

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 高野 博信

学位論文題名

EphA4 をターゲットとした膵癌新規予後予測バイオマーカーおよび
新規治療法の開発に関する研究
(Studies on development of new biomarker and therapeutics
for pancreatic cancer targeting EphA4)

【背景と目的】 膵癌は最も予後不良な癌のうちの一つである。外科的切除が膵癌の唯一の根治的な治療法であるが、早期診断の困難さから根治切除可能な膵癌患者は少数である。これまで手術療法、化学療法・放射線療法を含め、様々な治療法が膵癌に対して行われてきたが、どれも満足な結果は得られていない。膵癌患者の予後改善を目的とした新たな治療戦略の開発が求められている中で、遺伝子研究も進められ、K-ras 遺伝子や p53 遺伝子などを始めとした遺伝子の機能解析や治療に向けた研究開発が行われている。北海道大学大学院消化器外科Ⅱでは東京大学との共同研究により、膵癌で特異的に発現しているいくつかの遺伝子を同定し、中から EphA4 という遺伝子が膵癌で高発現し、その増殖に関与していることを証明した。2008 年には、Noberini らによって EphA4 と EphA2 を選択的に阻害することができる低分子化合物 (compound 1) が同定された。本研究では、EphA4 が膵癌の予後予測バイオマーカーとなり得るか、および compound 1 が膵癌の新規治療薬となり得るかを検証することを目的とした。

【材料と方法】

EphA4 の発現と膵癌患者の予後との相関

北海道大学病院消化器外科Ⅱで手術を施行した膵癌患者組織切片を用いて、免疫組織化学染色で EphA4 の発現の有無を確認し、患者予後および患者背景、病理学的因子との相関を解析する方法で行った。材料は 1995 年 1 月から 2005 年 12 月の 11 年間で、北海道大学病院消化器外科Ⅱで切除された膵癌患者症例から作成された 99 症例分の組織マイクロアレイを用いた。

Compound 1 の膵癌細胞株に対する増殖抑制効果および機序の判定 (*in vitro*)

膵癌細胞株を用いて EphA4 の発現の有無を検索した。膵癌細胞株 5 種類および正常線維芽細胞株 1 種類を用いて、定量的 PCR およびウエスタンブロット法にて EphA4 の発現の有無を確認した。その内、EphA4 陽性の膵癌細胞株 2 種と EphA4 陰性膵癌細胞株 1 種、正常線維芽細胞株を用いて、compound 1 の細胞障害効果の判定実験を WST assay にて行った。

作用機序の判定では癌細胞の増殖において活性化されているとされる 2 つのシグナリング経路 (Erk/Akt 経路) に着目し、ウエスタンブロット法にて解析することとした。また、細胞のアポトーシスの有無を検出する目的で、蛍光免疫染色法およびフローサイトメトリー法を行った。

膵癌同所移植マウスモデルにおける Compound 1 の膵癌細胞増殖抑制効果および副作用の判定 (*in vivo*)

6 週齢のメスのヌードマウスを用いて麻酔下に開腹し、ルシフェラーゼを導入した EphA4 陽性膵癌細胞株 (MIAPaCa-2) を膵被膜下に注入し、同所移植モデルマウスを作成した。細胞注入から 1 週間後に *in vivo* imaging system (IVIS) を用いて腫瘍の生着を確認し、治療を

開始した。治療は compound 1 群は compound 1 (50mg/kg) を週 5 回腹腔内投与し、コントロール群は compound 1 の溶媒である 1% DMSO を週 5 回腹腔内投与した。各群 6 匹ずつでの評価とした。治療効果の判定は治療開始 1, 2, 3, 4 週間後にそれぞれ IVIS を用いて、腫瘍の発光強度および広がりを経験した。4 週間の治療後にマウスは安楽死させ、腫瘍を摘出し重量測定を行った。

副作用評価として、安楽死処分の際に各群のマウスの主要臓器（脳、肺、心、肝、腎、脾）も同時に摘出し、免疫組織化学染色を行うと同時にマウスの治療前後での体重の推移の評価も行った。

【結果】

EphA4 の発現と膵癌患者の予後との相関

EphA4 は 99 症例中 46 例で陽性となり、EphA4 が陽性の患者は全生存期間において有意差をもって予後不良であった (P=0.029)。また、EphA4 の発現は他の患者背景および病理学的因子と相関を認めなかった。予後因子の検討では、単変量解析においては、EphA4 の発現の有無・リンパ節転移の有無・静脈浸襲の有無が有意差をもって予後に影響した。これらを用いた多変量解析では EphA4 の発現の有無とリンパ節転移の有無が独立した予後規定因子として抽出された。

Compound 1 の膵癌細胞株に対する増殖抑制効果および機序の判定 (*in vitro*)

EphA4 発現検索で判明した EphA4 陽性の膵癌細胞株 2 種 (MIAPaCa-2, PK59) と EphA4 陰性膵癌細胞株 1 種 (PCI-43P5)、正常線維芽細胞株 (HS-K) を用いて、compound 1 の細胞障害効果の判定実験を行った。その結果、compound 1 が終濃度 300 μ M 以上の濃度で EphA4 陽性細胞株に対して濃度・時間依存的に細胞増殖抑制効果を示し、EphA4 陰性細胞株に対してはそれらの効果を示さなかった。

Compound 1 投与下において、EphA4 陽性細胞株 (MIAPaCa-2) でのみ EphA4 のリン酸化および Akt のリン酸化の抑制が確認できた。また、compound 1 投与下において EphA4 陽性細胞株ではアポトーシスの誘導が確認された。

膵癌同所移植マウスモデルにおける Compound 1 の膵癌細胞増殖抑制効果および副作用の判定 (*in vivo*)

同所移植マウスにおける腫瘍の増大は compound 1 群で有意に抑制され (P<0.01)、摘出した腫瘍の重量においても両群で有意差を認めた (P<0.01)。摘出した主要臓器は、両群において明らかな組織学的異常を認めなかった。また両群での治療前後のマウス体重の推移も差を認めなかった。

【考察】

本研究では、EphA4 の発現の有無が膵癌切除後患者の予後と相関を認め、多変量解析でも EphA4 発現の有無が独立した膵癌患者の予後規定因子としてあげられた。同時にリンパ節転移の有無も既存の報告と同様に予後と最も強い相関を示しており、本研究の結果の妥当性を支持するものと考えられた。

治療実験では、*in vitro*, *in vivo* 共に compound 1 が EphA4 陽性膵癌細胞に対して有効な結果を示しており、どちらにおいても Akt 経路の抑制からアポトーシスを誘導していることが確認された。これまでも Akt 経路がアポトーシスに関与するという報告は多く、今回の結果もそれらと矛盾しないものであった。

副作用の観点からも、マウス腹腔内投与モデルでは、明らかな有害事象は認めず、compound 1 は今後のヒト膵癌治療に対して安全に臨床応用できる可能性が高いと考えられた。

【結論】

EphA4 は膵癌の有用な予後予測バイオマーカーになり得ること、および EphA4 阻害作用のある compound 1 は膵癌細胞株の増殖抑制効果を示し、膵癌の新規治療薬としての可能性を有することが示唆された