HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	高野, 博信
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12393号
Issue Date	2016-09-26
DOI	10.14943/doctoral.k12393
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/63304
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号：2267
File Information	Hironobu_Takano.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

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)

2016 年 9 月

北 海 道 大 学

高野　博信

目　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・・　1 頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2 頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　4 頁

実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5 頁

実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　12 頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　27 頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　30 頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　31 頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　32 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. Hironobu Takano, Toru Nakamura, Takahiro Tsuchikawa, Toshihiro Kushibiki, Kouji Hontani, Kazuho Inoko, Mizuna Takahashi, Shoki Sato, Hirotake Abe, Shintaro Takeuchi, Nagato Sato, Kei Hiraoka, Hiroshi Nishihara, Toshiaki Shichinohe and Satoshi Hirano
   Inhibition of Eph receptor A4 by 2,5-dimethylpyrrolyl benzoic acid suppresses human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice.
   Oncotarget. 6(38), 41063-41076 (2015).

本研究の一部は以下の学会に発表した.

2. 高野　博信、中村　透、那須　裕也、市之川　正臣、福田　直也、米森　敦也、佐藤　暢人、金井　基錫、野路　武寛、倉島　庸、海老原　裕磨、村上　壮一、田本　英司、松本　譲、土川　貴裕、岡村　圭祐、七戸　俊明、平野　聡

診断時切除不能膵癌に対する adjuvant surgery における切除範囲の検討.
-画像進展範囲と病理組織学的所見の対比から-

第 45 回日本膵臓学会, 2014 年 7 月 11-12 日, 小倉

緒 言

膵癌は最も予後不良な癌のうちの一つである[1]。外科的切除が本疾患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患者は少数である[2]。これまで膵癌に対して手術療法の他、化学療法・放射線療法を含め、様々な治療法が行われてきたが、どれも満足な結果は得られていない[3-5]。そのため、膵癌患者の予後改善には、新たな治療方法の開発が求められている。

最近では、膵癌の分野においても遺伝子治療が着目され、様々な遺伝子研究がなされるようになってきている。K-ras 遺伝子変異や p53 癌抑制遺伝子などは、古くから知られる癌遺伝子であるが、その他にも様々な癌特異的遺伝子の研究が行われている[6,7]。

北海道大学大学院消化器外科学分野 II と東京大学との共同研究により、中村ら[8,9]は膵癌組織と正常組織の遺伝子発現解析の比較から、膵癌で特異的に発現している複数の遺伝子を同定し、その中でエフリンレセプターA4 (EphA4) は膵癌の増殖に関与していることを証明した[10]。このことから、EphA4 は膵癌の予後予測因子あるいは新規の治療ターゲットとして大いに期待され、今回の研究対象として取り上げた。

EphA4 は受容体型チロシンキナーゼのエフリンファミリーの一つである。エフリンレセプター(Eph)は 1980 年代に同定され[11]、今では受容体型チロシンキナーゼの中の大きなサブグループの一つとなっている。Eph は細胞表面のエフリン(ephrin)をリガンドとして結合し活性化される。また、Eph は A タイプと B タイプの二つのサブファミリーに分類される。リガンドである ephrin も A および B の二つのサブクラスに分類され、通常は EphA には ephrinA が結合する。しかし、一部例外があり、EphA4 は ephrinB とも結合する[12]。ヒトにおいては Eph/ephrin の結合による様々なシグナル経路の活性化が報告されている[13]。癌に関しても、Eph/ephrin 結合が Ras-Erk/Akt 経路やインテグリンを介した経路および上皮間葉転換などを介して癌細胞の増殖や遊走・浸潤を促進することが知られている[14]。EphA4 に着目すると、胃癌や乳癌・肺癌において、その発現と予後との相関が報告されている[15-17]が、膵癌に関する報告はない。EphA4 に関しては、そのシグナル経路を含め、未だ広く研究が進んでいないのが現状である。

2008 年、Noberini ら[18]によって EphA4 とエフリンレセプターA2(EphA2)を選択的に阻害することができる低分子化合物 (2,5-dimethylpyrrolyl benzoic acid ; 以下, compound 1 と略記) が同定された。これまで Eph/ephrin 結合を阻害する治療戦略に関し、様々なペプチドや低分子化合物が開発されてきた

[19,20]。神経系疾患においては、筋委縮性側索硬化症において EphA4 の発現がその予後と相関があると報告されており、Compound 1 についても筋萎縮性側索硬化症の動物モデルで生存期間を延長する効果があったことが示されている[21]。

本研究では、EphA4 の膵癌の予後予測バイオマーカーとしての有用性の評価、および Compound 1 を用いた EphA4 阻害による膵癌増殖抑制効果を評価し、EphA4 が膵癌の新規治療ターゲットとなり得るかを明らかにすることを目的とする。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

CA19-9	Carbohydrate antigen 19-9
cDNA	complementary DNA
CEA	Carcinoembryonic antigen
D-MEM	Dulbecco’s modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
E-MEM	Eagle’s minimal essential medium
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
HE	Hematoxylin and eosin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonucleic acid
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SEM	Standard error of the mean
TMA	Tissue microarray
TUNEL	TdT- mediated dUTP nickend labeling
UICC	Union for International Cancer Control

実験方法

１）症例ならびに組織マイクロアレイ（TMA）

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で切除された膵癌症例を対象とした。このうち、先に報告した方法[22]にて当教室で作成した TMA の 99 症例を検証し、腫瘍病理学的情報・予後情報が確認不可能であった症例を除いた 84 例について解析を行った。84 症例の臨床病理学的因子の内容は表 1 に示す通りである。

表１　全 84 症例の臨床病理学的情報

		N=84
Gender	male/female	51/33
Age		66.5(44-89)
Location	Pancreas head/body,tail	63/21
CEA		4.9(1.1-70.8)
CA19-9		143.4(1.0-19238.4)
Tumor size		3.0(1.0-7.3)
pStage(UICC)	2a≦/2b≧	31/53
Lymph node metastasis	negative/positive	31/53
Lymphatic invasion	negative/positive	22/52
Venous invasion	negative/positive	11/73
Neural invasion	negative/positive	7/77

病理組織診断は UICC (Union for International Cancer Control)による TNM 分類（第 7 版）[23]に準拠して検討を行った。すべての対象症例は十分なインフォームドコンセントの上で同意を得ており、また本研究は北海道大学病院において自主臨床研究の承認を得ている(自 014-0221)。

２）細胞株

本研究においては、ヒト膵癌細胞株として SUIT-2、MIAPaCa-2、PK-59、Panc-1 および PCI-43P5 を、ヒト正常線維芽細胞株としての HS-K の計 6 種類を使用した。MIAPaCa-2、PK-59 と Panc-1 はそれぞれ American Type Culture Collection (ATCC)より購入、SUIT-2 と HS-K は理化学研究所より購入、PCI-43P5 は当研究室でヒト膵癌検体より過去に樹立した膵癌細胞株である。

細胞培地としては、MIAPaCa-2 と Panc-1 は D-MEM(Wako)、HS-K は E-MEM(Wako)、その他は RPMI-1640(Wako)を使用した。また、各種培地にはいずれ

もウシ胎児血清（FBS, Cell culture Bioscience）と抗生剤ペニシリン/ストレプトマイシン(Life technologies)を添加し、それぞれ終濃度を10%、1%とした。いずれの細胞株も5%CO_2下、温度37度でインキュベーター内で培養を行った。

３）免疫組織化学染色

FFPE（Formalin-fixed, paraffin-embedded）ブロック、TMAブロック、および細胞株のセルブロックは、5μmに薄切した。パラフィン切片をキシレンにて脱パラフィン後にエタノールで脱水し、pH 6.0のクエン酸溶液中で15分間加熱し、抗原を賦活化した。内因性ペルオキシダーゼ活性を0.3%H_2O_2加メタノールにて除去した。ブロッキングには市販の製剤である10%ヤギ血清（Nichirei）およびantibody diluent with background reducing components(DAKO)を使用した。免疫組織化学染色にはHistofine series(Nichirei)を使用した。1次抗体反応時間は4℃、over nightで行った。各抗体の種類および希釈濃度は表2に示す通りである。2次抗体は20分、室温で反応させた。免疫組織化学反応は基質（DAB, Nichirei）を反応後、ヘマトキシリンで核染色を行い検出した。

組織内のアポトーシスを検出するためにTUNEL法を用いて検討を行った。Apoptosis in situ Detection Kit Wako（WAKO)を使用し、推奨プロトコール通り染色を行った。また、腫瘍細胞増殖マーカーとしてKi-67（DAKO）を使用した。

表２　抗体種類および希釈濃度

Molecule	Clonality	Dilution	Manufacture
Eph receptor A4	pRa	1 : 100	Abcam
Eph receptor A2	pRa	1 : 50	Abcam
Ki-67	mMo	1 : 300	Dako
Phospho-Akt（Ser473）	mRa	1 : 50	Cell Signaling

pRa: rabbit polyclonal, mRa: rabbit monoclonal, mMo: mouse monoclonal

免疫組織化学染色の評価法として、EphA4およびEphA2の染色強度を①スコア2+（腫瘍細胞のうち50%以上が染色されるもの)、②スコア1+（腫瘍細胞のうち50%未満のみ染色されるもの)、③スコア0（全く染色の見られないもの）の3段階に分けて判定し、スコア2+ の症例のみ陽性症例としてカウントした。これらの評価は臨床情報を把握しない3人の独立した実験者によって行った。

４）定量的 RT-PCR

目的となる細胞を回収後、RNAeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて total RNA を抽出し、その後 PrimeScript RT Master Mix (TAKARA BIO)を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

合成した cDNA の標的配列を作製した特異的プライマーにて、StepOne Real-time PCR system (Applied Biosytems)を用いて増幅し、comparative C_T method を用いて定量化した。定量補正にはハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* を用いた。プライマーは事前にその特異性を確認してから使用した。全ての実験を duplicate にて行った。使用したプライマーを表 3 に示す。

