HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	通常型膵癌の浸潤、転移メカニズムに関する分子生物学的研究
Author(s)	古川, 聖太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14320号
Issue Date	2020-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14320
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80220
Type	doctoral thesis
File Information	Shotaro_Furukawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

通常型膵癌の浸潤、転移メカニズムに関する分子生物学的研究

(The molecular biological studies on the mechanisms of invasion and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma)

２０２０年１２月

北 海 道 大 学

古 川　聖 太 郎

学 位 論 文

通常型膵癌の浸潤、転移メカニズムに関する分子生物学的研究

(The molecular biological studies on the mechanisms of invasion and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma)

２０２０年１２月

北 海 道 大 学

古 川　聖 太 郎

目次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・・・　１頁

要旨　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　３頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　６頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　７頁

実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　１２頁

実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２３頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４３頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４７頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４８頁

利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４９頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５０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。

Shigeru Hashimoto[1], **Shotaro Furukawa**[1], Ari Hashimoto[1], Akio Tsutaho, Akira Fukao, Yurika Sakamura, Gyanu Parajuli, Yasuhito Onodera, Yutaro Otsuka, Haruka Handa, Tsukasa Oikawa, Soichiro Hata, Yoshihiro Nishikawa, Yusuke Mizukami, Yuzo Kodama, Masaaki Murakami, Toshinobu Fujiwara, Satoshi Hirano and Hisataka Sabe.

[1]Shigeru Hashimoto, Shotaro Furukawa and Ari Hashimoto contributed equally to this work.

ARF6 and AMAP1 are major targets of KRAS and TP53 mutations to promote invasion, PD-L1 dynamics, and immune evasion of pancreatic cancer.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019 Aug 27;116(35):17450-17459.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. **古川　聖太郎**、橋本　あり、橋本　茂、小野寺　康仁、及川　司、大塚　勇太郎、佐邊　壽孝、平野　聡.

膵癌細胞の浸潤・転移・化学療法抵抗性メカニズムの解明

第 116 回日本外科学会定期学術集会、平成 28 年 4 月 14～16 日、大阪

2. **Shotaro Furukawa**, Ari Hashimoto, Shigeru Hashimoto, Yasuhito Onodera, Tsukasa Oikawa, Yutaro Otsuka, Hisataka Sabe and Satoshi Hirano.

AMAP1-EPB41L5 Axis Activated under Arf6 promotes Mesenchymal Malignancy and Chemo-Resistance of Pancreatic Cancer.

40th World Congress of the International College of Surgeons, October 23~26, 2016, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

要旨

【背景と目的】

通常型膵癌（Pancreatic ductal adenocarcinoma、以下、PDAC）は手術、化学療法、放射線療法が進歩した現在でも、5 年生存率が 10%に満たない難治癌である。PDAC の根治には適切なリンパ節郭清を伴った外科的切除が最低限必要である。しかし、初診断時、局所進行または遠隔転移の存在によりすでに根治切除不能である症例が 80%以上を占めることや、化学療法および放射線療法に対して抵抗性を有することが膵癌を難治たらしめる主な原因と考えられている。膵発癌メカニズムは、正常膵上皮細胞に様々な遺伝子異常が蓄積し、前癌病変の膵上皮内腫瘍性病変を経て、PDAC に至る多段階発癌仮説が有力と考えられている。この過程には、*KRAS* の恒常活性型変異および *TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* の機能喪失が重要であることがゲノム解析で明らかとなっている。このうち、*KRAS* 変異は 90〜95%、*TP53* 変異は 70%程度の PDAC 症例で認められ、*KRAS* 変異と *TP53* 変異は膵発癌の主要なドライバー変異であると考えられている。しかし、その変異の結果として PDAC の悪性度を増強する蛋白レベルのメカニズムについては不明な点が多い。

低分子量 G 蛋白質の ARF6 は様々な癌腫で過剰発現することが報告されている。癌細胞が増殖因子などの細胞外からの刺激を受け、受容体型チロシンキナーゼがリン酸化されると、GEP100 を代表とするグアニンヌクレオチド交換因子の仲介により ARF6 が活性化し、エフェクター分子の AMAP1 を支配下に入れる。AMAP1 はコルタクチン、パキシリン、プロテインキナーゼ D2 と結合することで、アクチンのリモデリングやインテグリンのリサイクリングを促進する。また、EPB41L5 と結合することで E-カドヘリンのエンドサイトーシスを促進するなど、細胞膜発現蛋白の細胞内動態を制御し、癌細胞の浸潤、転移、化学療法抵抗性を促進することが他の癌腫で報告されている。ARF6 の活性化にはメバロン酸経路（Mevalonate pathway、以下、MVP）の働きが必須であり、この経路により別の低分子量 G 蛋白質 RAB11b がゲラニルゲラニル化され、RAB11b が ARF6 を細胞表面へ輸送することで ARF6 機能が発揮される。MVP は *TP53* 変異により過剰に活性化されることが乳癌細胞で示されている。また、*TP53* 変異は PDGFRβ シグナリングを介して膵癌細胞の浸潤や転移を促進することが動物実験で示されている。

本研究では *TP53* 変異が PDAC の浸潤性、転移性、化学療法抵抗性を進展させるために、ARF6-AMAP1 経路を主要なターゲットとしていることを示す。

【材料と方法】

膵癌細胞の浸潤性、転移性、化学療法抵抗性を評価するため、ヒト膵癌細胞株である BxPC-3、Capan-2、SW1990、MIAPaCa-2、Panc-1、膵発癌モデルマウス（*Pdx1-Cre; LSL-KRAS*$^{G12D/+}$*; TP53*$^{R172H/+}$）から樹立した細胞株 KPC を使用した。浸潤性はマトリゲル浸潤アッセイで、転移性はマウス尾静脈に細胞株を注射することで形成される肺転移の程度で、化学療法抵抗性は培養した細胞株に Gemcitabine、5-Fluorouracil、Oxaliplatin、Irinotecan を添加した後の細胞増殖率の変化で評価した。また、Gemcitabine に MVP 阻害薬の Simvastatin を併用した際の細胞増殖率の変化も調べた。また、70 名の膵癌患者から得た切除標本における p53、PDGFRβ、GEP100、AMAP1、EPB41L5 発現と予後の関係を免疫組織学的に解析した。ARF6 活性化制御メカニズムおよび EPB41L5 蛋白発現と *TP53* 変異との関係を GGA-pulldown アッセイやウェスタンブロット法を用いて解析した。

