

島根大学プロジェクト研究 推進機構 『萌芽研究部門』	平成 2 4 年度	年度報告書		提出日 平成 25 年 2 月 15 日
① プロジェクト名	島根県に多い膵がんに対する抗体医薬開発			
② プロジェクトリーダー	浦 野 健	所 属	医学部病態生化学	
		電子メール	turano@med.shimane-u.ac.jp	
③ プロジェクトの概要（プロジェクトの最終年度における到達目標を簡潔に記入してください。）				
がんは死亡原因の 3 0 %以上（第一位）を占め、一年間に 3 5 万人以上が亡くなる国民病であり、さらに増加傾向にある。平成 2 1 ・ 2 2 年度「萌芽研究部門」研究プロジェクト「島根県に多い膵臓癌の撲滅をめざして」（プロジェクトリーダー本間良夫教授）の成果の一つとして、島根県のがん死亡率に関してがん全体では全国平均を下回るものの膵臓癌は全国平均より統計的有意差を持って高いこと、特に高齢者の膵がん患者が年齢補正後においても特徴的に多いことが明らかになった。膵がんは難治性がんの代表であり、画期的な新規治療法の開発が喫緊の課題である。 プロジェクトの最終年度までに、申請者が島根大学で樹立したハイブリドーマ G196（アミノ酸配列 DLVPR を認識するモノクローナル抗体を産生）と今回のプロジェクトにより樹立する膵がん表面抗原を認識する抗体を産生するハイブリドーマとのハイブリッドハイブリドーマを作製し、治療薬を低濃度で効率良く（すなわち副作用の出現頻度を押さえることが可能である）がんへ標的化する画期的な治療システムを確立する。				
④ プロジェクトのメンバー及び役割				
氏 名	所 属（職）	本年度の役割分担		
（プロジェクトリーダー） 浦野 健	医学部（病態生化学）・教授	研究プロジェクト全般および総括、 研究計画①：膵がんに対する新規治療法の開発		
田島 義証	医学部（総合・消化器外科）・教授	研究計画②：膵がん患者に対する新しい治療戦略の開発		
竹永 啓三	医学部（腫瘍生物学） ・准教授	研究計画③：膵がん細胞の特性解明		

⑤ (1) 本年度の研究計画目標の達成状況及び自己評価

(本年度当初の計画書に書かれた内容に沿って、計画と達成目標を箇条書きにしてください。また、その達成目標の項目ごとにその達成状況を記入し、以下の基準に従って自己評価して下さい。)

- A : 目標以上に成果をあげた。
- B : ほぼ目標通りの達成度で予定した成果をあげている。
- C : 計画より遅れ気味であるが年度末には目標達成が可能である。
- D : 年度末までに目標達成は不可能である。

自己評価が B 以外の場合には、その原因についても記載して下さい。2～3月に行う計画のため未執行の場合には評価を空欄にして下さい。)