表３　プライマー配列

Human	Forword	Reverse
EphA4	5’-GACCTGAAACTGTAGCAGTGACTC-3’	5’-TGCCAACGCTGCTCCTG-3’
GAPDH	5’-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3’	5’-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3’

５）ウエスタンブロット

目的となる細胞の Cell lysate から RIPA(Radio-Immunoprecipitation Assay) Buffer、aprotinin、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を用いてタンパク抽出を行った。EphA4 タンパクは 7.5%SDS-PAGE を行い、その他の標的タンパクについては 15%SDS-PAGE を行った。 転写メンブレンはニトロセルロースメンブレン(Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules)を用いて転写を行った。1 次抗体は表 4 に示す種類および希釈濃度のものを使用し、2 次抗体は gout anti-mouse or rabbit antibody (1:10,000 dilution,Jackson ImmunoResearch. Immunoreactivity)を使用し、Image Lab & ChemiDoc XRS Plus system (BIO RAD)を用いて同定した。ローディングコントロールには、β-Actin を用いた。

表４　ウエスタンブロット１次抗体種類および希釈濃度

Molecule	Clonality	Dilution	Manufacture
EphA4 Receptor	mMo	1 : 150	Invitrogen
EphA2 (D4A2)	mRa	1 : 1000	Cell Signaling
EphA4 phospho-specific (Try-602)	pRa	1 : 500	ECM Biosciences
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)	mRa	1 : 1000	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Try204)	mRa	1 : 2000	Cell Signaling
Akt	pRa	1 : 1000	Cell Signaling
Phospho-Akt (Ser473)	pRa	1 : 1000	Cell Signaling
β- Actin (C4)	mMo	1 : 1000	Millipore

mMo: mouse monoclonal, mRa: rabbit monoclonal, pRa: rabbit polyclonal

６）細胞増殖アッセイ（WST assay）

膵癌細胞株に対する compound 1 の抗腫瘍効果を検討する目的で、細胞増殖 assay による検討を行った。MIAPaCa-2、PK-59、PCI-43P5 をそれぞれ $5x10^3$/well ずつ、HS-K を $2.5x10^3$/well ずつ 96 well dish に apply し、24 時間培養を行った。その後に、compound 1 を終濃度が 200、300、400μM となるように各 well に投与し、24 または 48 時間共培養を行った。対照群として compound 1 の溶媒である 1%ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。24 または 48 時間の共培養後、Cell Counting Kit-8 (WST-8, DOJINDO)を 10μl ずつ各 well に投与して 4 時間後に Microplate reader(450nm)で吸光度を測定し、生存細胞量について検討を行った。

７）Signaling pathway 解析

Compound 1 による膵癌細胞増殖抑制のメカニズムの解析のため、癌細胞増殖に関連する signaling pathway の解析を行った。解析は上記に示したウエスタンブロット法を用いて行った。細胞培養条件は、膵癌細胞株の MIAPaCa-2 および PCI-43P5 の細胞を 6-well plate に 1-well あたり 1×10^5 個撒き、10% FBS 入りのメディウムで 24 時間培養後に終濃度が 400μM の compound 1 または 1% DMSO を投与し、0,1,2,4 時間共培養後のタンパクを抽出した。また、リガンドと EphA4 の相互作用を確認するために、MIAPaCa-2 細胞を同様に 24 時間培養後に FBS 添加なしのメディウムに交換し 2 時間培養。その後、終濃度が 400μM の compound 1 または 1% DMSO を投与し 1 時間共培養した後に 10ng/ml のリガンド（recombinant human ephrin-A4, R&D system）または PBS のみ投与し、1

時間共培養し、タンパク抽出の条件で検討を行った。

８）蛍光免疫染色

培養細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 30 分固定後、非イオン性界面活性剤（0.5% Triton X-100）を用いて 5 分間透過処置を行い、1%ウシ血清アルブミン（BSA）にて 1 時間ブロッキングを行った。1 次抗体としては、抗 pan-cytokeratin 抗体（Affimetrix）および抗 cleaved caspase-3 抗体（Cell Signaling）を用い、培養細胞と室温で 1 時間共培養後に PBS で洗浄し、2 次抗体として Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG（Life Technologies）を用いて 1 時間共培養した。その後に封入体として Dapi-Fluoromount-G（SouthernBiotech）を用いて封入し、BIOREVO BZ-9000（Keyence）を用いて観察した。

９）フローサイトメトリー

Compound 1 投与によるアポトーシス誘導の有無の確認をフローサイトメトリー法を用いて行った。アポトーシスの検出には、Annexin V-FITC Early Apoptosis Deteciton Kit (Cell Signaling) を用いた。培養細胞を FITC-Annexin V およびヨウ化プロピジウム (PI) にて染色し、FACS canto II (BD Biosciences) を用いて検出した。解析は FlowJo software V7.6.5 (Tomy Digital Bilogy) を用いて行った。

１０）同所移植モデルマウスの作成

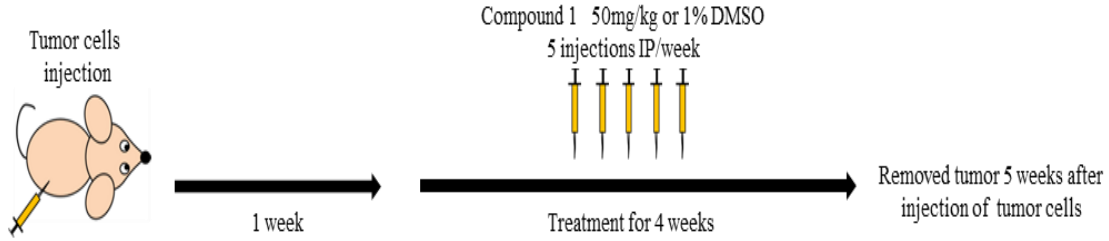
マウスはメス BALB/c-nu/nu マウス（CLEA）の 6 週齢を使用した。膵癌細胞株 MIAPaCa-2(5×10^5個)を 30μl のマトリゲル（Corning）を含んだ Hanks Balanced Buffer Solution (HBBS, Life technologies)に溶解し 50μl とした。マウスをケタミン（100mg/kg）とキシラジン（10mg/kg）にて十分な麻酔下に左側腹部を切開し、膵・脾臓を引き出した。その後、27 ゲージ針で膵被膜下に MIAPaCa-2(5×10^5個)を注入した。刺入部から細胞が漏れ出るのを防ぐため、刺入部を綿棒で 30 秒間圧迫したのちマウス用サージカルクリップで閉腹した。予備実験で 5 週後に腫瘍を確認したところ、図 1 に示すように腫瘍が樹立できたことが確認できた。

図１　同所移植モデルマウス作成

１１）*in vivo* 実験治療スケジュール

in vivo 実験の治療スケジュールは図２に示すように行った。すなわち、メス BALB/c-nu/nu マウス（CLEA）の 6 週齢マウス（CLEA）に前述の方法にてルシフェラーゼで標識した（方法については後述）膵癌細胞株 MIAPaCa-2 を注入し、1 週間後に IVIS（in vivo imaging system）を用いて腫瘍の生着を確認した。確認できたら compound 1（50mg/kg）、または 1% DMSO を週 5 回の頻度で腹腔内注射にて投与した。この治療を 4 週間行い、1 週間ごとに IVIS にて腫瘍の増殖をモニタリングした。4 週間の治療後にマウスを安楽死させ、腫瘍を摘出し腫瘍の重量を測定した。また、その際に副作用評価のため、生命維持に必要な主要臓器（脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓）も摘出した。これらの動物実験に関しては、北海道大学動物実験に関する規程に従って行った。

図２　*In vivo* 実験治療スケジュール



１２）IVIS を用いた治療効果判定法

膵癌細胞同所移植モデルの腫瘍増殖の経時的モニタリングには、*in vivo* imaging system（Xenogen IVIS）を用いて行った。使用する膵癌細胞株 MIAPaCa-2 にはレンチウイルスを用いてルシフェラーゼを導入し、恒常的に発現させるようにした。IVIS を用いた測定の際には、まずマウスをケタミン（100mg/kg）とキシラジン（10mg/kg）にて十分な麻酔下におき、ルシフェリン（200μl）を腹

腔内投与した。ルシフェリン投与後 10 分後にマウスを Xenogen IVIS にセッティングし、露光時間は 10 秒の設定で腫瘍細胞の発光を確認した。この測定方法で治療開始前、治療開始後 1,2,3,4 週間後の計 5 回、各マウスでの測定を行った。発光強度、腫瘍の広がりの解析には Living imaging software 3.2(Xenogen)を使用した。

１３）統計解析

In vitro のデータの統計解析にはパラメトリック検定を適用し、群間検定には、Student’s *t*-test を使用した。臨床検体のデータの統計解析にはノンパラメトリック検定を適用し、群間検定には Man-Whitney *U* test を、臨床病理学的因子の相関解析には Fisher’s exact test、または χ^2 test を用いた。多変量解析には Cox ハザードモデルを使用した。生存期間は手術日から死亡または最終確認生存確認日までの日数とし、Kaplan-Meier 法を用い log-rank test にて群間の比較検定を行った。数値データは平均値±SEM で示し、$P < 0.05$ を有意差ありとした。統計計算と解析には JMP 10 software を使用した。

実験結果

１）EphA4 の発現の有無は膵癌患者の予後に関連する

EphA4 の発現の有無と膵癌患者の予後との相関を検討するため、まず教室で作成した膵癌切除標本の TMA を用いて、膵癌患者の中の EphA4 発現患者の割合を調べた。また、本研究で用いる阻害剤は EphA2 も阻害する作用を有するため、EphA2 の発現についても同時に検討した。染色条件決定の際には、正常膵管組織が染色されない条件で設定した。EphA4 の発現陽性例と陰性例を図 3A に示す。また、EphA2 においても、同様に発現陽性例と陰性例を図 3B に示す。