【結果】

MIAPaCa-2、KPC では ARF6、AMAP1、EPB41L5 が高発現し、ARF6-AMAP1 経路が活性化されていることを確認した。ARF6-AMAP1 経路の抑制により MIAPaCa-2、KPC の浸潤活性が低下し、化学療法感受性が上昇した。また、KPC を使用した転移実験で肺転移が抑制された。免疫組織学的解析から ARF6-AMAP1 経路の高発現が膵癌切除後の予後規定因子であることが判明した。変異型 *TP53* をもつ MIAPaCa-2 で *siRAB11b*、*siGGT-II*、*shTP53* および Simvastatin 処理により、PDGF 刺激依存的な ARF6 活性化が抑制され、その結果、浸潤活性が低下した。一方、野生型 *TP53* をもつ Capan-2 では PDGF 刺激依存的な ARF6 活性化を認めなかった。また、Gemcitabine に Simvastatin を併用することにより化学療法感受性が有意に上昇した。*shTP53* により、転写因子 ZEB1 と EPB41L5 発現が、また、*shZEB1* により EPB41L5 発現が低下することがわかった。*ZEB1* はある種の miRNA により制御されることが他の癌腫では報告されているが、MIAPaCa-2 ではそのような miRNA を同定できなかった。

【考察】

PDAC 症例の 70%程度で認められる *TP53* 変異により ARF6 が活性化され、ARF6-AMAP1 経路が駆動し、膵癌細胞の浸潤性、転移性、化学療法抵抗性を促進することを示した。これには MVP や PDGFR シグナリングの活性化が重要な役割を果たしている。スタチン系薬剤による ARF6 活性化阻害により、PDAC の浸潤、転移、化学療法抵抗性が改善することが判明した。

【結論】

本研究により ARF6-AMAP1 経路が PDAC で高発現し、予後不良に直結することや ARF6-AMAP1 経路阻害により PDAC 治療を躍進させる可能性があることが判明した。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ANOVA	analysis of variance
DFS	disease free survival
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FBS	fetal bovine serum
GEF	guanine nucleotide exchanging factor
GGA	Golgi-localized, -ear-containing, Arf-binding protein
GGT-II	geranylgeranyl transferase type II
GST	glutathione S-transferase
Irr	irrelevant sequences
KPC	pancreatic cancer model mouse (*Pdx1-Cre; LSL-KRAS$^{G12D/+}$; TP53$^{R172H/+}$*)
miRNA	microRNA
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MVP	mevalonate pathway
OS	overall survival
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PDGF	platelet derived growth factor
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RTK	receptor thyrosine kinase
RT-PCR	reverse transcription - polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small-interfering RNA
TCGA	the cancer genome atlas

緒言

厚生労働省発表の人口動態統計によると、膵悪性腫瘍による年間死亡者数は年々増加傾向にあり、2018 年の統計では 35390 人であった。膵癌による死亡は全癌死の 9.4%程度を占め、肺癌、大腸癌、胃癌に次いで第 4 位である。また、罹患数は死亡数とほぼ同数であり、5 年生存率は 7〜8%程度で、膵癌は極めて予後不良の悪性腫瘍である (厚生労働省、2018)。その理由は、①ある程度進行するまで無症状のため、80〜85%の症例が初診断時すでに遠隔転移や局所進行のため根治切除不能であること（Donghui et al., 2004; Butturini et al., 2008; Vincent et al., 2011）、②根治切除できたとしても、診断時には癌細胞はすでに全身に播種している可能性が高く、多くの遺伝子変異が蓄積した段階での播種であるため、術後早期に高率で遠隔転移再発を来すこと（Yachida et al., 2010）、③化学療法・放射線療法の奏効率が低く、根治切除以外に有効な治療手段がないことなどが挙げられる。欧米諸国でも同様の傾向が認められ、全世界的に早期診断法・新術式・化学放射線療法レジメンの開発を目指し、研究が盛んに行われているが、未だ著明な成果が出ていない（Hidalgo, 2010; Siegel et al., 2017）。

上皮性膵腫瘍は外分泌腫瘍と内分泌腫瘍に大別される。外分泌腫瘍には、漿液性嚢胞腫瘍、粘液性嚢胞腫瘍、膵管内乳頭粘液性腫瘍、腺房細胞腫瘍、浸潤性膵管癌が含まれるが、このうち浸潤性膵管癌が 90%以上を占め、通常型膵癌（Pancreatic ductal adenocarcinoma、以下、PDAC）と呼ばれている（日本膵臓学会膵癌取り扱い規約検討委員会、2016）。PDAC は膵管上皮細胞が発生母地と考えられている悪性腫瘍で、その発癌過程として大腸癌における Adenoma-carcinoma sequence（Morson et al., 1972）のような遺伝子異常の蓄積と相関した多段階発癌仮説がコンセンサスを得ている（図 1）。すなわち、正常膵管上皮細胞に遺伝子異常が蓄積していくと、前癌病変と考えられている膵上皮内腫瘍性病変（Pancreatic intraepithelial neoplasia、以下、PanIN）が出現し、その異型度が段階的に高まり、浸潤癌に至ると考えられている（Marita et al., 2003; Bardeesy et al., 2006）。PanIN から PDAC に至る過程では主に *KRAS* の恒常活性型変異および癌抑制遺伝子 *CDKN2A*、*TP53*、*SMAD4* の機能喪失が重要な役割を果たすことが明らかになっている（Jones et al., 2008; Waddell et al., 2015; Makohon-Moore et al., 2016）。*KRAS* の恒常活性型変異が PanIN の早期から認められ、これに *CDKN2A*、*SMAD4*、*TP53* 異常・機能喪失が加わることで、PanIN が進行し、浸潤癌に至ると考えられている（Maitra et al., 2003）。*KRAS* の恒常活性型変異は 90%以上の症例で認められるが（Aguirre et al., 2003; Guerra et al., 2003; Hingorani et al., 2003; Bryant et al., 2014; Makohon-Moore et al., 2016）、これは PanIN を進行させるだけ

ではなく、代謝リプログラミングを促進することで癌細胞増殖に寄与したり（Ying et al., 2012）、間質との相互作用により癌細胞内のシグナリングを促進するなど（Tape et al., 2016）、癌の進行にも重要な役割を果たす。一方、*TP53* 変異は 70%程度の症例で認められる。通常、発癌過程において *KRAS* 変異よりも後に認められる異常で、それは機能獲得型変異であることが多く（Makohon-Moore et al., 2016）、PDGFRβ を介したシグナル経路を活性化し、膵癌細胞の浸潤・転移形質獲得を促進することが知られている（Weissmueller et al., 2014）。このような遺伝子レベルの異常が明らかになり、それにより引き起こされる細胞内の変化が示されつつあるが、実際に膵癌の悪性度を高める蛋白レベルのメカニズムの詳細は未だ不明な点が多い。