計画と達成目標	達成状況と自己評価
研究項目①：膵がん細胞株表面においても発現を確認している G タンパク質共役受容体である PITPNM3 に対する特異的ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製する。 達成目標①-1： PITPNM3 に対する特異的ウサギポリクローナル抗体を作製する。 達成目標①-2： PITPNM3 に対する特異的マウスモノクローナル抗体を作製する。	(自己評価) A ・①-1: PITPNM3 の C 末端ペプチドに対する特異的ウサギポリクローナル抗体を 2 種類作製した。 ・①-2: ①-1 で作成した抗体を用いた解析の結果、PITPNM3 の C 末端は細胞表面に露出せず、細胞内に存在し、PITPNM3 は 7 回膜貫通型タンパク質であることが判明した。また、PITPNM3 が膜タンパク質であるため、タンパク質の発現が困難であったため、最終年度の目的遂行に向け計画を柔軟に変更した。→ 達成状況 ①' を追加した。 ・①'-1: 膵がんと同様に難治性がんの一つである卵巣がんで高発現しているがん関連転写制御因子 NAC1 に対する特異的な新規モノクローナル抗体を作製した (論文#1)。 ・①'-2: ①'-1 で作製したモノクローナル抗体を用いて、3 種類の膵がん細胞株で NAC1 の発現を確認した (論文#2)。 ・①'-3: 膵がん細胞株 MIA PaCa-2 を生細胞のまま免疫し、MIA PaCa-2 細胞表面を認識するモノクローナル抗体 4 種類を作製した (③-1 と関連)。
研究項目②：膵がん患者標本における PITPNM3 の発現様式を組織免疫染色により確認する。 達成目標②：膵がん患者 10 例における PITPNM3 の発現様式を組織免疫染色により確認する。	(自己評価) A ①-2 および ①'-2 の結果を受け、最終年度の目的遂行に向け計画を柔軟に変更した。 ・膵がん患者標本 65 例において NAC1 の発現様式を ①'-1 で作製したモノクローナル抗体を用いた組織免疫染色により確認した (論文#2)。
研究項目③：膵がん細胞株における新規表面抗原を同定する。 達成目標③-1：膵がん細胞株 MIA PaCa-2 における新規表面抗原を同定する。 達成目標③-2：膵がん細胞株 PANC-1 における新規表面抗原を同定する。	(自己評価) A 最終年度の目的遂行に向け計画を柔軟に変更した。 ・② の結果を受け、膵がん細胞株 MIA PaCa-2 における細胞浸潤能を検討した。NAC1 発現を抑制した場合、細胞浸潤能が有意に増すことが判明した。

(2) プロジェクト全体の自己評価 (プロジェクト全体としての達成目標から、今年度の研究成果がこれまでの経過・成果にもとづいてどの段階にあるのかを明示して下さい。また、各グループ間での連携状況についても記入してください。)

●プロジェクト全体評価(自己評価) プロジェクト全体としての達成目標に対する今年度の研究成果の達成状況について(自己評価) A

申請者が島根大学で樹立したハイブリドーマ G196 を応用した、膵がんの治療を目的とした抗体医薬開発が本プロジェクトの最終年度の達成目標である。目的遂行に向け当初の計画を柔軟に変更し対応し、当初の目的以上の成果を得た。

- 1) 膵がん細胞株 MIA PaCa-2 の細胞表面を認識するモノクローナル抗体を 4 種類樹立した。G196 のハイブリッドハイブリドーマ作製のパートナーとなる可能性が高い。
- 2) 膵がん患者標本の解析の結果、がん関連転写制御因子 NAC1 の低発現が、膵がんの悪性度と相関し、予後指標の一つとなる可能性が示唆された。また、NAC1 の下流遺伝子のうちがん細胞浸潤能を制御する遺伝子群が、膵がんの最適な治療標的となり得ることが判明した。NAC1 の下流遺伝子産物のなかで、膵がんの細胞表面に存在するタンパク質群を解明し、モノクローナル抗体を作製すれば、G196 のハイブリッドハイブリドーマ作製のパートナーとなる可能性が高い。

●各グループ間またはメンバーとの連携状況

3名のメンバーはほぼ毎日顔を合わせ、研究進捗状況を確認し、研究結果について議論をおこなった。緊密な連携の結果、論文#2はメンバー3名の、また論文#8はメンバー2名の共著となった。

⑥ 公表論文、学会発表など (当該研究に関連した本年度の公表論文、学会発表、特許申請の件数を一覧表に記入して下さい。発明等に関しては、差し支えない範囲で記載して下さい。)

論文掲載 (総件数)	17
学会発表 (総件数)	20
特許出願 (総件数)	0

【内訳】

●論文 (年度末までに発行される学術雑誌等(紀要も含む)に掲載が確定しているものも含め、代表的なものを10件程度選んで記入してください。)