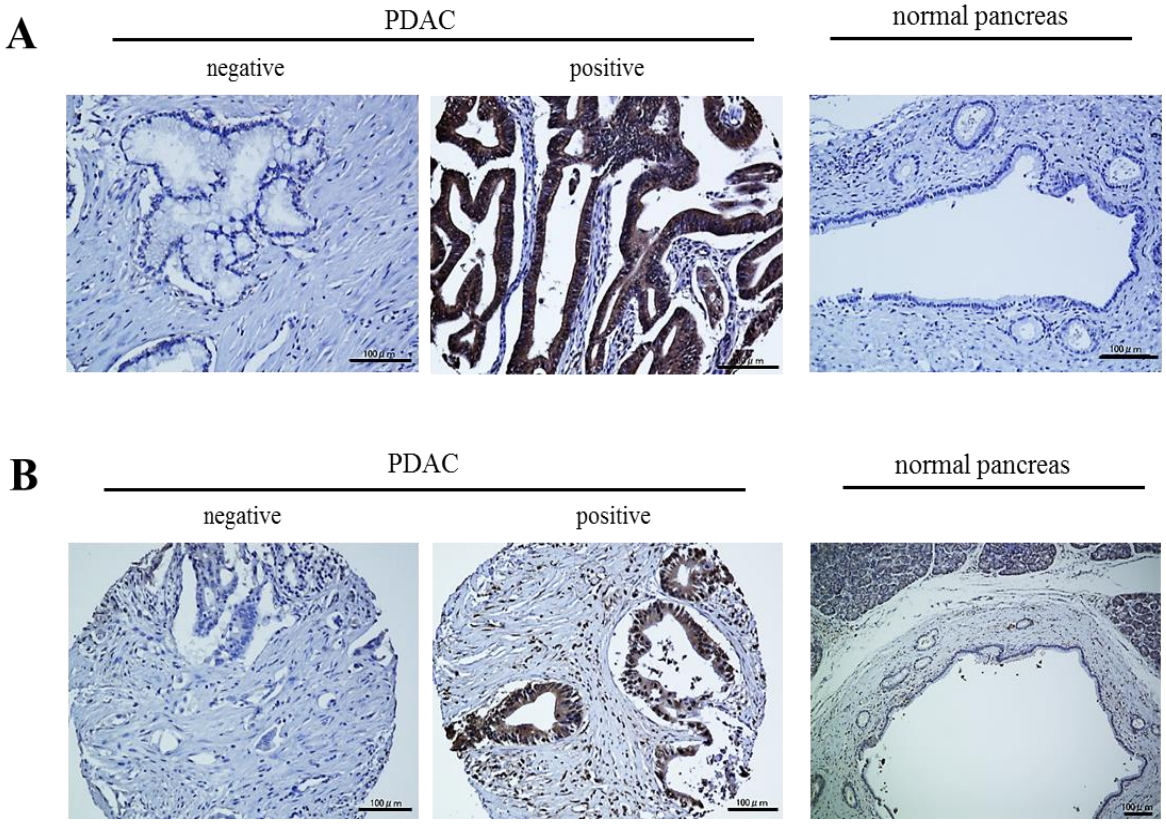


図 3　膵癌切除標本における EphA4、EphA2 の発現の有無

A）膵癌症例と正常膵管における免疫組織化学染色での EphA4 の発現の有無。Scale bar:100μm

B）膵癌症例と正常膵管における免疫組織化学染色での EphA2 の発現の有無。Scale bar:100μm

本研究で使用した TMA に含まれる 99 症例中、前述の評価法により評価した結果、EphA4 発現を有する症例は 46 例（46.5%）、EphA2 発現を有する症例は 71 例（71.7%）であった。99 症例中、予後や臨床病理学的因子などの確認できた 84 例をさらに解析した。

全生存期間で EphA4 および EphA2 の発現の有無の 2 群で比較を行うと、EphA4 発現を有する症例では有意に予後不良であった（P=0.029，図 4A）。EphA4 陽性群および陰性群での生存期間の中央値はそれぞれ 9.6 ヶ月と 20.1 ヶ月であった。EphA2 では 2 群間に有意差を認めなかった（P=0.464，図 4B）。

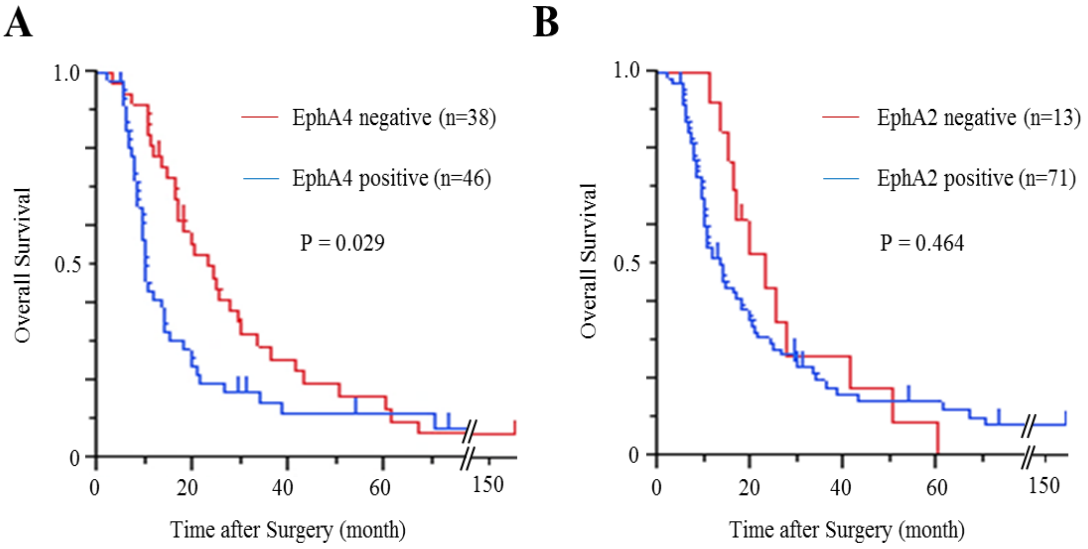


図 4　EphA4/2 の発現の有無での全生存期間の比較（Kaplan-Meier 曲線）

A）EphA4 発現陽性症例で有意に予後不良な結果であった（P=0.029）

B）EphA2 発現の有無では 2 群間に有意差を認めなかった（P=0.464）

次に、EphA4 の発現の有無およびその他の臨床病理学的因子と予後との相関を検討し、表 5 に示す結果を得た。単変量解析では、EphA4 の発現・リンパ節転移・静脈侵襲の有無が予後との相関を認めた。さらに多変量解析を行うと、EphA4 発現の有無（P=0.039）とリンパ節転移の有無（P=0.014）が独立した予後規定因子として相関を示した。

表 5　膵癌患者の予後との相関解析

		Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	N=84	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
Age (<70 / ≥70)	57 / 27	1.217 (0.732-1.973)	0.438		
Gender (M / F)	51 / 33	0.834 (0.509-1.341)	0.457		
Location (head / body,tail)	63 / 21	0.700 (0.387-1.195)	0.197		
CEA (<5.0 / ≥5.0)	43 / 41	1.540 (0.952-2.485)	0.077		
CA19-9 (<37.0 / ≥37.0)	19 / 65	1.595 (0.924-2.932)	0.095		
Tumor size (<2.5 / ≥2.5)	19 / 65	1.413 (0.821-2.572)	0.218		
EphA4 (- / +)	38 / 46	1.678 (1.048-2.704)	0.030	1.648 (1.025-2.667)	0.039
Lymph node metastasis (- / +)	31 / 53	2.123 (1.273-3.652)	0.003	1.909 (1.136-3.310)	0.014
Lymphatic invasion (- / +)	22 / 62	1.438 (0.851-2.548)	0.178		
Venous invasion (- / +)	11 / 73	2.129 (1.031-5.171)	0.040	1.979 (0.945-4.862)	0.072
Neural invasion (- / +)	7 / 77	1.830(0.851-4.771)	0.129		

また、膵癌患者における EphA4 の発現の有無とその他の臨床病理学的な因子との相関についても検討したが、表 6 に示すようにその他の因子との相関は認めなかった。

表 6　EphA4 と他の臨床病理学的因子との相関

	EphA4 positive (N=46)	EphA4 negative (N=38)	P-value
Gender			0.630
male	29	22	
female	17	16	
Age			0.803
	68(44-89)	65(45-82)	
Location			0.076
Pancreas head	38	25	
Pancreas body/tail	8	13	
CEA			0.886
	5.85(1.3-39.7)	3.4(1.1-70.8)	
CA19-9			0.379
	170.25(1.0-6605.9)	116.7(1.0-19238.4)	
Tumor size			0.805
	3.2(1.0-7.3)	3.0(1.5-6.0)	
pStage(UICC)			0.388
2a≤	15	16	
2b≥	31	22	
Lymph node metastasis			0.388
negative	15	16	
positive	31	22	
Lymphatic invasion			0.981
negative	12	10	
positive	24	28	
Venous invasion			0.506
negative	5	6	
positive	41	32	
Neural invasion			0.509
negative	3	4	
positive	43	34	

以上の結果から、EphA4 は膵癌患者の約半数に発現を有し、EphA4 発現を認める症例は予後不良であり、EphA4 発現の有無はリンパ節転移と並んで膵癌患者において独立した予後規定因子であることが示唆された。

２）EphA4 阻害剤（compound 1）は EphA4 陽性膵癌細胞株の増殖を抑制する

EphA4/EphA2 阻害剤である compound 1 の膵癌における治療効果を判定する目的で、まず *in vitro* での治療実験を行った。実験に使用する膵癌細胞株を決定するため、各種膵癌細胞株における EphA4 および EphA2 の発現を定量的 PCR およびウエスタンブロット法を用いて探索した。また、正常コントロールとして正常皮膚線維芽細胞株である HS-K においても EphA4 および EphA2 の発現について調べた。その結果、定量的 PCR において EphA4 発現は膵癌細胞株 MIAPaCa-2,PK-59 にて高発現であり、ウエスタンブロットでも、膵癌細胞株 MIAPaCa-2,PK-59 において EphA4 の発現を認めた（図 5A,5B)。EphA2 については検索したすべての細胞株で発現を認めた（図 5B)。