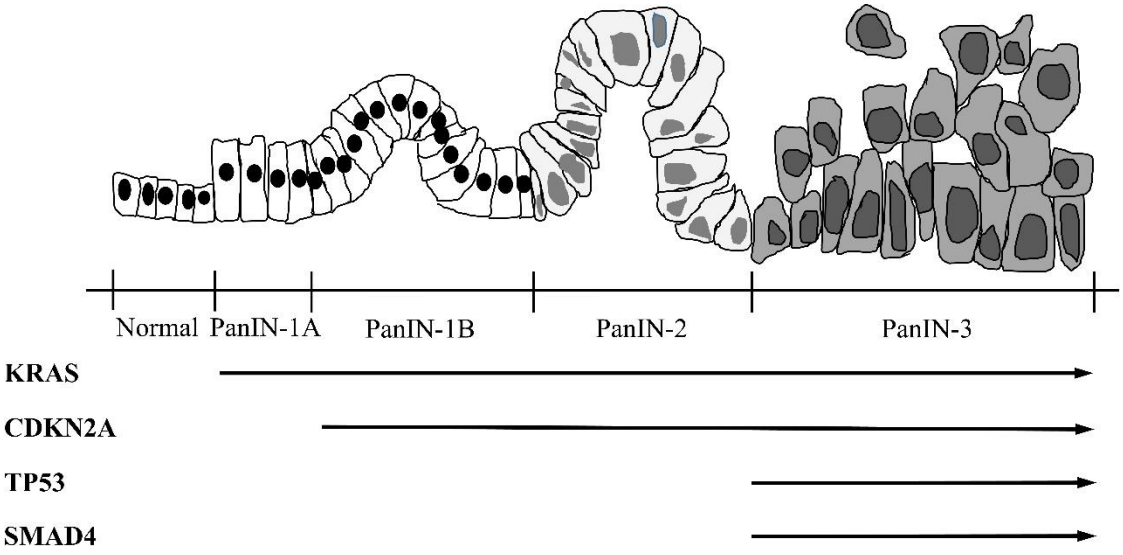


図 1　通常型膵癌の多段階発癌仮説の概念図

正常膵上皮細胞は前癌病変である PanIN（PanIN-1A～3）を経て、浸潤癌に至る。この過程では、PanIN-1A の段階で *KRAS* に点突然変異が起こる。PanIN-1B で *CDKN2A* の不活化が、PanIN-3 で *TP53* および *SMAD4* の不活化が発生する。上記のように段階的に遺伝子異常が発生し、その度に異型が増強し、浸潤癌に至ると考えられている。

膵癌の最大の脅威はその浸潤性・転移性・化学療法抵抗性にある。癌細胞は、E-カドヘリンの不活化とある種のインテグリンの活性化を特徴とする上皮間葉系転換（epithelial-mesenchymal transition、以下、EMT）により、浸潤性、転移性を獲得すると一般的に言われている（Nakajima et al., 2004; Hotz et al., 2007; Thierry et al., 2009）。SNAIL、SLUG、ZEB1、TWIST といった、EMT を制御するいくつかの因子が知られており（Pena et al., 2005; Uchikado et al., 2005）、これらの因子

の不活化により膵癌細胞の浸潤、転移が抑制され、化学療法抵抗性が改善することが in vitro で示された（Kajita et al., 2004）。また、E-カドヘリンを発現しない間葉系形質を示す膵癌細胞は、E-カドヘリンを発現する上皮系形質を有する膵癌細胞と比較して、化学療法抵抗性が高いことが報告されている（Arumugam et al., 2009）。さらに、*KRAS* の恒常活性型変異と *TP53* の機能獲得型変異を有する、現在世界的に動物実験で最も使用されている膵発癌モデルマウス *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*$^{G12D/+}$*; TP53*$^{R172H/+}$（以下、KPC）に *TWIST* または *SNAIL* ノックダウンを付加することにより、Gemcitabine に対する感受性が有意に上昇することが in vivo でも示された（Zheng et al., 2015）。このように、膵癌細胞は間葉系形質に転換することにより、浸潤転移形質および化学療法抵抗性を獲得することが示唆されている。このような中、Weissmueller らは PDGFRβ を介したシグナル経路が *TP53* 変異依存的に活性化され、膵癌細胞が浸潤性を獲得し、転移を促進することを示した（Weissmueller et al., 2014）。これは、変異 p53 蛋白が p73/NF-Y 複合体を阻害することにより、PDGFRβ の転写が過剰に促進されるという機序を明らかにしたものであるが、PDGFRβ の下流でどのような経路が活性化されるのかに関しては言及されていない。

低分子量 G 蛋白質である ARF6 は細胞膜発現蛋白のエンドサイトーシスやリサイクリングを調節する蛋白であることが知られている（Donaldson, 2003）。佐邊らは、浸潤性の高い乳癌細胞株、肺腺癌細胞株、腎明細胞癌細胞株において ARF6 を起点とするシグナル伝達経路（ARF6-AMAP1 経路）（図 2）が過剰発現し、癌細胞の浸潤転移形質獲得を促進することを示してきた（Sabe, 2003; Hashimoto S., et al., 2004; Onodera et al., 2005; Sabe et al., 2009; Hashimoto S., et al., 2016; Hashimoto A., et al., 2016a）。この経路では、活性化された受容体型チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase、以下、RTK）のリン酸化チロシン残基に guanine nucleotide exchanging factor（GEF）の GEP100 が結合、もしくは G 蛋白質共役受容体に EFA6B が結合することにより、ARF6 が活性化される（Morishige et al., 2008; Menju et al., 2012; Hashimoto S., et al., 2016）。活性化された ARF6 はその下流のエフェクター分子である AMAP1 をリクルートし、間葉系細胞に特異的に発現する EPB41L5 との結合を促進する（Hashimoto S., et al., 2016 Hashimoto A., et al., 2016a; Hashimoto A., et al., 2016b）。EPB41L5 は E-カドヘリンの裏打ち蛋白である p120 カテニンと結合し、p120 カテニンと E-カドヘリンとの結合を阻害することにより、E-カドヘリンのエンドサイトーシスを促進することが in vivo で証明されている（Hirano et al., 2008）。さらに、AMAP1 は PRKD2 とも結合し、β1 インテグリンの細胞膜への輸送を促進することも示され（Onodera et al., 2012）、ARF6-AMAP1 経路が癌細胞の EMT に重要な役割を果たしていることが明らか

となっている。また、乳癌、腎明細胞癌、舌癌において、切除標本における AMAP1 および EPB41L5 の高発現が予後不良と関連する事も示されている（Kinoshita et al., 2013; Sato et al., 2014; Hashimoto S., et al., 2016）。

低分子量 G 蛋白質は、メバロン酸経路（Mevalonate pathway、以下、MVP）により翻訳後修飾（ファルネシル化もしくはゲラニルゲラニル化もしくはその両方）を受けることで、活性化が可能となる。MVP の律速酵素である 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA レダクターゼを阻害するスタチン系薬剤は、コレステロール合成を阻害すると同時に、低分子量 G 蛋白質の翻訳後修飾を阻害することが知られており（Wong et al., 2002）、スタチン系薬剤が癌細胞の増殖抑制、アポトーシス誘導、化学療法の作用増強に関連することが示されてきた（Agarwal et al., 1999; Feleszko et al., 2000; Dimitroulakos et al., 2000）。また、変異 p53 蛋白が MVP を制御する転写因子 SREBP を抑制し、MVP を過剰に活性化させることで、乳癌細胞の悪性度を増強することが示されている（Freed-Pastor et al., 2012）。この報告を受けて、佐邊らは乳癌細胞で *TP53* の機能喪失により ARF6 が活性化され、機能獲得型 *TP53* 変異により ARF6 がさらに過剰に活性化されること、また、ARF6 は別の低分子量 G 蛋白質 RAB11b を介して活性化されることを示した（Hashimoto A., et al., 2016a）。RAB11b はゲラニルゲラニル転移酵素 2 型（geranylgeranyl transferase type II、以下、GGT-II）により活性化されることが知られており（Wiemer et al., 2011）、siRNA により *GGT-II* をノックダウンすると、乳癌細胞の浸潤性が阻害され、化学療法抵抗性が改善することも世界に先駆けて報告した（Hashimoto A., et al., 2016a）。