1. Okazaki K, Nakayama N, Nariyai Y, Kato H, Nakayama K, Miyazaki K, Maruyama R, Kosugi S, **Urano T** and Sakashita G.: Nuclear localization signal in a cancer-related transcriptional regulator protein NAC1. **Carcinogenesis**, 33: 1854-1862, 2012.
2. Nishi T, Maruyama R, **Urano T**, Nakayama N, Kawabata Y, Yano S, Yoshida M, Nakayama K, Miyazaki K, **Takenaga K**, Tanaka T and **Tajima Y**.: Low expression of nucleus accumbens-associated protein 1 predicts poor prognosis for patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. **Pathol Int.**, 62: 802-810, 2012.
3. Sasagawa Y, Higashitani A, **Urano T**, Ogura T and Yamanaka K.: CDC-48/p97 is required for proper meiotic chromosome segregation via controlling AIR-2/Aurora B kinase localization in *C. elegans*. **J. Struct. Biol.**, 179: 104-111, 2012.
4. Hyodo T, Ito S, Hasegawa H, Asano E, Maeda M, **Urano T**, Takahashi M, Hamaguchi M and Senga T.: Misshapen-like kinase 1 (MINK1) is a novel component of striatin interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) and is required for the completion of cytokinesis. **J. Biol. Chem.**, 287: 25019-25029, 2012.
5. Hayashi A, Ishida M, Kawaguchi R, **Urano T**, Murakami Y and Nakayama J-I.: Heterochromatin protein 1 homologue Swi6 acts in concert with Ers1 to regulate RNAi-directed heterochromatin assembly. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 109: 6159-6164, 2012.
6. Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Hayashi Y, Enomoto M, Ibi M, **Urano T**, Yonemura S, Kiyono T, Izawa I and Inagaki M.: Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. **J. Cell Biol.**, 197: 391-405, 2012.
7. Monma H, Harashima N, Inao T, Okano S, **Tajima Y** and Harada M.: The HSP70 and Autophagy Inhibitor Pifithrin- μ Enhances the Antitumor Effects of TRAIL on Human Pancreatic Cancer. **Mol. Cancer Ther.**, in press

8. Shimojo Y, Akimoto M, Hisanaga T, Tanaka T, Tajima Y, Honma Y and Takenaga K.: Attenuation of reactive oxygen species by antioxidants suppresses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells. **Clin. Exp. Metastasis**, 30: 143-154, 2013.
9. Hashizume O, Shimizu A, Yokota M, Sugiyama A, Nakada K, Miyoshi H, Itami M, Ohira M, Nagase H, Takenaga K and Hayashi J.: Specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 109: 10528-10533, 2012.
10. Kawakami K, Hattori M, Inoue T, Maruyama Y, Ohkanda J, Kato N, Tongu M, Yamada T, Akimoto M, Takenaga K, Sassa T, Suzumiya J and Honma Y.: A novel fusococcin derivative preferentially targets hypoxic tumor cells and inhibits tumor growth in xenografts. **Anticancer Agents Med. Chem.**, 12: 791-800, 2012.

●学会発表（代表的なものを数件記入して下さい。）

- ・浦野 健. 特別企画 消化器癌治療を目指したトランスレーショナルリサーチ〈若手医師へのメッセージ〉トランスレーショナルリサーチを目指して消化器外科医から基礎医学者へ転向して JDDW 2012（第10回日本消化器外科学会大会）神戸 10/12/2012（招待講演）
- ・ Nakayama N, Sakashita G, Kato H, Nakayama K, Urano T. Biological and domain analysis of transcription factor NAC-1（English Oral Sessions）. 第71回日本癌学会学術総会 札幌 9/19/2012
- ・ Monma H, Harashima N, Inao T, Sekihara K, Okano S, Tajima Y, Harada M. Effect of pifithrin-μ, a new HSP70 and autophagy inhibitor, on TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. 第71回日本癌学会学術総会 札幌 9/20/2012
- ・ Shimojo Y, Akimoto M, Tajima Y, Honma Y, Takenaga K. N-Acetylcysteine suppresses hypoxia-induced EMT and hepatic metastasis of human pancreatic cancer cells. 第71回日本癌学会学術総会 札幌 9/20/2012

●特許出願

特になし

⑦ 外部資金獲得状況（当該プロジェクトに関連した外部資金について一覧の各項目に総件数、金額を記入して下さい。）

■外部資金獲得状況一覧		件数	金額(千円)
(1) 科研費 (配分額は間接経費を含む)		1	配分額 3,640
(2) 科研費以外の外部資金	受託研究	0	0
	共同研究	0	0
	寄附金・助成金	1	1,000
	合 計		4,640