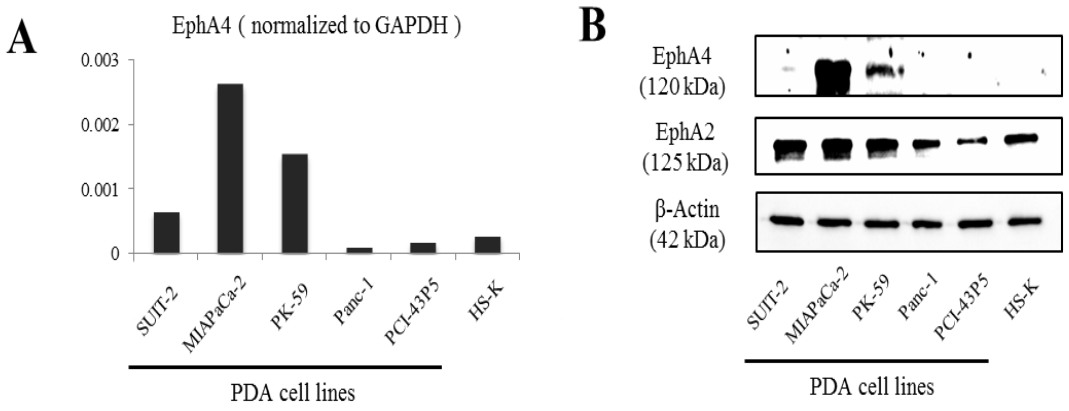


図 5　膵癌細胞株および正常細胞株における EphA4/EphA2 発現

A) 定量的 RT-PCR。膵癌細胞株 MIAPaCa-2,PK-59 においてより強い EphA4 発現を認めた。

B) ウエスタンブロット解析。膵癌細胞株 MIAPaCa-2,PK-59 に EphA4 発現認め、EphA2 についてはすべての細胞株に発現を認めた。

上記の結果より、EphA4 陽性膵癌細胞株として MIAPaCa-2 と PK-59、EphA4 陰性膵癌細胞株として PCI-43P5、正常コントロールとして HS-K を用いて compound 1 の細胞増殖効果を判定することとした。投与する compound 1 濃度は、Noberini らの報告を参考に、EphA4 活性を抑制し正常細胞に対する傷害効果を認めないとされる終濃度 400μM を上限として終濃度 200,300,400μM の濃度で検討することとした。結果は図 6 に示す通り、EphA4 陽性膵癌細胞株 MIAPaCa-2 に対しては 24 時間培養下では 300μM 以上、48 時間培養下では 200μM 以上で有意に増殖抑制効果を示した。また同様に EphA4 陽性膵癌細胞株 PK-59 に対しては 24 時間培養下では有意な効果は示さなかったが、48 時間培

養下では300μm以上の濃度で有意な増殖抑制効果を示した。PCI-43P5,HS-Kに対してはいずれの時間・濃度においても有意な効果は示さなかった。

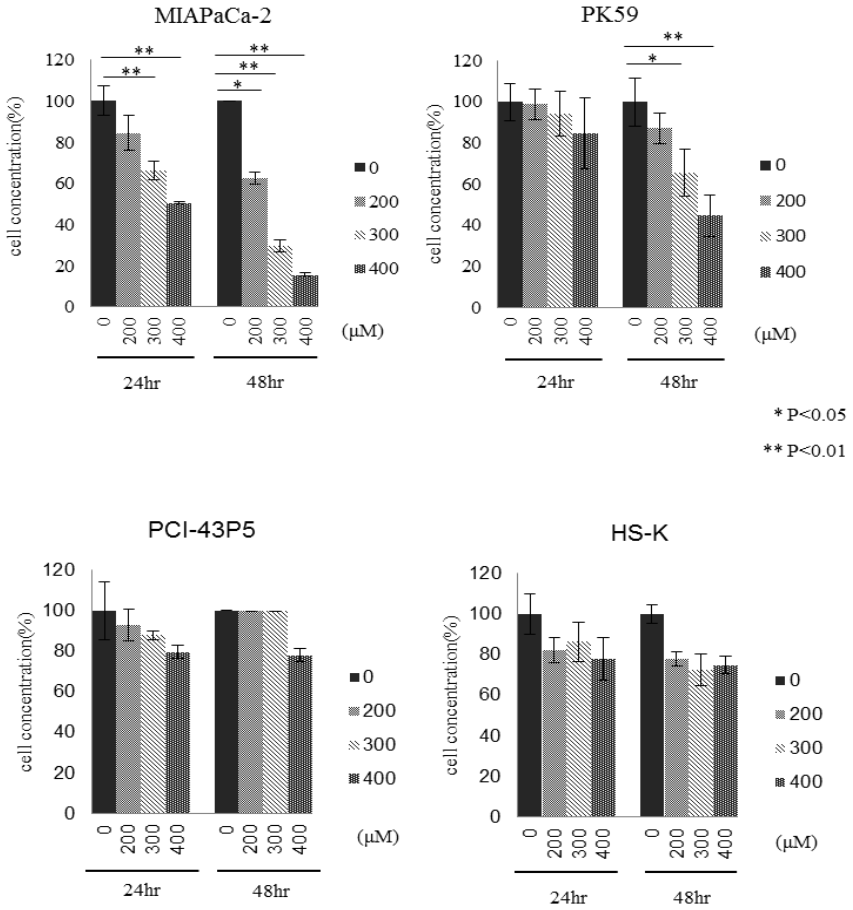


図6　compound 1の膵癌および正常細胞株に対する増殖抑制効果

細胞増殖アッセイ。MIAPaCa-2に対しては24時間培養下では300μM以上、48時間培養下では200μM以上で有意に増殖抑制効果を示した。PK-59に対しては24時間培養下では有意な効果は示さなかったが、48時間培養下では300μm以上の濃度で有意な増殖抑制効果を示した。PCI-43P5,HS-Kに対してはいずれの時間・濃度においても有意な効果は示さなかった。各々のアッセイは3回ずつ行い、P<0.05を有意とした。

以上の結果から、compound 1は時間および濃度依存的にEphA4陽性膵癌細胞株に対して増殖抑制効果を有することが示された。MIAPaCa-2とPK-59に対する効果の違いから、その効果はEphA4の発現強度に依存することが示唆された。また、すべての細胞株がEphA2陽性であることから、本実験で使用した濃度では、compound 1の細胞増殖抑制効果はEphA4阻害による効果であることが推測された。

３）compound 1 は EphA4 のリン酸化および Akt のリン酸化を抑制する経路を介して EphA4 陽性膵癌細胞のアポトーシスを誘導する

Compound 1 が示す EphA4 陽性膵癌細胞に対する増殖抑制効果の機序を明らかにする目的で癌細胞増殖に関与することが知られる 2 つの経路（Erk/Akt 経路）に着目して検討を行った。EphA4 陽性膵癌細胞株 MIAPaCa-2 および EphA4 陰性膵癌細胞株 PCI-43P5 から前述の培養条件で抽出したタンパクを用いて、EphA4, EphA2, Erk, Akt の発現およびそのリン酸化の有無をウエスタンブロット法にて確認した。その結果、EphA4 陽性膵癌細胞株 MIAPaCa-2 において、compound 1（400μM）投与下では EphA4 のリン酸化が抑制されていることが確認できた。また、Erk/Akt 経路に関しては Akt のリン酸化が抑制され Erk のリン酸化がやや亢進する結果となった。EphA4 陰性膵癌細胞株 PCI-43P5 では compound 1 投与下においても、Erk/Akt 経路ともにそのリン酸化への影響は見られなかった（図 7）。

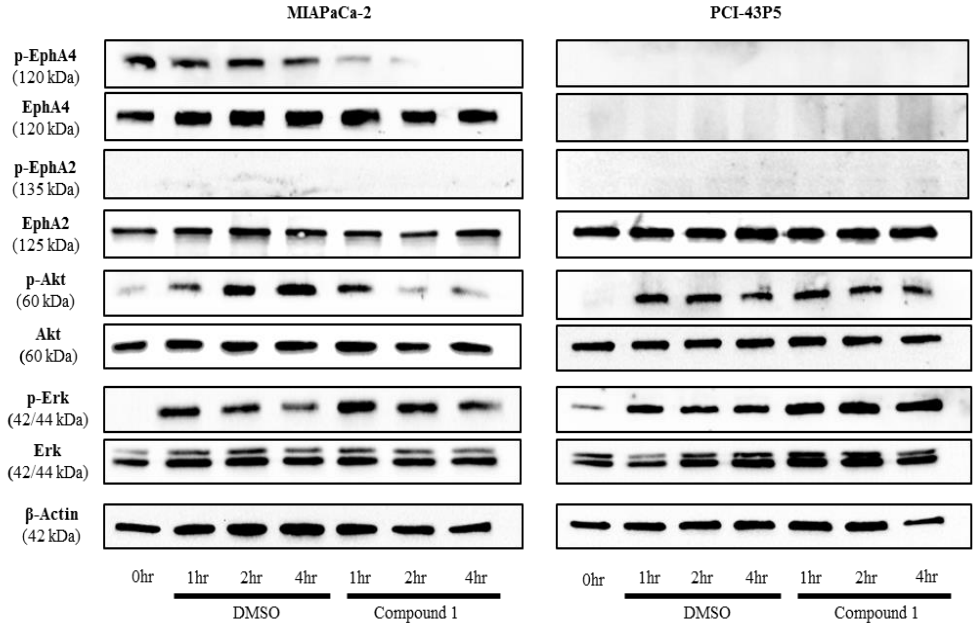


図７　Compound 1 投与下における Signaling pathway の解析

MIAPaCa-2 においては compound 1 投与下において、EphA4 および Akt のリン酸化の抑制が見られた。PCI-43P5 においては、Erk/Akt のいずれにおいてもリン酸化への影響は見られなかった。EphA2 に関してはどちらの細胞株においてもリン酸化は見られなかった。

