものを使用し、また、夜間は施錠される環境にある。よって、研究の遂行により提供者の個人情報が漏洩する可能性はない。登録責任者は、本研究において個人情報管理者としての役割を兼ねる。

組織検体の由来する患者の臨床病理学的情報を解析する場合には、組織を入手した患者の臨床に直接戻って解析することが無いよう、患者のプライバシーに配慮し、匿名化を行った上で解析

を行う。

また、本研究においては、癌などの病変部のみに出現し、遺伝子の一次構造の異常を伴わない、遺伝子発現解析等の研究が主であり、生殖細胞系列変異や多型など、次世代に引き継がれる遺伝情報の解析は行わない。解析後の試料は、複数のサンプルを混合することによって連結不可能匿名化し、オートクレーブで確実に滅菌した上、焼却処分する。

齧歯目を用いた実験に関しては、東京大学動物実験規定に従い、動物実験委員会で動物実験計画の審査を経た後に行ない、実験に際しては、必要最低限の個体数を使用し、疼痛・苦痛を極力与えない方法で研究を進める。

C. 研究結果

我々は、幹細胞特性を担う転写因子であるPRDM14 (Nature 2011)が、乳がんにおいてがん部特異的に発現亢進しており、腫瘍の悪性形質に関連することを示した(Cancer Res 2007)。これらの知見をもとに申請した乳がんの診断に関する特許が成立している(特許 2012-253108 号)。乳がん、膵臓がんの臨床検体を使用して PRDM14 の過剰発現と悪性腫瘍の関連性を解析した結果、下記の成果を得た(特許申請中 2014-141278 号)。

- ① 乳がん臨床検体による PRDM14 分子の発現解析を進め、(A) 早期ステージからの発現亢進を認め、(B) TNBC において発現亢進を認めた。
 - ② 膵臓がん(PC)臨床検体において PRDM14 分子の発現亢進を認めた。
 - ③ がん細胞において PRDM14 分子は抗がん剤耐性・転移に関与する。
- さらに、平成 26 年度の成果として下記を得ており、計画通り完了している。
- ④ 臨床検体数を増やし、病理組織学的因子との関連を検討。
 - ⑤ 本プロジェクトの課題の達成に必要な病理

組織とそれに対応する手術・化学療法前の患者血清を倫理審査を経て必要数確保。

- ⑥ 腫瘍細胞モデルを使用し、発現マイクロアレイ、ChIP-seq によるスクリーニングを行った。PRDM14 と発現相関をもつ遺伝子で分泌タンパク遺伝子にカテゴライズされる遺伝子を候補遺伝子として同定。
- ⑦ ⑤の検体を用いて統合的オミックス解析(サスペンションアレイ)により、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子(血清診断バイオマーカー候補)のスクリーニングを行った。

D. 考察

標的分子 PRDM14 は、がん部特異的に発現亢進するため診断バイオマーカーとして最適である。現在、診断バイオマーカーとしての有効性の担保が得られた段階であるが、さらに、遺伝子発現アレイ、ChIP-seq、統合的オミックス解析を統合することにより、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子候補が得られ始めており、実臨床を視野に入れて開発研究を展開する。

また、血清マーカーに関しては、基準値の設定等で患者の基礎疾患に依存することも多く、有望な血清マーカーと共に、PRDM14 分子が腫瘍の転移・浸潤に関わることから、末梢血循環腫瘍細胞における、PRDM14 の発現を検討する準備を着実に進めている。

E. 結論

PRDM14 分子を組織診断に用いて病理診断バイオマーカーとして最適か検証し、一定の成果が得られた。また、統合的オミックス解析により、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパクの候補が得られた状態である。目的とする疾患の病理診断バイオマーカー、血清診断バイオマーカーの候補を得ることができた。前者はさらに、末梢血循環腫瘍細胞の検出に応用できないか発展的な検討の準備を整えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koshikawa N, Hoshino D, **Taniguchi H**, Minegishi T, Tomari T, Nam SO, Aoki M, Sueta T, Nakagawa T, Miyamoto S, Nabeshima K, Weaver A, Seiki M. Proteolysis of EphA2 causes its conversion from tumor suppressor to oncogenic signal transducer. *Cancer Res*, in press. 2014.
- 2) Adachi Y, Ohashi H, Imusumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, **Taniguchi H**, Noshio K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Tumor Biol*, 35(2) : 973-85. 2014.
- 3) Yamamoto H, Watanabe Y, Maehata T, Morita R, Yoshida Y, Oikawa R, Ishigooka S, Ozawa S, Matsuo Y, Hosoya K, Yamashita M, **Taniguchi H**, Noshio K, Suzuki H, Yasuda H, Shinomura Y, Itoh F. An updated review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: insights from bench to bedside and vice versa. *World J Gastroenterol*. 20:3927-37, 2014.

2. 学会発表

- 1) 谷口博昭、山本博幸、今井浩三
「ヒストンメチル化転移酵素 PRDM14 分子を標的とした核酸製剤による乳がん治療法の開発」
第 73 回日本癌学会学術総会 10/27/2014
パシフィコ横浜
- 2) 谷口博昭
「乳がんを対象としたヒストンメチル基転移酵素を標的とする新規核酸製剤の開発」
文部科学省・次世代がんシーズ戦略的育成プログラム公開シンポジウム「革新的創薬シーズを活かす最先端 DDS・イメージング技術」
10/16/2014 東京コンファレンスセンター有明
- 3) 谷口博昭、前田芳周、宮田完二郎、山本博幸、片岡一則、今井浩三

「転写因子 PRDM14 分子を標的とした新規 RNAi-ミセル複合体による乳がん治療法の開発」

第 30 回 DDS 学会 07/31/2014 慶応義塾大学薬学部共立キャンパス

- 4) 谷口博昭、山本博幸、越川直彦、今井浩三
“PRDM14 contribution to breast cancer progression and therapeutic model using PRDM14 RNAi”

第 23 回がん転移学会学術総会 07/11/2014
金沢文化ホール

- 5) 谷口博昭
“Developing novel strategies for treatment on cancer metastasis”

第 23 回がん転移学会学術総会 07/11/2014
金沢文化ホール

(第 18 回がん転移学会研究奨励賞受賞記念講演)

G. 知的財産権の出願・登録状況特許出願

1. 特許出願

谷口博昭、今井浩三、片岡一則、西山伸宏、
宮田完二郎、前田芳周、「がん幹細胞分子マーカー」発明等の届出書提出日:2014 年 07
月 09 日 (出願番号 2014-141278)

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

Ⅲ. 学会等発表実績