以上のような背景から、本研究の目的は膵癌細胞において ARF6-AMAP1 経路の活性化が膵癌細胞の浸潤性、転移性、化学療法抵抗性に根幹的な役割を果たし、ARF6-AMAP1 経路を構成する蛋白が新規治療標的分子となりうることを分子生物学的に明らかにすることである。

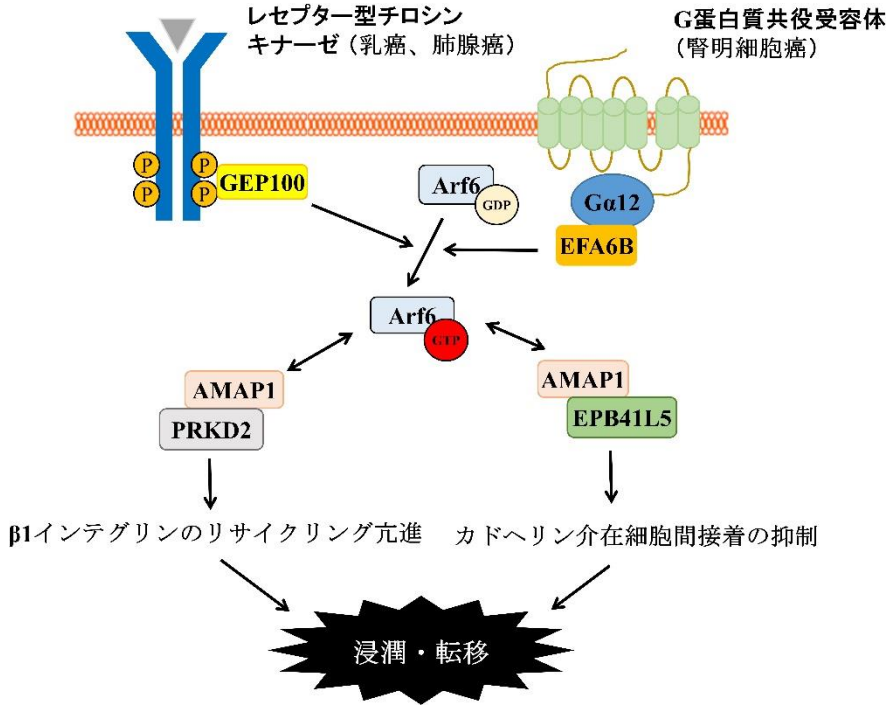


図 2　ARF6-AMAP1 経路の活性化を介した浸潤形質獲得モデル

癌細胞の RTK（乳癌、肺腺癌）もしくは GPCR（腎明細胞癌）にリガンドが結合すると、GEP100 もしくは EFA6B を介して ARF6 が活性化され、AMAP1 がリクルートされる。AMAP1 は EPB41L5 や PRKD2 と結合することで、β1 インテグリンの細胞膜への輸送や E-カドヘリンのエンドサイトーシスを促進する。その結果、癌細胞の運動性が増し、浸潤・転移する。

実験方法

1）細胞

本研究では、ヒト膵癌細胞株として BxPC-3、Capan-2、Panc-1、MIAPaCa-2、SW1990 を、膵発癌モデルマウス細胞株として KPC を、これまでの ARF6 研究で使用されてきたヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 を使用した。BxPC-3、Capan-2、Panc-1、MIAPaCa-2、SW1990、MDA-MB-231 は American Type Culture Collection から購入した。KPC は水上裕輔 先生（旭川医科大学消化器内科）より供与された。細胞培地は、Panc-1、MIAPaCa-2、SW1990 に Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM、Sigma-Aldrich）、BxPC-3 および KPC に Roswell Park Memorial Institute-1640（RPMI-1640、Corning Life Sciences）、Capan-2 に McCoy’s 5A（GE Healthcare Life Sciences）を使用した。これらにはウシ胎児血清（fetal bovine serum、以下、FBS、GE Healthcare Life Sciences）を終濃度 10 %として添加した。MDA-MB-231 は DMEM と RPMI-1640 を 1:1 で混和した培地に終濃度 10 %FBS と 5 %Nu serum（BD Biosciences）を添加した。293FT 細胞は Invitrogen から購入し、DMEM に終濃度 10 %FBS、0.1 mM 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウムを混和した培地で培養した。Plat-E 細胞は北村俊雄 先生（東京大学医科学研究所先端医療研究センター細胞療法分野）より供与された。DMEM に終濃度 10 %FBS を添加した培地で培養した。すべての細胞株は実験開始前に 4’,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（Sigma-Aldrich）を使用して、マイコプラズマ非感染であることを確認した。実験に使用した細胞株には抗生物質を使用していない。細胞増殖能は Cell-Counting Kit-8（Dojindo）を使用し、測定した。

2）使用した抗体および薬剤

使用した抗体およびその購入元を表 1 に示す。

表 1　抗体およびその購入元

標的蛋白	購入元
ARF6	Santa Cruz Biotechnology
GGT-II	Santa Cruz Biotechnology
ZEB1	Cell Signaling Technology
p53（ウェスタンブロット）	Cell Signaling Technology
RAB11b	Cell Signaling Technology

β-actin	Sigma-Aldrich
p53（免疫染色）	Dako
PDGFRβ（免疫染色）	R&D systems

GEP100、AMAP1、EPB41L5 に対する抗体は、それぞれのアミノ酸 139 番目から 248 番目、アミノ酸 935 番目から 1002 番目、アミノ酸 541 番目から 733 番目を抗原としている。グルタチオン S-トランスフェラーゼ（Glutathione S-transferase、以下、GST）融合蛋白質発現用ベクター pGEX-4T-2 にこれらの抗原部位の遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて、大腸菌の形質転換を行う。形質転換した大腸菌を培養・破砕し、上清を回収する。抗原蛋白質は GST 融合蛋白質として発現するので、GST タグを特異的に認識し吸着するグルタチオンセファロース 4B をカラムに充填し、煩雑蛋白質を除去した後、GST 融合蛋白質を溶出する。得られた抗原をウサギに免疫し、抗血清を採取し、抗体のアフィニティー精製を行う。得られた抗体の特異性・妥当性に関しては十分に検討されている（Onodera et al., 2005; Hashimoto S., et al., 2005; Morishige et al., 2008; Sabe et al., 2009; Menju et al., 2011; Onodera et al., 2012; Sato et al., 2014; Hashimoto S., et al., 2016; Hashimoto A., et al., 2016a; Hashimoto A., et al., 2016b）。