次に、Akt 経路は癌細胞のアポトーシス抑制に寄与していることが知られていることから、本実験においても compound 1 投与下での EphA4 陽性膵癌細胞

株のアポトーシスの有無について解析することとした。EphA4 陽性膵癌細胞株 MIAPaCa-2 においては、compound 1（400μM）投与下で、その細胞形態に変化が見られた。同様の変化は EphA4 陰性膵癌細胞株 PCI-43P5 では見られなかった（図 8A)。アポトーシスの検出には、まずアポトーシスが起こる際に活性化される cleaved caspase-3 の発現の有無を蛍光免疫染色で確認することとした。その結果、EphA4 陽性膵癌細胞株 MIAPaCa-2 は compound 1 投与下において cleaved caspase-3 の発現を認めた（図 8B)。

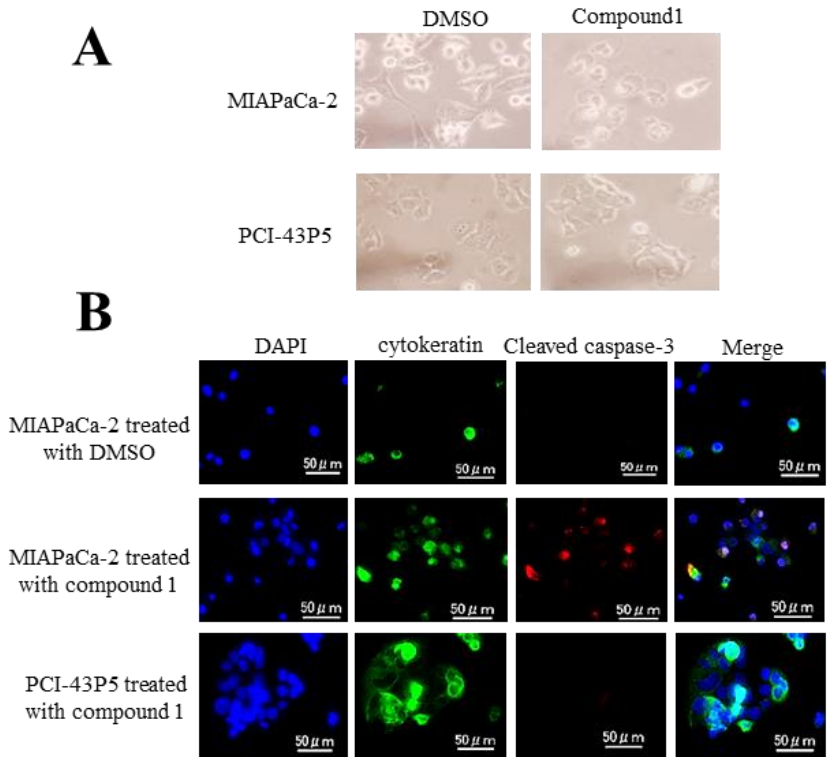


図 8　compound 1 投与下における膵癌細胞株の形態変化および cleaved caspase-3 発現の有無

A) MIAPaCa-2 と PCI-43P5 の compound 1(400μM)との 2 時間共培養後の細胞形態。MIAPaCa-2 では一部細胞形態に変化が見られた。

B) 蛍光免疫染色写真。細胞核を DAPI(青)、細胞質を cytokeratin(緑)で染色。Cleaved caspase-3 は赤で染色した。MIAPaCa-2 と compound 1(400μM)の共培養下でのみ cleaved caspase-3 の染色が見られた。Scale bar: 50μm

また、アポトーシスを起こしている細胞の割合を検出する目的でフローサイトメトリーを施行した。フローサイトメトリーでは、Annexin V と PI による染色を行い、Annexin V 染色が陽性で PI 染色が陰性である細胞集団を早期アポトー

シス群としてカウントした。Compound 1（400μM）投与下において、EphA4 陽性膵癌細胞株 MIAPaCa-2 では Annexin V 陽性細胞数の増加を認め、早期アポトーシス細胞の割合は 30%程度と、コントロール群と比較し有意に増加を認めた（図 9A, 9B）。一方で、EphA4 陰性膵癌細胞株 PCI-43P5 ではコントロール群と比較し、アポトーシス細胞の増加を認めず、早期アポトーシス細胞の割合も数パーセントであった（図 9C, 9D）。

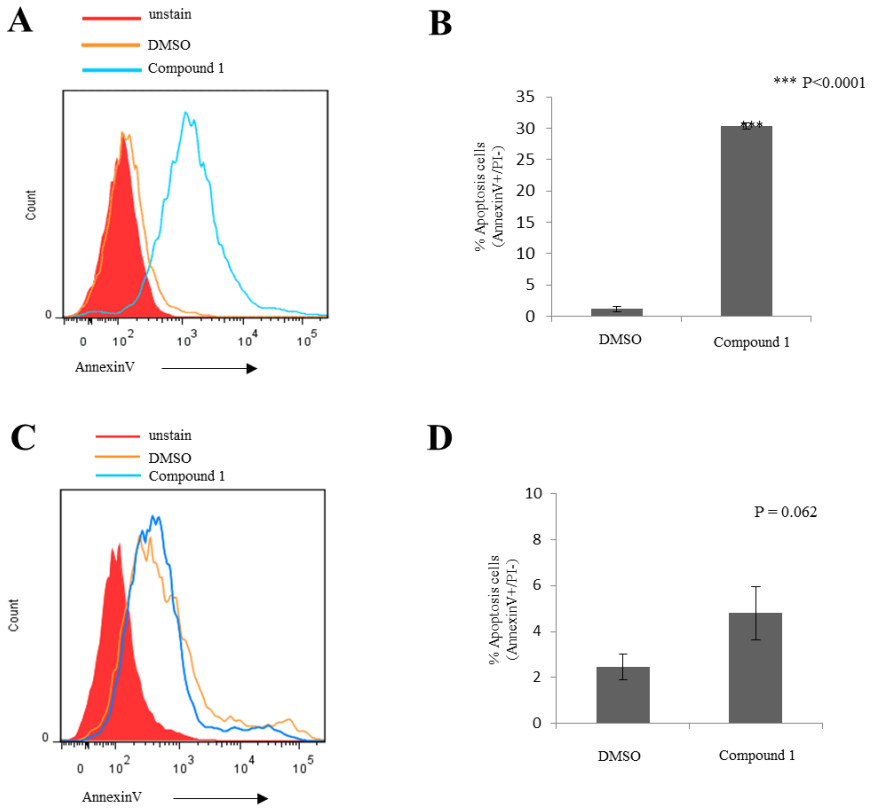


図 9　フローサイトメトリーによるアポトーシスの検出

A）MIAPaCa-2 細胞と compound 1（400μM）の 2 時間共培養後の Annexin V, PI 染色によるフローサイトメトリー。ヒストグラム（赤）：非染色，ライン（橙）：コントロール，ライン（緑）：Compound 1 投与下。MIAPaCa-2 では compound 1 投与下において Annexin V 陽性細胞の増加が見られた。

B）早期アポトーシス細胞（Annexin V 陽性、PI 陰性）の割合。MIAPaCa-2 では compound 1 投与下で有意に早期アポトーシス細胞が増加していた（P<0.0001）。

C）PCI-43P5 細胞と compound 1（400μM）の 2 時間共培養後の Annexin V, PI 染色によるフローサイトメトリー。ヒストグラム（赤）：非染色，ライン（橙）：コントロール，ライン（緑）：Compound 1 投与下。PCI-43P5 では compound 1 投与下で Annexin V 陽性細胞の増加は見られなかった。

D）早期アポトーシス細胞（Annexin V 陽性、PI 陰性）の割合。PCI-43P5 では compound 1 投与下においても早期アポトーシス細胞の割合に有意差を認めなかった（P=0.062）。

以上の結果から、compound 1 投与により EphA4 陽性膵癌細胞においては EphA4 のリン酸化および Akt のリン酸化が抑制されることで、膵癌細胞のアポトーシスが誘導されていることが示された。また EphA4 陰性膵癌細胞株では compound 1 投与で同様の反応は見られなかった。

４）compound 1 は EphA4 と ligand（ephrin A4）の結合を阻害する

Noberini ら[16]によると、EphA4/EphA2 阻害剤である compound 1 はレセプターである EphA4 および EphA2 とリガンドとの結合を阻害すると報告されている。本研究では上記のように compound 1 投与によって EphA4 のリン酸化が抑制されることが明らかになった。ここでは、EphA4 のリン酸化の抑制がリガンドとの結合に関与するかを検証することとした。この実験では、EphA4 陽性膵癌細胞株 MIAPaCa-2 のみを用いて、EphA4 のリガンドである ephrin-A4 または compound 1 を投与し、前述の条件下で培養下細胞からタンパクを抽出してウエスタンブロット法を用いて検証を行った。図 10 に示すようにリガンド投与下において EphA4 のリン酸化および Akt のリン酸化の亢進が見られるが、リガンドと compound 1 を共に投与した場合には EphA4 および Akt のリン酸化が共に抑制される結果となった。

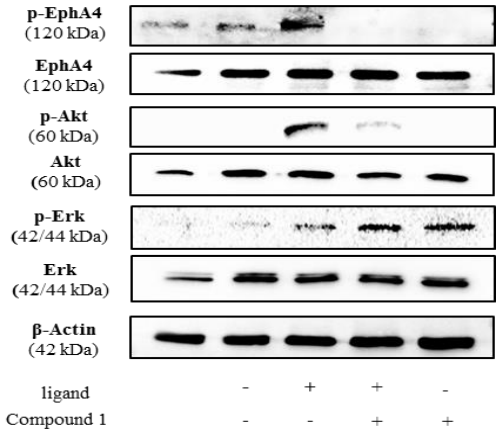


図 10　リガンドおよび compound 1 投与下での signaling pathway の解析

MIAPaCa-2 細胞においては、リガンド投与下で EphA4 および Akt のリン酸化が見られた。リガンドに加えて compound 1 も投与した場合には、リガンド単独での投与に比べ EphA4 および Akt のリン酸化の抑制が認められた。Erk リン酸化については compound 1 投与下において軽度亢進が認められるのみであった。

