

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、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、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。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 - トクレ - プ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)。

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。

膵臓がん臨床検体において PRDM14 分子の発現亢進を認めた。

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。

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。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。

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リズされる遺伝子を候補遺伝子として同定した。

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。

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いるが、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、これまでに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

特記するべきことは無い。

#### 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, Nosho 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, Nosho 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, Nosho 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  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ )+ 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, Noshō 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) Noshō 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, Noshō 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. 41<sup>st</sup> 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