

動物モデルによる膵癌進展・転移抑制効果の検討に関する研究

担当責任者 中山 敬一 九州大学生体防御医学研究所 主幹教授

研究要旨

転移のメカニズムは未知の部分が多く残されているが、近年転移巣の周辺環境（転移ニッチ）が転移率や転移巣の増大に大きな役割を果たしているらしいことが突き止められている。われわれは有名な癌抑制遺伝子産物である Fbxw7 の研究を通じて、Fbxw7 が癌細胞自身だけでなく、周辺環境においても重要な役割を果たしていることを発見した。つまり Fbxw7 が転移ニッチで低下すると、ケモカイン CCL2 の分泌が上昇し、その結果として転移ニッチが活性化して、癌転移巣が増大するというものである。本研究では、現在臨床的に最も予後の悪い癌の一つである膵癌においても 3 - オキシゲルミルプロピオン酸重合体が転移抑制を示すかどうかを調べるため、まずマウスにおける膵癌の同種同所移植系の確立を目指した。そして宿主側の Fbxw7 の高低が膵癌細胞の転移能に影響を与えるかどうかを、コンディショナルノックアウトマウスを用いて検討したところ、骨髄由来細胞における Fbxw7 遺伝子が欠失すると膵癌の転移能が上昇する傾向が認められた。しかし統計的に有意な差は得られなかったため、もう少し検体数を増やして解析を行う必要がある。

A. 研究目的

癌制圧に対して、一つの大きな目標は転移の抑制である。特に膵癌は初期の発見が困難なため、しばしば発見時には既に転移していることも多い。また切除可能例においても、手術後に遠隔転移が発見されることもしばしばである。転移のメカニズムは未知の部分が多く残されているが、近年転移巣の周辺環境（転移ニッチ）が転移率や転移巣の増大に大きな役割を果たしているらしいことが突き止められている。われわれは有名な癌抑制遺伝子産物である Fbxw7 の研究を通じて、Fbxw7 が癌細胞自身だけでなく、周辺環境においても重要な役割を果たしていることを発見した。つまり Fbxw7 が転移ニッチで低下すると、ケモカイン CCL2 の分泌が上昇し、その結果として転移ニッチが活性化して、癌転移巣が増大するというものである。そこでわれわれは CCL2 の阻害薬である 3 - オキシゲルミルプロピオン酸重合体（商品名：セロシオン）で癌ニッチにおける CCL2 の役割を抑制する

ことによって、癌転移を防ぐことができるという可能性を考案した。この方法は既に動物実験レベルではメラノーマ・肺癌・乳癌由来の細胞については有効であることが示されている。本研究では、現在臨床的に最も予後の悪い癌の一つである膵癌においても 3 - オキシゲルミルプロピオン酸重合体が転移抑制を示すかどうかを検討することを目的とする。

B. 研究方法

マウス膵癌細胞株 PANC02 に蛍光タンパク質 tdTomato をコードする遺伝子をトランスフェクションし、tdTomato 発現する株を樹立する。それを C57BL/6 マウス（野生型）または Mx1-Cre/Fbxw7(F/F) マウス（既に poly(I):poly(C) を注射して骨髄由来細胞における Fbxw7 遺伝子を破壊したマウス）の膵臓に同種同所移植し、主要臓器（主に肝臓）における重量測定、肉眼的検査、顕微鏡的検査、免疫蛍光抗体法検査、等を行い、転移率や転移巣の大きさを評価し、宿主側の Fbxw7

の有無（特に骨髄由来細胞における Fbxw7 の有無）が転移率や転移巣の増大に影響するかどうかを検討する。

C. 研究結果

マウス膵癌細胞株 PANC02 に蛍光タンパク質 tdTomato をコードする遺伝子をトランスフェクションし、tdTomato 発現する株を樹立した。C57BL/6 マウス（野生型）の膵臓にその細胞株（ 5×10^5 個）を移植し、死亡するまでの時間を検討したところ、ほとんどのマウスは移植後 45～50 日で死亡することが明らかとなった。死亡個体を解剖してみると、肝臓に 1～数個の肉眼的な転移巣を認めた。また腹膜播種している個体も数例あったが、これは転移巣というよりも、移植時の人為ミスによって腹膜へ播種された可能性が高いと考えられた。

さらに C57BL/6 マウス（野生型）または Mx1-Cre/Fbxw7(F/F) マウス（既に poly(I):poly(C)を注射して骨髄由来細胞における Fbxw7 遺伝子を破壊したマウス）の膵臓に同種同所移植し、主要臓器（主に肝臓）における重量測定、肉眼的検査、顕微鏡的検査、免疫蛍光抗体法検査、等を行い、転移率や転移巣の大きさを検討した。現在まで骨髄特異的 Fbxw7 コンディショナルノックアウトマウスの方が野生型マウスよりも転移数や転移巣のサイズが大きい傾向が認められているものの、有意差が出るまでには至っておらず、もう少しサンプル数を増やして統計的な有意差を検討する必要がある。

D. 考察

3 - オキシゲルミルプロピオン酸重合体（商品名：セロシオン）は CCL2 の作用を抑制して転移を阻害するため、骨髄特異的 Fbxw7 コンディショナルノックアウトマウスにおいて転移能の差がないと 3 - オキシゲルミルプロピオン酸重合体の効果は期待できない。既にわれわれはメラノーマ・肺癌・乳癌細胞株において骨髄特異的 Fbxw7 コンデ