この結果から、EphA4 はリガンドである ephrin-A4 と結合することでリン酸化され、EphA4 阻害剤である compound 1 は EphA4 とそのリガンドである ephrin-A4 の結合を阻害することで EphA4 および Akt のリン酸化抑制に関与していることが示唆された。

５）compound 1 の腹腔内投与は膵癌同所移植マウスモデルにおいて腫瘍細胞の増殖を抑制する効果を有する

In vivo での治療実験を行うのに先立って、使用するルシフェラーゼを導入した膵癌細胞株 MIAPaCa-2 のルシフェラーゼ発現を確認した。24-well プレートを用いて MIAPaCa-2 細胞を $1\times10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ 個で各々培養し、ルシフェリンを投与し、in vivo 実験で用いる IVIS を用いて発光を確認した。図 11 に示すようにルシフェラーゼを導入した膵癌細胞 MIAPaCa-2 の発光が確認でき、その発光強度は培養細胞数に比例していた。

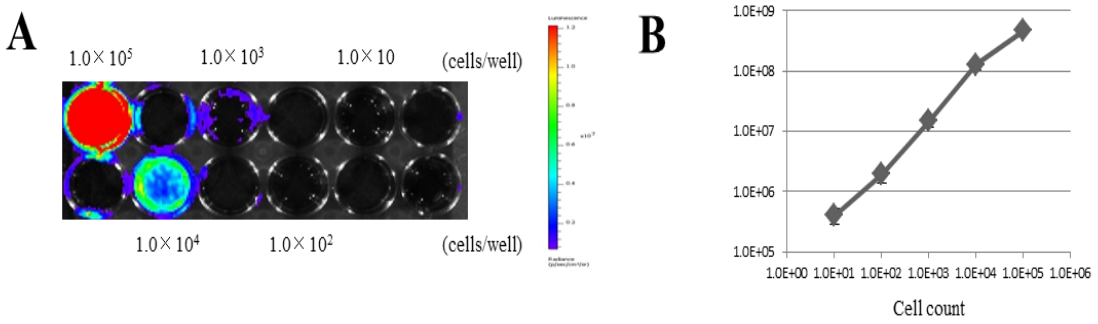


図 11　膵癌細胞株 MIAPaCa-2 のルシフェラーゼ発現確認

A) 24-well プレート上での MIAPaCa-2 細胞の発光確認。

B) 発光強度は培養細胞数に比例していた。

以上から、膵癌細胞株 MIAPaCa-2 へのルシフェラーゼの導入は確認できた。また、その発光強度が細胞数に比例することから、今後のマウスでの治療実験に使用するのに適切であると判断した。

In vivo 実験では、前述のように膵癌同所移植マウスモデルを作成し、compound 1（50mg/kg）または 1% DMSO を週 5 回、腹腔内投与する 2 群での比較を行った。マウスのうち、膵癌細胞株 MIAPaCa-2 移植後 1 週間で腫瘍の生着が確認された個体にのみ前述のスケジュールに沿った治療を行い、各群 6 匹ずつでの比較検討を行った。その結果、Compound 1 治療群においては、IVIS により検出された腫瘍細胞の信号強度が腫瘍生着時点（腫瘍細胞移植後 1 週間）

の値を 1 とした場合の相対値においてコントロール群に比して有意に低値を示した。また、4 週間の治療後（腫瘍細胞移植から 5 週間後）に摘出した腫瘍の重量の比較でも compound 1 治療群では有意に低値を示し、compound 1 の腹腔内投与は膵癌同所移植マウスモデルにおいて、治療効果（膵癌細胞増殖抑制効果）を有することが示唆された（図 12）。

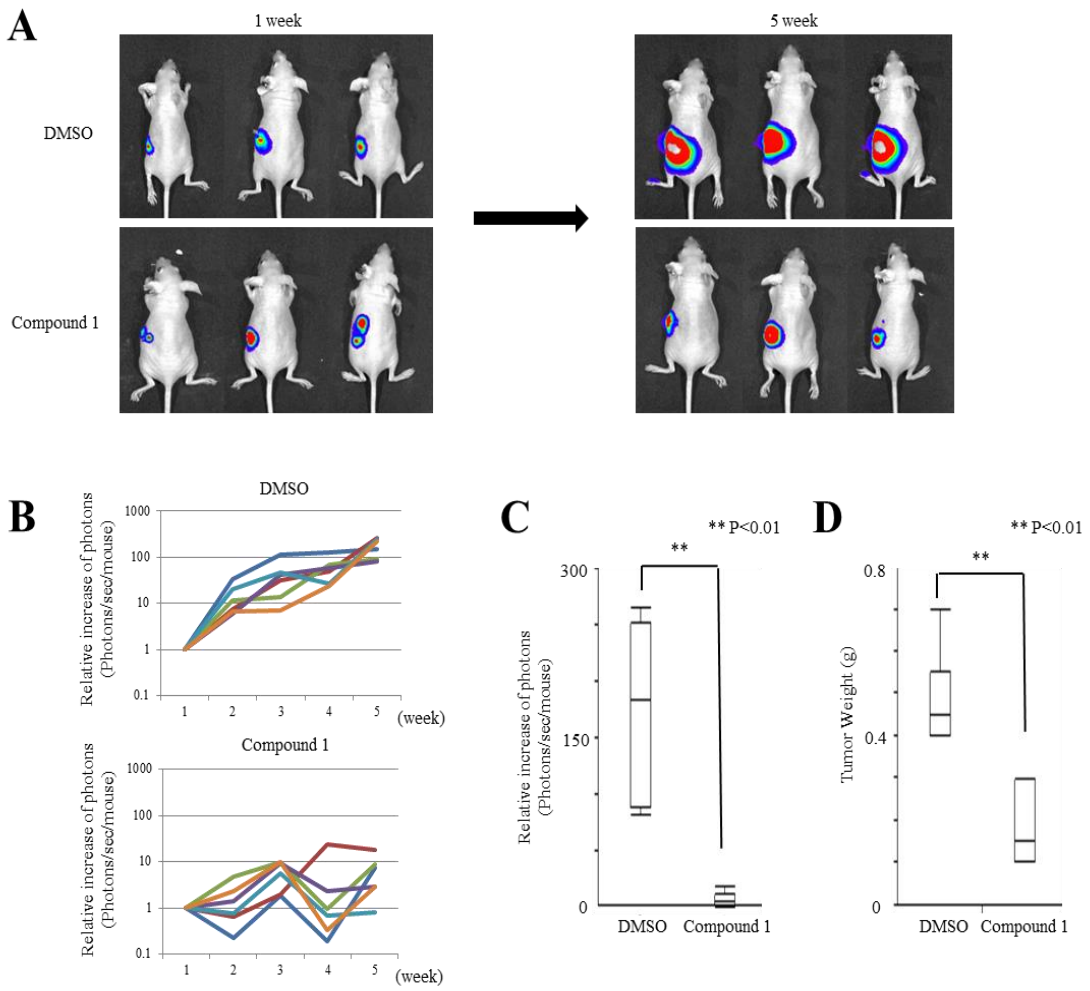


図 12　同所移植膵癌モデルマウスでの治療実験

A）膵癌細胞株 MIAPaCa-2 移植後 1 週間での IVIS による腫瘍生着確認写真および 4 週間の治療後の IVIS による腫瘍増殖確認写真。各群 6 例中代表的 3 例ずつの写真を提示。

B）腫瘍細胞移植後 1 週間での IVIS での信号強度を 1 とし、4 週間の治療後（腫瘍細胞移植後 5 週間）までの信号強度の相対値の推移。

C）上記での最終評価時点での信号強度の相対値の比較。Compound1 群で有意に信号強度が小さく（P<0.01）、腫瘍増殖が抑制されていた。

D）腫瘍摘出後の腫瘍重量の比較。重量においても、compound 1 群で有意に重量が小さく

(P<0.01)、腫瘍増殖抑制効果を示した。

６）compound 1 の腹腔内投与により増殖の抑制された腫瘍においては *in vitro* の結果同様に Akt のリン酸化抑制およびアポトーシスが誘導されている

In vivo での 4 週間の治療終了後（腫瘍細胞移植から 5 週間後）に、各マウスを安楽死させて腫瘍を摘出し、重量を測定後 *in vivo* での腫瘍において *in vitro* で示された Akt のリン酸化抑制およびアポトーシスの誘導が見られるかの評価を免疫組織化学染色にて行った。摘出腫瘍をホルマリン固定後に薄切切片を作成し、前述の方法および抗体を使用し行った。アポトーシスの評価には前述の Apoptosis *in situ* Detection Kit *Wako* (WAKO)を使用し、腫瘍細胞増殖マーカーとして Ki-67 を使用した。結果は、摘出腫瘍組織において compound 1 群の腫瘍では p-Akt の染色がコントロール群に比べ弱く、アポトーシスを検出する TUNEL 染色細胞が多く見られた（P<0.01)。腫瘍細胞増殖を反映する Ki-67 染色では両群に差を認めなかった。このことから、*in vivo* においても *in vitro* の結果と同様に、compound 1 投与によって腫瘍細胞の Akt リン酸化が抑制され、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。腫瘍細胞の増殖能に差が見られないことからも、*in vivo* 実験において腫瘍細胞増殖に差が見られたのはアポトーシス誘導の結果であることが推察された（図 13)。