使用した薬品およびその購入元を表 2 に示す。

表 2　薬品および購入元

薬品名	購入元
Platelet derived growth factor (PDGF)-BB	Peprotech
Gemcitabine	Wako
5-Fluorouracil	Wako
Oxaliplatin	Wako
Irinotecan	Wako
Simvastatin	Sigma-Aldrich

Simvastatin はプロドラッグである。エタノールで溶解後、水酸化ナトリウムを添加することで活性体に変換し、塩酸で pH7.0 に調整し、ジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide、以下、DMSO）で適切な濃度に希釈して使用した（Sadeghi et al., 2000）。

3）逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction、RT-PCR）

細胞から total RNA を TRIzol RNA isolation Reagent（Thermo Fisher SCIENTIFIC）で抽出後、SuperScript II Reverse Transcriptase（Invitrogen）で 42 ℃ 、60 分間反応させ、cDNA を合成した。標的遺伝子のコーディング領域に特異的なプライマーで、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice（TaKaRa Bio）を用いて、標的蛋白のコーディング領域を 35 サイクル増幅した。PCR 産物を 1 %アガロースゲルに泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）で PCR 産物を抽出した。

使用したプライマー配列を表 3 に示す。

表 3　RT-PCR 用プライマー配列

標的遺伝子	塩基配列 (5'- -3')
KRAS Forward	TCCCAGGTGCGGGAGAGA
KRAS Reverse	AACAGTCTGCATGGAGCAGG
TP53 Forward	TGACACGCTTCCCTGGATTG
TP53 Reverse	TCTGACGCACACCTATTGC
mouse *KRAS* Forward	ATGACTGAATATAAACTTGTGG
mouse *KRAS* Reverse	TTACATAATTACACACTTTGTC
mouse *TP53* Forward	GCTGTAGGTAGCGACTACAGTTA
mouse *TP53* Reverse	GAAGTCATAAGACAGCAAGGAGA

4) サブクローニングおよび Sanger シークエンス

10×dAttachment mix（TOYOBO）を用いて、RT-PCR で得た増幅産物の両端に dA を付加し、pGEM-T Easy Vector（Promega）にライゲーションする。これをコンピテントセル（DH5）に導入し、アンピシリン含 LB プレートに播き、37 ℃で一晩培養する。翌日、プレート上のシングルコロニーを採取し、これをアンピシリン含 LB 培地中でさらに一晩培養する。翌朝、増殖した大腸菌を回収し、PureYield Plasmid Miniprep System（Promega）で plasmid DNA を抽出する。pGEM-T-Easy Vector にライゲートされた配列を解析するため、ベクターの 5'側（T7 promotor）、3'側（SP6 promotor）のプライマーを用いて、それぞれシークエンス PCR を行った。PCR 産物を BigDye XTerminator Kit（Applied Biosystems）で purify し、3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用い、インサートの配列を解析した。使用したプライマー配列を表 4 に示す。

表 4　シークエンス用プライマー配列

	塩基配列 (5'- -3')
T7 promotor	TAATA CGACT CACTA TAGGG
SP6 promotor	CAAGC TATTT AGGTG ACACT ATAG

5）siRNA のトランスフェクションと遺伝子サイレンシング

50nM の siRNA を Lipofectamine RNAiMAX（Invitrogen）を用いて各細胞にトランスフェクションした。開始後 24 時間で、通常の培地または 0.5 %FBS 含培地に交換し、さらに 24 時間後に実験に使用した。また、薬剤抵抗性実験ではトランスフェクション開始後 24 時間に細胞を 96 ウェルディッシュに播き直し、一晩培養後、実験に使用した。同一標的遺伝子に対する塩基配列の異なる 2 つの siRNA を使用した。ネガティブコントロールとして Irrelevant sequences（*Irr*, Dharmacon）を使用した。本研究で用いた siRNA の塩基配列を表 5 に示す。Irr 以外の全ての siRNA の 3'端には dTdT 配列を付加している。

microRNA のトランスフェクションは以下の通り施行した。MIAPaCa-2 を 6 ウェルディッシュに 2×10^5 個ずつ播き、終濃度 20 nM の *pre-miR-200b*（Ambion）を Lipofectamine RNAiMax を用いてトランスフェクションし、さらに 3 日間培養して実験に使用した。

表 5　siRNA 塩基配列

標的遺伝子	塩基配列（5'-3'）
ARF6 (#1)	AAGCACCGCAUUAUCAAUGACCG
ARF6 (#2)	CAACGUGGAGACGGUGACUU
GEP100 (#1)	AAGUGAAAUCACUGGCCGAG
GEP100 (#2)	CCAGUACCAGAUGAACAAGAA
AMAP1 (#1)	AAGACCUGACAAAAGCCAUUA
AMAP1 (#2)	CCAGGGAUUUACUUGCACUAA
EPB41L5 (#1)	GAGAUGGAACUGGCUAUUUUU
EPB41L5 (#2)	UUCAGAUUCGUGCCUAUUCAG
RAB11b (#1)	GCAACAUCGUCAUCAUGCU
RAB11b (#2)	AGAACAACUUGUCCUUCAU
GGT-II (#1)	GCAGAUUAUAUCGCAUCCU
GGT-II (#2)	GCCAACAUGAAUGUGGUGG

Irrelevant (*Irr*)	GCGCGCUUUGUAGGAUUCG

6）shRNA のトランスフェクションと恒常的遺伝子サイレンシング

恒常的遺伝子サイレンシングのために、pLKO.1-puro ベクター（Addgene）を用いて、以下の如く shRNA を合成し、トランスフェクションした。

293FT 細胞に、合成したプラスミド、パッケージングプラスミド（psPAX2、Addgene）、エンベローププラスミド（pMD2.G、Addgene）を Lipofectamine LTX（Invitrogen）を用いてトランスフェクションした。48 時間培養後、培養上清を 0.45 μm フィルターで濾過した。この上清をウイルス吸着剤 Polybrene 8 μg/ml（Sigma-Aldrich）の存在下で細胞培地に添加する。37 ℃で 24 時間培養後、MIAPaCa-2 では 3 μg/ml、KPC では 2 μg/ml の Puromycin（Invitrogen）を添加し、1 週間セレクションを行った。得られた細胞の標的遺伝子がサイレンシングされていることをウェスタンブロット法で確認した。ネガティブコントロールとして Scramble shRNA を使用した。本研究で使用した shRNA の塩基配列を表 6 に示す。

表 6　shRNA の塩基配列

標的遺伝子	塩基配列（5’-3’）
Human *ARF6* (#1)	GTCAAGTTCAACGTATGGGAT
Human *ARF6* (#2)	CTTGCTGTAGATGGCTTATTT
Mouse *ARF6* (#1)	CCGGAAGGAGAGAAATCCAAA
Mouse *ARF6* (#2)	GCATTACTACACCGGGACCCA
Mouse *GEP100* (#1)	AGACGCTAATTGGGATCTATG
Mouse *GEP100* (#2)	GTGATGAAATACGTAAGTAAA
Mouse *AMAP1* (#1)	GACCTGCTGCAGAACCTTATA
Mouse *AMAP1* (#2)	AGATGTGTGAATATCTCATTA
Human *EPB41L5* (#1)	CCTGAGAAGAACTACGGAGAA
Human *EPB41L5* (#2)	CCTACCATGTATGAAGCTATA
Mouse *EPB41L5* (#1)	GTTCAGTTGGCAGCTTATAAT
Mouse *EPB41L5* (#2)	TTCGACTAGGATCCCGATTTA
Human *ZEB1* (#1)	CTGAACCTCAGACCTAGTAAT
Human *ZEB1* (#2)	TGTCTCCCATAAGTATCAATT
Human *ZEB1* (#3)	CCTACCACTGGATGTAGTAAA
Mouse *ZEB1* (#1)	ACAAGACACCGCCGTCATTTA

