

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、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。上記

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 - トクレ - プ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)。

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(PC)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。

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。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。

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**, 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.
- 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**, Nosho 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