【一覧内訳】

(1) 科研費（科目ごとに、テーマ、研究者、金額をそれぞれ列挙してください。）

（例）基盤(A)「研究テーマ」(研究者:〇〇) 〇〇〇千円

1. 新学術領域研究「がん微小環境における IL-33/ST2L 発現と悪性度進展への影響の解析」(研究者代表: 竹永啓三) 2,800 千円

(2) その他外部資金（一覧の項目別に、テーマ、研究者、金額を列挙してください。）

（例）受託研究「研究テーマ」(事業名)(研究者)〇〇千円

1. 助成金「膵臓がんを含む難治性腫瘍における脈管形成の機序に関する研究」(動脈硬化研究奨励会)(研究者代表: 竹永啓三) 1,000 千円

⑧ その他特筆すべき成果（受賞、シンポジウムの開催、産学連携・地域連携に関する各種見本市、展示会への出展等も含む。）

【大高連携】

島根県下の高校生を対象に、島根大学の研究紹介とがん・抗体医薬開発を含めた先端医学および科学技術の啓発のため講演および実験を行った。

1. 益田高校スーパーサイエンスハイスクール大高連携事業の一環として、益田高校2年生3名および浜田高校2年生3名の計6名を受入れ、2泊3日で講義と実験を行った。（左図）

浦野 健、平成24年10月17日～19日

2. 出雲高校理数科1年生41名を対象に講義を行った。

浦野 健（その他2講座と共同）、
平成24年12月15日

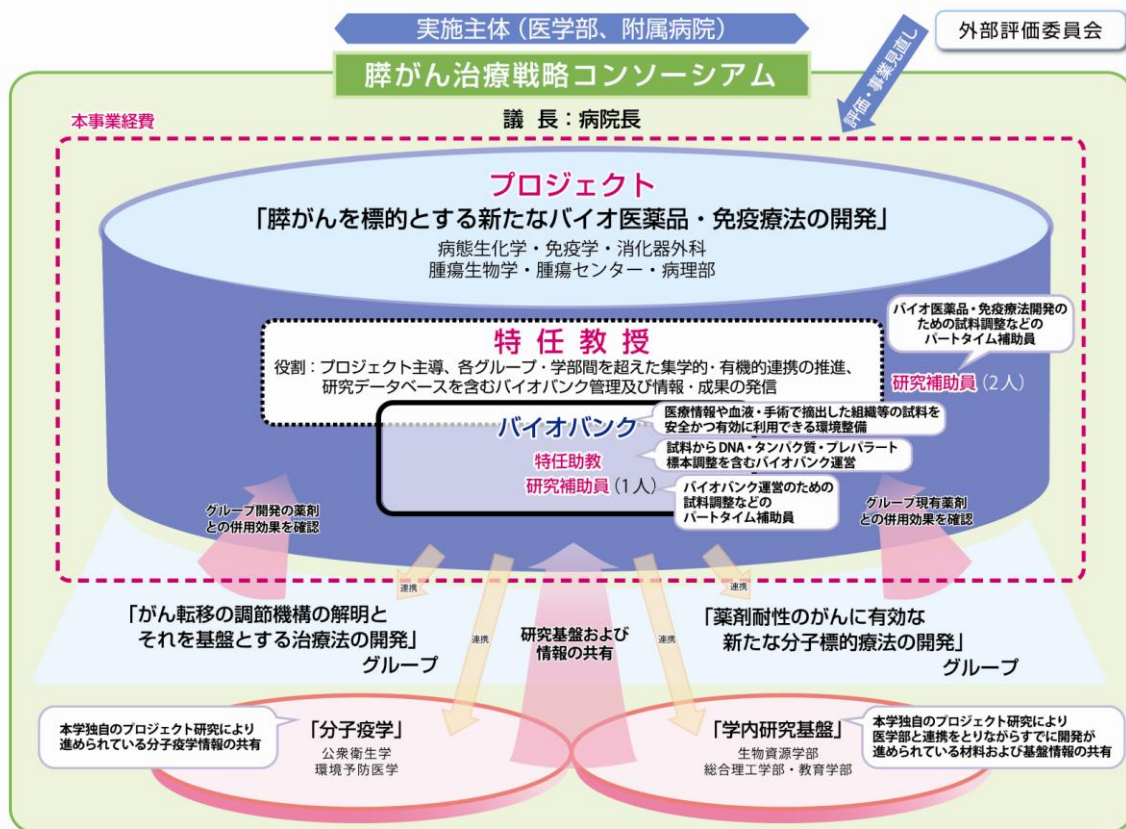
3. 出雲高校理数科2年生8名を病態生化学および腫瘍生物学で継続して受入れ、平成24年10月から月曜日の午後を利用して、講義および実験を平成25年2月まで行っている。