Mouse *ZEB1* (#2)	GTCGACAGTCAGTAGCGTTTA
Human *TP53* (#1)	GAGGGATGTTTGGGAGATGTA
Human *TP53* (#2)	GCTCACATGGTTAACCTCTAA
Mouse *TP53* (#1)	CCGACCTATCCTTACCATCAT
Mouse *TP53* (#2)	CACACCCTGTAAGATTCTATC

7）ウェスタンブロット法

細胞をリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline、以下、PBS）で 2 回洗浄し、4 ℃の細胞溶解バッファー（1 % NP-40、1 %デオキシコール酸、150 mM 塩化ナトリウム、20 mM トリス塩酸緩衝液（pH7.4）、5 mM エチレンジアミン四酢酸（ethylenediaminetetraacetic acid、以下、EDTA）、0.1 %ドデシル硫酸ナトリウム（Sodium dodecyl sulfate、以下、SDS）、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、1 % アプロチニン、1 mM バナジン酸ナトリウム、0.03 % ペプスタチン A、0.02 % ロイペプチン）で溶解し、4 ℃で 10 分間静置した。4 ℃・15000 rpm・30 分間遠心し、上清を採取した。DC protein assay kit（Bio-Rad）を用いて、蛋白定量し、1 μg/μl に調整した。15 %または 8 %の SDS ゲルにサンプルを電気泳動し、ポリフッ化ビニリデンメンブレンにトランスファーした。5 %スキムミルク（AMAP1、EPB41L5、p53）または 5 %ウシ血清アルブミンで 30 分～1 時間ブロッキングし、1 次抗体を 4 ℃で一晩反応させた。メンブレンを 1 % Tween-20 を含む Tris 緩衝生食で 15 分ずつ 3 回洗浄後、1 次抗体に対応する 2 次抗体を 1 時間反応させ、Tris 緩衝生食で 5 分ずつ 3 回洗浄した。ECL start Western Blotting Detection Reagent（GE Healthcare）で発光反応させ、FPM100（FUJIFILM）で X 線フィルムに映写し、現像した。

8）リガンド刺激条件

MIAPaCa-2、Capan-2、KPC におけるリガンド刺激では、実験開始 24 時間前、2 時間前、1 時間前に、PBS で細胞を 2 回洗浄後 0.5 % FBS を含む培地に交換し、PDGF-BB で 5 分間刺激を行い、用途に合った細胞溶解液を使用し、ライセートを採取した。PDGF-BB 50 ng/ml の刺激により、KPC の PDGFRβ に有意なチロシンリン酸化が確認されているため（Weissmueller et al., 2014）、本研究でも同量を使用した。

9）GST-Golgi-localized, γ-ear-containing, Arf-binding protein（GGA）pulldown アッセイ

ARF6 活性は GST-GGA pulldown 法により測定した。細胞を GGA pulldown 用の溶解バッファー（50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム、0.005 % SDS、0.05 % コール酸ナトリウム、1 % Triton X-100、10 % グリセロール、0.01 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、0.01 % アプロチニン, 0.001 μM ペプスタチン A、0.001 μM ロイペプチン、0.02 mM バナジン酸ナトリウム、2 mM ジチオトレイトール） 250 μl で溶解し、4 ℃・15000 rpm・30 分間遠心し、上清を採取した。DC protein assay kit（Bio-Rad）を用いて、蛋白定量し、300 μg の上清と 20 μg のグルタチオンセファロースビーズで標識された GST-GGA を 4 ℃で 45 分間反応させた。上述の溶解バッファーで 3 回洗浄した後、ビーズを Laemmli バッファー（Bio-Rad）でサスペンドし、100 ℃で 5 分間 boil した。この蛋白を 5×SDS とともに超純水に溶解し、ウェスタンブロット法で内因性 ARF6 活性を測定した。

11）マトリゲル浸潤アッセイ

マトリゲル浸潤アッセイは Biocoat Matrigel chamber（8.0 μm pore size）（Corning Life Sciences）を用いて行った。適切なスターブを行った細胞を PBS で洗浄後、0.025 %トリプシン含 EDTA でディッシュから細胞を剥がし、トリプシンインヒビターを添加した。血球計算盤で細胞数を測定し、細胞培地で 2×10^5 cells/ml の細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液 500 μl（1×10^5 cells） をマトリゲル上に播き、下方のウェルには PDGF-BB を添加した細胞培地もしくは細胞培地のみを入れた。これを 37 ℃、5 % CO_2 で 20 時間培養した。マトリゲルを通過した細胞を 4 %パラホルムアルデヒドで 25 ℃、20 分間固定し、1 %クリスタルバイオレットで染色し、浸潤細胞数を測定した。

Simvastatin を使用した実験では、浸潤アッセイの開始 24 時間前から Simvastatin を培養ディッシュに添加し、浸潤アッセイでは、同濃度の Simvastatin を両方のウェルに添加した。

以上の実験は、毎回各群 2 ウェルで行い、これを 3 回繰り返した。

12）*in vitro* 化学療法抵抗性実験

使用する細胞に siRNA をトランスフェクションし、24 時間培養した。この細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルに 3×10^3 個ずつ播き、さらに一晩培養し、様々な濃度の Gemcitabine、5-Fluorouracil、Oxaliplatin、Irinotecan、Simvastatin を投与し、72 時間培養した。各ウェルに 10 µl の 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシフェニル)-2-(4-スルホニル)-2H-テトラゾリウム (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium、以下、MTS) solution（Cell counting kit-8、Dojindo Molecular Technologies）を添加し、1 時間培養する。生存細胞内には MTS が取り込まれ、橙色のホルマザンに還元される。ホルマザンの生成量は生細胞数に比例することがわかっている（Tominaga et al., 1999）。この特徴を利用して 490 nm 吸光度をプレートリーダーARVOmx（Perkin Elmer）で測定することにより、細胞増殖率を求めた。

shRNA で恒常的遺伝子サイレンシングを施行した細胞や Simvastatin を使用した実験では抗癌剤投与前の前培養を 24 時間とした。それ以外の方法は前述のとおりである。

13）*in vivo* 転移実験

Luciferase を恒常的に発現させるために、KPC に pLenti CMV V5-Luc-blast（Addgene）を感染させ、5 µg/ml の Blasticidin S（Invitrogen）で 1 週間セレクションを行った。Luciferase 活性は、Luciferase assay system（Promega）で測定し、活性が十分あることを確認した。その後、EPB41L5 を恒常的ノックダウンした KPC（KPC/Luc *shEPB41L5*）を、また、コントロールとして KPC/Luc *Irr* を 6）に記載したとおりに作成した。