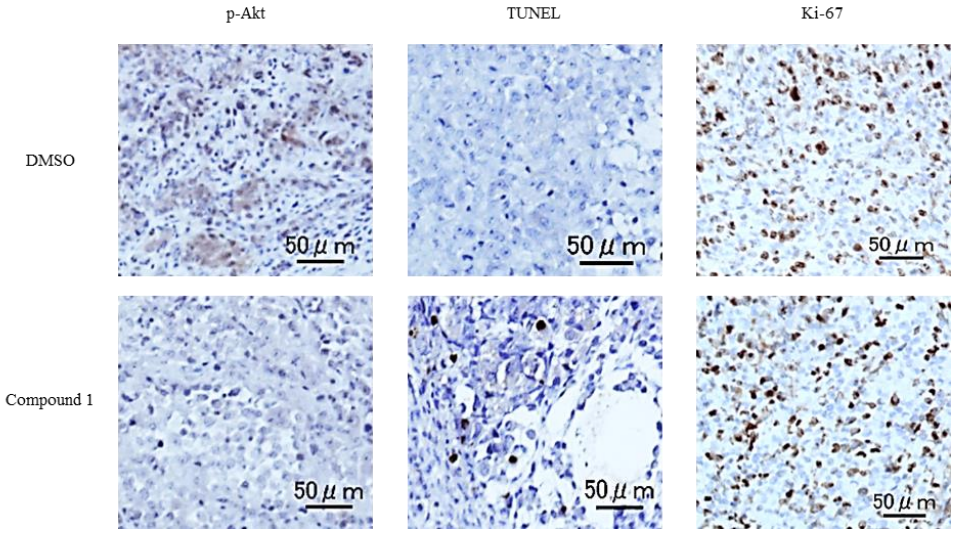


図 13　摘出腫瘍における免疫組織化学染色

Compound 1 群、コントロール群ともに代表的な 1 症例の写真を提示。P-Akt 染色では、コントロール群において compound 1 群と比べ、染色が強く見られた。アポトーシス検出の TUNEL 染色では、compound 1 群でコントロール群に比べ染色細胞が多く見られた。細胞増殖を示す Ki-67 染色では、両群に明らかな染色細胞数の差を認めなかった。Scale bar: 50μm

７）compound 1 の腹腔内投与においては生命維持に必要な他臓器への傷害作用などの副作用を認めない

In vivo での治療実験後に compound 1 の腹腔内投与による副作用の有無についても検討を行った。方法は、治療終了後に安楽死させたマウスより生命維持に重要な臓器を摘出し、免疫組織化学染色にて各群での臓器構造の変化を確認した。さらに、治療前後のマウス体重を測定し、体重減少の有無を比較した。摘出した主要臓器（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓）のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色では、両群において明らかな組織学的異常は認められなかった。なお、この組織像については北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座西原広史先生にご指導いただき評価を行った。また、マウス体重に関しては、両群で治療後に体重低下などの兆候はなく、治療前後の体重変化についても両群で有意差は認めなかった（図 14）。

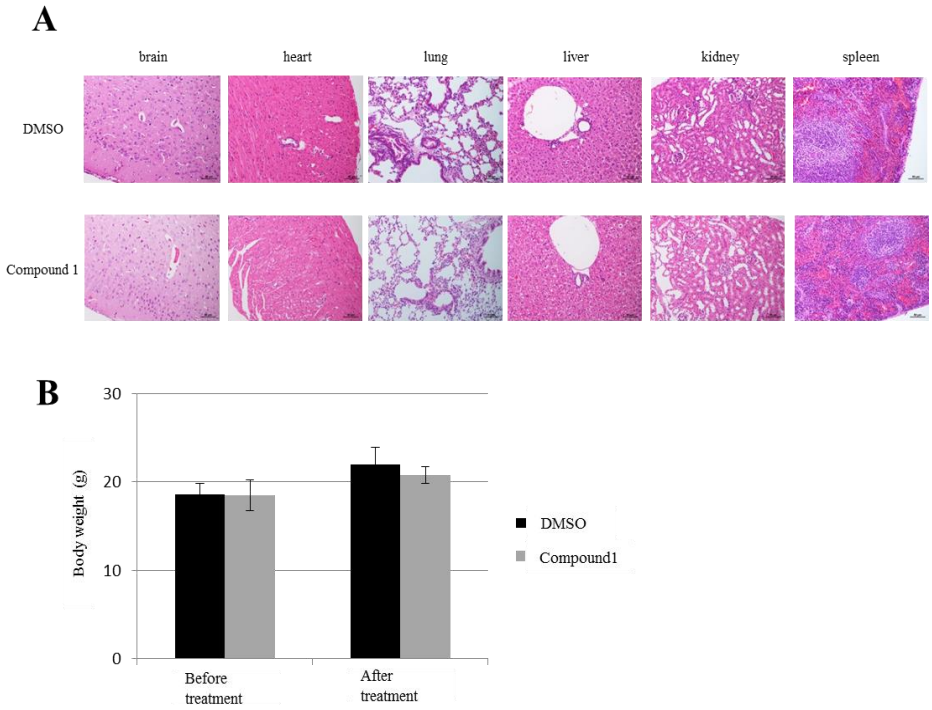


図 14　Compound 1 腹腔内投与による副作用の有無についての検討

A）摘出した臓器（脳、心、肺、肝、腎、脾）のＨＥ染色。各群代表的写真を提示。各群で明らかな組織学的違いは認めなかった。Scale bar: 50μm

B）治療前後でのマウスの体重変化。各群で有意差は認めなかった。

以上の結果より、compound 1の腹腔内投与は同所移植膵癌モデルマウスにおいて、明らかな副作用は確認できず、安全に使用可能であった。

考察

本研究では、まずEphA4の発現が膵癌患者の生存率と相関があり、さらには膵癌患者の独立した予後規定因子であることを示した。多くの既存の報告では、腫瘍径やリンパ節転移の有無、腫瘍マーカー（CA19-9）の値などと膵癌患者の予後との相関があるとされてきた[24,25]。これらの報告の中でも、リンパ節転移の有無が最も強い相関を示すとされており[26]、本研究でもリンパ節転移の有無が最も強い相関を示した。この結果は、既存の報告に矛盾しない結果であり、本研究で使用したTMAの症例数および臨床データが正確であったことを支持する結果となった。また、EphA4の発現は、他の癌種（胃癌、乳癌）では予後と相関するとの報告が見られるものの[15,16]、膵癌では過去に報告されていない。膵癌では、K-ras遺伝子やp53遺伝子のように、遺伝子変異とその発生の関連が報告されている[27,28]。EphA4に関しても、その発現上昇に遺伝子変異が関連しているかを確認するために、データベース（COSMIC）による検討を行った。結果としてはEphA4の変異は膵癌患者251例のうち2例にしか認めず、膵癌においてはEphA4の変異の関与は薄いものと考えられた。本研究での解析結果では、84例の検討ではあるが、EphA4の発現が膵癌患者の予後と相関を示しており、同時に検討したEphA2の発現は相関を示さなかった。このことから、EphA4が膵癌患者において有用な予後予測バイオマーカーとなる可能性を示した初めての報告である。また、変異の関与が少なく、治療効果を期待できる対象患者も多いことが期待でき、新規の治療ターゲットとしてより有望な遺伝子であることも同時に示唆された。

膵癌治療に関しては、膵癌は化学療法もしくは放射線療法に抵抗性の症例が多く、膵癌患者の予後改善のためには新たな治療戦略の探索が必要となっている。共著者の中村らによってEphA4遺伝子が膵癌で高発現しており、膵癌の増殖に関与しているとの報告[9,10]がなされて以来、EphA4が膵癌の新規治療ターゲットとなる可能性について着目してきた。2008年にNoberiniら[18]によって、EphA4とEphA2を選択的に阻害できる低分子化合物（compound 1）が報告され、ALSの治療への応用が試みられていることから、この化合物が膵癌に対しても新規治療薬になり得る可能性があると考えた。治療実験では、まず*in vitro*の実験から行い、compound 1はEphA4陽性の膵癌細胞株に対してのみ細胞増殖抑制作用を示し、EphA2のみ陽性の膵癌細胞株に対しては細胞増殖抑制作用を示さなかった。EphA2については、他の癌種において予後との相関が報告され、治療ターゲットとしても有用であるとの報告も見られる[29,30]。確かに本研究での検討でも、EphA4に比べEphA2の方が膵癌細胞の中では広く発現を有している結果であったが、compound 1による治療効果は乏しく、膵癌に関し

て EphA2 はその増殖への関与が小さいものと推測された。

次に、compound 1 の膵癌細胞増殖抑制作用の機序に関する検証実験を行った。本研究では、膵癌細胞株において、ligand の投与の有無に関わらず EphA4 のリン酸化を確認することができた。膵癌細胞において、ligand の投与に関わらず EphA4 のリン酸化が起こるメカニズムは明らかでないが、膵癌細胞そのものが ligand を有し、リン酸化を誘導している可能性などが考えられる。さらに下流のシグナル経路としては、過去の報告で膵癌において Erk/Akt 経路がその増殖に関わっているという報告[31]が多い点と、Eph receptor/ligand がそれらの経路に関与しているという報告[32]がされていることから、Erk/Akt 経路に着目し検証することとした。結果としては、compound 1 投与により Akt のリン酸化が抑制され、Erk のリン酸化がわずかに亢進することが確認できた。Erk/Akt 経路はともに Ras により調整されている経路である[33]が、Akt 経路は Ras に非依存的にも活性化され得るとされており、Erk 経路と Akt 経路の間にも相互作用があるとされる。Rommel ら[34]は Akt のリン酸化は Erk 経路の活性を阻害すると報告しており、Menges ら[35]は Erk のリン酸化は Akt 経路の活性にネガティブフィードバックをかけると報告している。本研究での結果においても、compound 1 による効果は Akt 経路を抑制し、Erk 経路をわずかに活性化させており、これらの既存の報告に合致した結果と言える。また、EphA4 の ligand 投与下においても compound 1 投与により EphA4 および Akt のリン酸化の抑制が確認できたことから、compound 1 の EphA4 シグナル経路への抑制効果は ligand との結合阻害作用を含むことが示唆される。さらに本研究の結果からは、EphA4 は Akt 経路の抑制を介して膵癌細胞の細胞死を誘導していることが示唆された。Akt 経路については細胞死を含めた様々な細胞機能を調節しているとされている[36]。