浦野 健、竹永啓三（その他1講座でも4名受入れ）、平成24年10月～平成25年2月



【島根大学 特別経費（プロジェクト分）】

本萌芽研究のメンバー3名をコアメンバーとして、さらに免疫学・腫瘍センターおよび病理部を加え、本萌芽研究を基盤としてさらに発展・展開させた研究プロジェクト「がん撲滅に向けての集学的研究の推進」（事業実施主体：医学部・附属病院）が文部科学省により採択された（平成25年度～29年度）（下図参照）。最終年度である平成25年度は、同プロジェクトとの相乗効果が期待される。



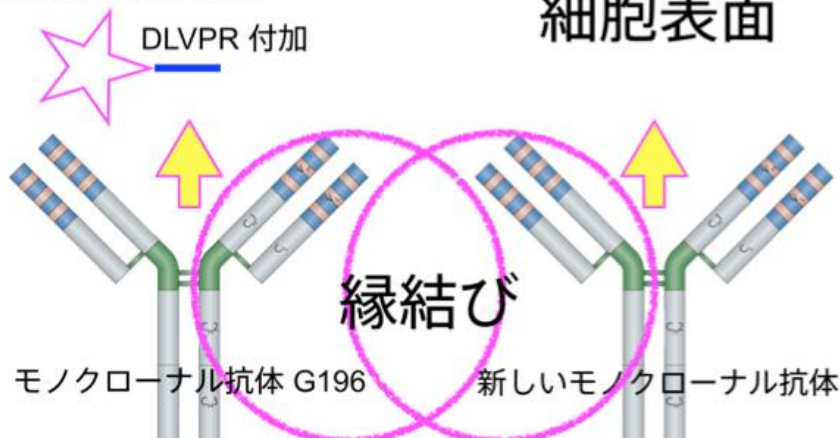
最終目標

膵がんに対する抗体医薬の開発

抗がん剤、RI
蛍光物質など

DLVPR 付加

膵がん
細胞表面



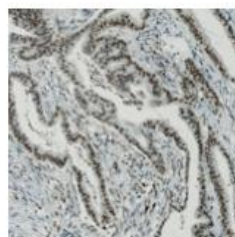
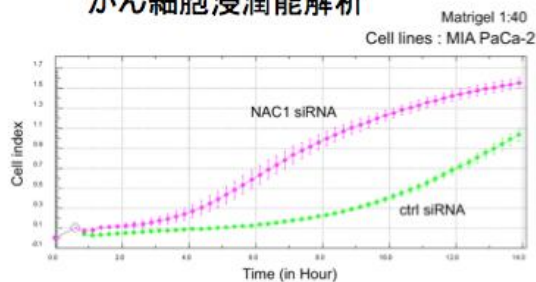
モノクローナル抗体樹立

本年度 研究成果

1) 膵がん細胞株 MIA PaCa-2
の細胞表面を認識する
モノクローナル抗体
4種類樹立！

2) がん細胞浸潤能を制御する
がん関連転写制御因子
NAC1の下流遺伝子産物が
膵がんの治療標的と判明！

がん細胞浸潤能解析



膵がん患者標本における
NAC1 発現解析