全ての動物実験は北海道大学動物実験倫理委員会の承認を得ている。この実験で使用した BALB/cAJc1-nu/nu は CLEA Japan から購入した。5 週齢の BALB/cAJc1-nu/nu 雌の尾静脈に 2×10^6 個の KPC/Luc *Irr*、KPC/Luc *shEPB41L5* をそれぞれ注入した。3 %isoflurane で麻酔後、PBS で溶解した D-luciferin（Promega）150 mg/kg を腹腔内投与し、10 分後に IVIS imaging system（Xenogen）で生物学的発光量を測定した。データ解析には Living image software（Xenogen）を使用した。マウス胸部の Photon flux（photons $s^{-1}\cdot sr^{-1}\cdot cm^{-2}$）を測定した。

Irr 群と *shEPB41L5* 群で photon flux に有意差を認めた時点で、マウスを安楽死させた。IVIS での発光部を摘出し、10 % 中性緩衝ホルマリン（Wako）で固定した。組織標本を作製し、組織学的に転移巣を評価した。標本作製および染色は

Morpho Technology 社に依頼した。

15）対象患者と組織サンプル

全ての臨床標本は 1999 年 1 月から 2005 年 12 月までに北海道大学病院消化器外科Ⅱ（旧 第 2 外科）において、通常型膵癌と診断され膵切除を施行された 99 名の患者から採取したものである。全例包括同意を取得し、検体を採取・保存した。この研究は北海道大学病院自主臨床研究倫理委員会の承認を得ている（承認番号 014-0084）。文書による説明と同意は同委員会から免除されている。

16) 免疫組織化学染色法

免疫組織化学染色は酵素ポリマー法で施行した。組織サンプルをキシレンで脱パラフィンし、エタノールで脱水した。トリス緩衝生食でリンス後、抗原賦活化処理として 1 mM EDTA buffer（pH 9.0）または 1 mM citrate buffer solution（pH 6.0）（Nichirei）を使用し、95 ℃で 30～40 分間処理した。その後、0.3 %H_2O_2 加メタノールで室温 10 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。トリス緩衝生食でリンス後、1 次抗体を室温 60 分または 4 ℃一晩反応させた。2 次抗体は ChemMate ENVISION で室温 30 分間反応させた。トリス緩衝生食でリンス後、発光試薬としてジアミノベンジジン（Dojindo Molecular Technologies）を使用し、室温 5 分間反応後、ヘマトキシリンで核染色を行い、検出した。以上の工程は全て Morpho Technology 社に依頼し、施行された。使用した抗体の詳細な反応条件を表 7 に示す。

表 7　免疫組織化学染色に用いた抗体と反応条件

標的蛋白	クローン	抗原賦活	抗体濃度	1 次抗体反応条件
p53	D2-40	EDTA buffer (pH 9.0), 95 ℃, 30 分	1 : 100	室温, 60 分
PDGFRβ	#PR7212	EDTA buffer (pH 9.0), 95 ℃, 30 分	1 : 50	4 ℃, 一晩
GEP100	×	EDTA buffer (pH 9.0), 95 ℃, 40 分	1 : 750	室温, 60 分
AMAP1	×	EDTA buffer (pH 9.0), 95 ℃, 40 分	1 : 750	室温, 60 分
EPB41L5	×	Citrate buffer (pH 6.0), 95 ℃,40 分	1 : 1000	4 ℃, 一晩

抗 GEP100、AMAP1、EPB41L5 抗体は過去に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（現、北海道大学大学院医学研究院生化学分野分子生物学教室）で作製したものであるためクローンに関する情報はない。

17）ヒト膵癌組織サンプルと免疫組織化学染色の評価法

ヒト膵癌組織における p53、PDGFRβ、GEP100、AMAP1、EPB41L5 発現と予後の解析は、Tissue microarray を用いた免疫組織化学染色により解析した。Tissue microarray は 99 名の手術検体から構成され、当教室で過去に作製したものである。臨床情報が不足するものや組織の状態不良のものを除外した 70 名の組織サンプルを解析対象とした。免疫組織化学染色の評価法は以下の通りである（Ishibashi et al., 2003）。PDGFRβ、GEP100、AMAP1、EPB41L5 においては、腫瘍細胞における各蛋白の染色強度を①スコア 0（正常膵組織と同等またはそれよりも弱い染色強度を示す場合）、②スコア 1（正常膵組織に比べて強く染色されている場合）、③スコア 2（正常膵組織に比べて非常に強く染色されている場合）の 3 段階に分類し、それぞれの染色強度の全体に占める割合を 0.0～1.0（0 %であれば 0、10～90 %であれば 0.1～0.9、100 %であれば 1.0）で表し、0×（スコア 0 の占める割合） +1×（スコア 1 の占める割合）+2×（スコア 2 の占める割合）を計算し、これを H スコアと定義する。例えば、スコア 0 が 70 %、スコア 1 が 10 %、スコア 2 が 20 %であれば、H スコア＝（0 × 0.7）+（1 × 0.1）+（2 × 0.2）= 0.5 となる。p53 においては、全腫瘍細胞の 5 %以上で核が染色される場合に過剰発現、それ以外を正常と定義した。これらの組織評価は臨床情報を把握しない二人の独立した ARF6 研究に精通した研究者により行われた。H スコアおよび臨床病理学的所見と全生存率（overall survival、以下、OS）と無病生存率 （disease free survival、以下、DFS）の関連について単変量および多変量解析を行った。OS、DFS の解析には Kaplan-Meier 法を用い、群間比較は log-rank 検定を使用した。多変量解析には、単変量解析で有意差を認める因子を独立変数として採用し、Cox 比例ハザード回帰分析を用いて解析を行った。

18）Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA を RNeasy Mini kit（QIAGEN）で抽出した。15 μg の RNA を SuperScript VILO Master Mix（Invitrogen）で逆転写し、TaqMan Universal PCR Master Mix および TaqMan gene expression assay（#4331182、Applied Biosystems）を使用し、qRT-PCR 反応を 3 回施行し、7300 Real Time PCR System（Applied Biosystems）で RNA を定量した。

19）統計学的解析

データは平均値±標準誤差で表され、独立した少なくとも 3 回の実験のデータを元にした。特に記述しない限り、2 群間の比較は Student *t* 検体、3 群以上の比較は one-way analysis of variance（ANOVA）を使用し、群間比較は Tukey 法を用いた。P 値 < 0.05 の場合を有意差ありと判定した。これらの解析は、自治医科大学埼玉医療センターが無償で提供している EZR という統計ソフトを用いた。EZR はその正確性が文献上、保証されている（Kanda, 2014）。

20) 研究倫理

全ての動物実験および遺伝子組み換え実験は、それぞれ北海道大学動物実験に関する規定および北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定を遵守し、施行した。