ィショナルノックアウトマウスにおいて転移能の増大を認めているが、それらの評価系は主に肺転移であった。今回の主要な転移先臓器は解剖学的に肝臓であることが予想され、肺転移の結果がそのまま適応できるかどうかは不明である。つまり本研究は、用いた癌細胞の種類と標的転移臓器が従来の研究と異なっており、3 - オキシゲルミルプロピオン酸重合体が多くの癌において広く利用できるかどうかを問う重要な研究になると考えられる。

E. 結論

本年度はマウスにおける膵癌同種同所移植系の確立と、その時間経過および対照と検討群（骨髄特異的 Fbxw7 コンディショナルノックアウトマウス）における転移能の比較を行った。野生型マウスに比較して骨髄特異的 Fbxw7 コンディショナルノックアウトマウスにおいて PANC02 の転移能の増加傾向は認められたが、統計的に有意な差は得られなかった。しかし、サンプル数を増やせば統計的な有意差が得られることが期待され、今後とも同様の検討を続けている方針である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Yumimoto, K., Akiyoshi, S., Ueo, H., Sagara, Y., Onoyama, I., Ueo, H., Ohno, S., Mori, M., Mimori, K. and Nakayama, K.I. F-box protein Fbxw7 inhibits cancer metastasis in a non-cell-autonomous manner. *J. Clin. Invest.* **in press** (2015).
2. Adachi, S., Homoto, M., Tanaka, R., Hioki, Y., Murakami, H., Suga, H., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hatta, T., Iemura, S. and Natsume, T. ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK-RSK

- pathway. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10037-10049 (2014).
3. Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yumimoto, K. and Nakayama, K.I. MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-Box RNA helicase DDX24.
 4. Yugi, K., Kubota, H., Toyoshima, Y., Noguchi, R., Kawata, K., Komori, Y., Uda, S., Kunida, K., Tomizawa, Y., Funato, Y., Miki, H., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kashikura, K., Endo, K., Ikeda, K., Soga, T. and Kuroda, S. Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data. *Cell Rep.* **8**, 1171-1183 (2014).
 5. Kanatsu-Shinohara, M., Onoyama, I., Nakayama, K.I. and Shinohara, T. Skp1-Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8826-8831 (2014).
- G-2. 学会発表
1. 中山敬一: がん幹細胞の撲滅による新しいがん治療法. 第12回日本免疫治療学研究会学術集会, 東京, 2/28, 2015.
 2. 中山敬一: がんにおける二つの謎: がん幹細胞とワールブルグ効果. 第3回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 福岡, 2/21, 2015.
 3. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: 90年来のがんの謎を解く. 第13回群馬大学大学院医学系研究科・大学院生によるワークショップ「未来を切り拓く医学研究」, 前橋, 2/13, 2015.
 4. 中山敬一: 次世代プロテオミクスを用いたがん特性の解明. 第45回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「がんの多様性に応じた研究・治療 - 創薬のパラダイムシフト -」, 東京, 1/13, 2015.
 5. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平: 90年来のがんの謎を解く. 第61回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡, 11/23, 2014.
 6. Nakayama, K.I.: Deep and absolute quantification of human proteome unveils a global landscape of cancer metabolism. The 4th Japan-France Cancer Workshop, Kyoto, 11/19, 2014.
 7. 中山敬一: がんにおける二つの謎: がん幹細胞とワールブルグ効果. 第134回山口県医師会生涯研修セミナー, 山口, 11/9, 2014.
 8. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平: 90年来のがんの謎を解く. 第23回長崎障害者支援再生医療研究会, 長崎, 11/4, 2014.
 9. 中山敬一: 癌幹細胞の理解と制御: 癌を完治させる治療戦略. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 9/26, 2014.
 10. 中山敬一: 次世代プロテオミクスと数理科学の融合が解き明かすがんの秘密. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 9/25, 2014.
 11. 中山敬一: コビキチンリガーゼFBXL5による鉄代謝制御とその破綻. 第38回鉄バイオサイエンス学会学術集会, 仙台, 9/6, 2014.
 12. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平: 90年来のがんの謎を解く. 第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会, 宮崎, 8/21, 2014.
 13. 中山敬一: がんの完治に向けた次世代型アプローチ. 第50回姫路市医師会夏期大学, 姫路, 7/27, 2014.

14. 中山敬一: 医学研究に貢献する最先端分析技術. 九州プロサーチオープニングセミナー, 福岡, 7/26, 2014.
15. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地: 90年来のがんの秘密を解き明かす. 第7回KAITEKI Forum, 東京, 7/8, 2014.
16. 中山敬一: 全タンパク質の絶対定量によるがん代謝シフトの解明. 第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 6/25, 2014.
17. Nakayama, K.I.: FBXL12 targets ALDHs for degradation in trophoblast stem cells to induce differentiation. The 12th Stem Cell Research Symposium, Fukuoka, 5/31, 2014.
18. 中山敬一: 次世代プロテオミクスと数理科学の融合が解き明かすがんの秘密. 生命科学系3分野がん・ゲノム・脳支援活動合同シンポジウム, 東京, 5/27, 2014.

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

発明の名称: 「癌の処置のための方法」

発明者: 中山敬一、三森功士

出願日: 2014年12月26日

出願番号: 特願 2014-266001

出願人: 国立大学法人九州大学

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。