Datta ら[37]は Bad という Akt の標的遺伝子があり、Bad が脱リン酸化することにより Bcl-XL または Bcl-2 とヘテロダイマーを形成し、細胞死の抑制を阻害すると報告している。さらに、それらが Bcl-2 ファミリーの不均衡を引き起こし cytochrome C を放出する。結果として caspase-3 を含む caspase カスケードが刺激され、初期の細胞死に関与する PARP の分裂を誘導している[38]。本研究では compound 1 投与により膵癌細胞において Akt のリン酸化が抑制され、cleaved caspase-3 の発現が誘導されていることが確認できた。これらの結果から、compound 1 は EphA4 陽性膵癌細胞において EphA4 のリン酸化を抑制し、さらには Akt 経路の活性を抑制することで、膵癌細胞の細胞死を誘導し増殖抑制効果を示していることが示唆された。

In vitro での実験結果を踏まえ、*in vivo* でも compound 1 による治療実験を計画した。*In vivo* 実験においては、より生体に近い状態での治療効果を計

るため、マウスの膵被膜下に膵癌細胞を移植する同所移植モデルマウスを作成し行うこととした。また、薬物の投薬ルートとしては、まず腹腔内投与を選択し行うこととした。治療効果判定には経時的な腫瘍増大のモニタリングができる点から IVIS を用いて行うこととした。結果としては、compound 1 の週 5 回投与の 4 週投与によって腫瘍の増殖抑制効果を示すことができた。さらに治療後に摘出した腫瘍の組織学的解析を行うと、*in vitro* の実験結果と同様に、膵癌腫瘍において compound 1 治療群では Akt のリン酸化の抑制および細胞死の誘導が確認できた。同時に腫瘍の増殖能の評価のため、細胞分裂に関わる腫瘍の増殖能マーカーとされる Ki-67 による染色も行ったが、この比率には compound 1 治療群とコントロール群で差は見られなかった。以上の結果から、*in vivo* においても再現性をもって compound 1 による膵癌増殖抑制効果はみられ、その機序としては *in vitro* 同様に Akt のリン酸化抑制からの細胞死誘導であることが示唆された。加えて行った副作用の評価では、治療前後でのマウスの体重変動において両群間での差は見られず、治療終了後に摘出した主要臓器での組織学的評価においても compound 1 治療群で組織学的な異常所見は見られなかった。以上のことから、compound 1 は膵癌治療に有用である可能性があり、さらには副作用の面でも安全に使用できる可能性があることが示唆された。

本研究では、EphA4 の発現の有無が膵癌患者の予後を予測する独立した指標となること、また EphA4 を選択的に阻害できる低分子化合物(compound 1)が膵癌細胞の増殖抑制に有効であることを明らかにした。これらの結果は、予後不良な膵癌患者の予後予測にとどまらず、その予後改善のための新たな治療戦略の一部となり得る可能性を秘めており、臨床応用へ向けたさらなる検討が必要と考えられた。

総括および結論

本研究により以下のような新知見が得られた。

（１）EphA4 は膵癌患者の約半数に発現が見られ、その発現は膵癌患者の予後を予測する独立した因子である。

（２）EphA4 および EphA2 の選択的阻害作用を有する低分子化合物（compound 1）は、*in vitro* および *in vivo* のレベルにおいて膵癌細胞に対して増殖抑制作用を有する。

（３）Compound 1 の細胞増殖抑制作用は、EphA4 のリン酸化抑制を介して Akt 経路の活性を抑制し、細胞死を誘導することで引き起こされている。

これらの知見は、現在の手術療法と化学療法を含めた集学的治療をもってして予後不良である膵癌患者にとって、その予後を改善できる可能性をもった新規治療対象遺伝子であり、新規治療薬の発見・開発に寄与する可能性を示すものである。今後、さらなる症例の蓄積とその解析や、動物実験を経ての臨床研究へ向け、検討を重ねる必要があると考えられる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝致します。研究全般にわたり、有意義な御指導御鞭撻いただきました北海道大学大学院消化器外科学分野Ⅱ 土川 貴裕 講師、中村 透 助教に深く感謝致します。動物実験にあたりご指導ご鞭撻頂きました北海道大学大学院医学研究科生化学講座分子生物学分野 橋本 茂 特任准教授に深く感謝致します。実験において組織学的評価につきご指導ご協力頂きました北海道大学大学院医学研究科病理学講座腫瘍病理学分野 西原 広史 特任教授に深く感謝致します。また、本研究を遂行するにあたり、御協力いただいた北海道大学大学院消化器外科学分野Ⅱの皆様に心より感謝致します。

引用文献

1. Siegel, R. *et al.* Cancer statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin. 64*, 9-29 (2014).

2. Warshaw, A. L. & Fernandez-del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 326, 455-465 (1992).

3. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 364, 1817-1825 (2011).

4. Sho, M. *et al.* Pathological and clinical impact of neoadjuvant chemoradiotherapy using full-dose gemcitabine and concurrent radiation for resectable pancreatic cancer. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 20, 197-205 (2013).

5. Von,H,D.D. *et al.* Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N. Engl. J. Med. 369, 1691-1703 (2013).*

6. Mehnel, C. *et al.* Tumor cell expression of MMP3 as a prognostic factor for poor survival in pancreatic, pulmonary, and mammary carcinoma. *Genes Cancer* 6, 480-489 (2015)

7. Jiang, S.H. *et al.* Overexpressed EDIL3 predicts poor prognosis and promotes anchorage-independent tumor growth in human pancreatic cancer. *Oncotarget* 7, 4226-4240 (2016)

8. Saito-Hisaminato, A. *et al.* Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray. *DNA Res.* 9, 35-45 (2002).

9. Nakamura, T. *et al.* Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene* 23, 2385-2400 (2004).

10. Iiizumi, M. *et al.* EphA4 receptor, overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma, promotes cancer cell growth. *Cancer Sci.* 97, 1211-1216 (2006).

11. Hirai, H. *et al.* A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238, 1717-1720 (1987).

12. Gale, N.W. *et al.* Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17, 9-19 (1996).

13. Surawska, H., Ma, P.C. & Salgia, R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 419-433 (2004).

14. Pasquale, E.B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10, 165-180 (2010).

15. Brantley-Sieders, D.M. *et al.* Eph/ephrin profiling in human breast cancer reveals significant associations between expression level and clinical outcome. *PLoS One* 6, e24426 (2011).

16. Miyazaki, K. *et al.* EphA4 is a prognostic factor in gastric cancer. *BMC Clin. Pathol.* 13, 19 (2013).

17. Saintigny, P. *et al.* Global evaluation of Eph receptors and ephrins in lung adenocarcinomas identifies EphA4 as an inhibitor of cell migration and invasion. *Mol. Cancer Ther.* 11, 2021-2032 (2012).

18. Noberini, R. *et al.* Small molecules can selectively inhibit ephrin binding to the EphA4 and EphA2 receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 29461-29472 (2008).

19. Petty, A. *et al.* A small molecule agonist of EphA2 receptor tyrosine kinase inhibits tumor cell migration in vitro and prostate cancer metastasis in vivo. *PLoS One* 7, e42120 (2012).

20. Lamberto, I. *et al.* Distinctive binding of three antagonistic peptides to the ephrin-binding pocket of the EphA4 receptor. *Biochem. J.* 445, 47-56 (2012).

21. Van, H. A. *et al.* EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. *Nat. Med.* 18, 1418-1422 (2012).

22. Tanaka, K. *et al.* Down-regulation of Human Leukocyte Antigen class I heavy chain in tumors is associated with a poor prognosis in advanced esophageal cancer patients. *Int. J. Oncol.* 40, 965-974 (2012).

23. Sobin, L.H., Gospodarowicz MK., Wittekind Ch. & editors. TNM Classification of Malignant Tumors, 7th edn. *Wiley-Blackwell*: Oxford, 2009, pp122-128

24. Wentz, S.C. *et al.* Lymph node ratio and preoperative CA 19-9 levels predict overall survival and recurrence-free survival in patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *World J. Gastrointest. Oncol.* 4, 207-215 (2012).

25. Weber, C.E. *et al.* Clinical and pathologic features influencing survival in patients undergoing pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *J. Gastrointest. Surg.* 18, 340-347 (2014).

26. Riediger, H. *et al.* The lymph node ratio is the strongest prognostic factor after resection of pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Surg.* 13, 1337-1344 (2009).

27. Smit, V.T.H.B.M.K. *et al.* K-ras codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res.* 16, 7773-7782 (1988).

28. Aldo, S. *et al.* Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am. J. Path.* 142, 1534-1543 (1993).

29. Lee, J.W. *et al.* EphA2 targeted chemotherapy using an antibody drug conjugate in endometrial carcinoma. *Clin. Cancer Res. 16,* 2562-2570 (2010).

30. Chen, X. *et al.* miR-141 is a key regulator of renal cell carcinoma proliferation and metastasis by controlling EphA2 expression. *Clin. Cancer Res.* 20, 2617-2630 (2014).

31. Perugini, R.A. *et al.* Pancreatic cancer cell proliferation is phosphatidylinositol 3-kinase dependent. *J. Surg. Res.* 90, 39-44 (2000).

32. Shu, Y. *et al.* The Ephrin-A5/EphA4 Interaction Modulates Neurogenesis and Angiogenesis by the p-Akt and p-ERK Pathways in a Mouse Model of TLE. *Mol. Neurobiol.* 2014.

33. Warne, P.H., Viciana PR. & Downward J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364, 352-355 (1993).

34. Rommel, C. *et al.* Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286, 1738-1741 (1999).

35. Menges, C.W. & McCance, D.J. Constitutive activation of the Raf-MAPK pathway causes negative feedback inhibition of Ras-PI3K-AKT and cellular arrest through the EphA2 receptor. *Oncogene* 27, 2934-2940 (2008).

36. Datta S.R., Brunet, A. & Greenberg, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905-2927 (1999).

37. Datta. S.R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241 (1997).

38. Fabregat, I. *et al.* Epidermal growth factor impairs the cytochrome C/caspase-3 apoptotic pathway induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes via a phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway. *Hepatology* 32, 528-535 (2000).