実験結果

1）ARF6-AMAP1 経路の高発現と PDGFR による ARF6-AMAP1 経路活性化が PDAC の悪性度進行に重要である。

まず、ヒト膵癌細胞株 BxPC-3、Capan-2、Panc-1、MIAPaCa-2、SW1990、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231、膵発癌モデルマウス細胞株 KPC の *KRAS* および *TP53* の変異プロファイルを Sanger 法で確認した（表 9）。American Type Culture Collection で公表されているプロファイルとの相違を認めなかった。また、KPC は *KRAS* 変異（G12D）, *TP53* 変異（R172H）を有するマウス由来であることが確認された。

表 9　本研究で使用した細胞株の遺伝子プロファイル

細胞株	遺伝子変異
BxPC-3	*KRAS*: wild type *TP53*: p.Y220C
Capan-2	*KRAS*: p.G12V *TP53*: wild type
Panc-1	*KRAS*: p.G12D *TP53*: p.R273H
MIAPaCa-2	*KRAS*: p.G12C *TP53*: p.R248W
SW1990	*KRAS*: p.G12D *TP53*: wild type
MDA-MB-231	*KRAS*: wild type *TP53*: p.R280K
KPC	*KRAS*: p.G12D *TP53*: p.R172H

上記細胞株の蛋白発現を MDA-MB-231 をコントロールとしてウェスタンブロット法で確認すると、全ての細胞株で ARF6、GEP100、AMAP1 の発現を認めたが、EPB41L5 は Panc-1、MIAPaCa-2、KPC で発現していた。この蛋白発現の特徴は MDA-MB-231 のそれと酷似しており、Panc-1、MIAPaCa-2、KPC は MDA-MB-231 と同様に ARF6-AMAP1 経路が活性化され、間葉系形質を示す細胞株であると予想された。一方、BxPC-3、Capan-2、SW1990 は上記蛋白の発現パターンから上皮系形質を持った細胞株と思われた。Panc-1、MIAPaCa-2、KPC は p53

が過剰発現しており、機能獲得型 *TP53* 変異を有することが示唆された（図 3）。この後の実験では、上皮系形質を持つ細胞の代表として Capan-2 を、間葉系形質を持つ細胞の代表として MIAPaCa-2、KPC を使用することとした。

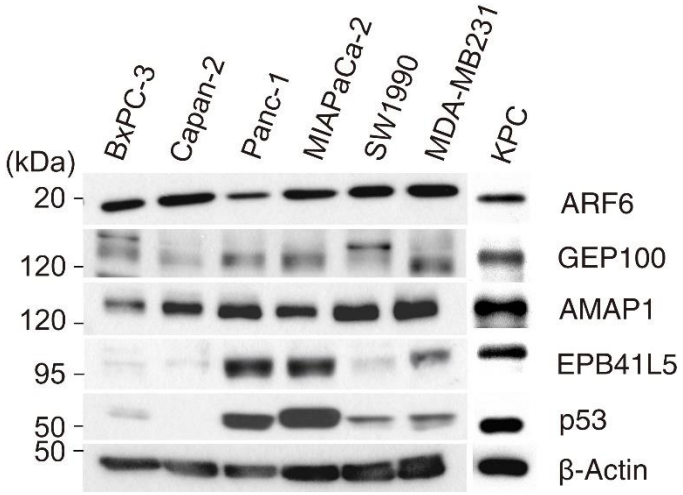
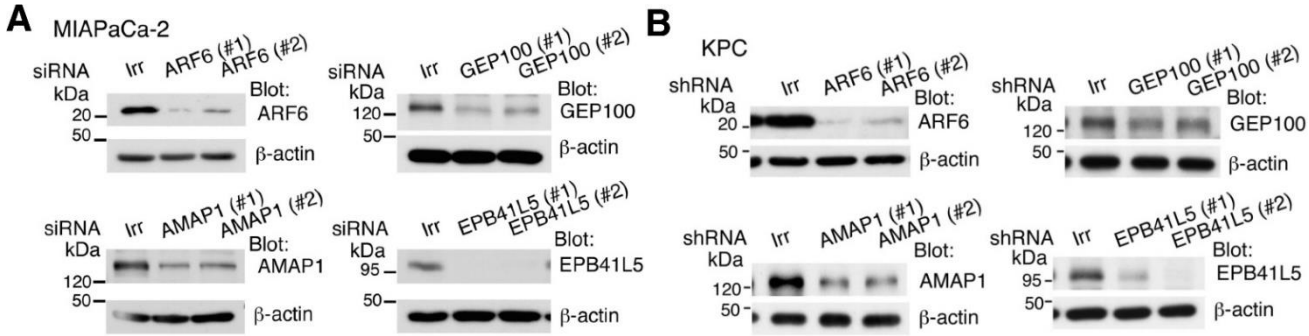


図 3　各細胞株における ARF6-AMAP1 経路を構成する蛋白の発現量

EPB41L5 は間葉系形質を持つ細胞（Panc-1、MIAPaCa-2、MDA-MB231、KPC）でのみ発現し、それらの細胞株では p53 が過剰発現していた。

癌細胞の浸潤性、転移性、化学療法抵抗性に ARF6-AMAP1 経路が与える影響につき調べるため、MIAPaCa-2 では siRNA、KPC では shRNA を用いて *ARF6*、*GEP100*、*AMAP1*、*EPB41L5* をサイレンシングし、この先の実験で使用した。まず、各蛋白につき塩基配列の異なる 2 種類の siRNA または shRNA が有効であることを確認した（図 4A、B）。また、上記蛋白のサイレンシングにより細胞増殖に有意な影響を与えないことも併せて確認した（図 4C）。



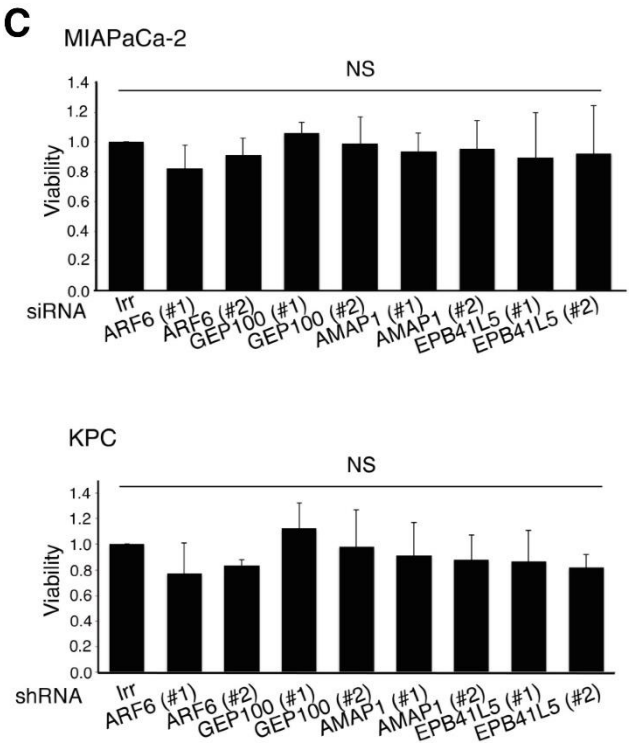


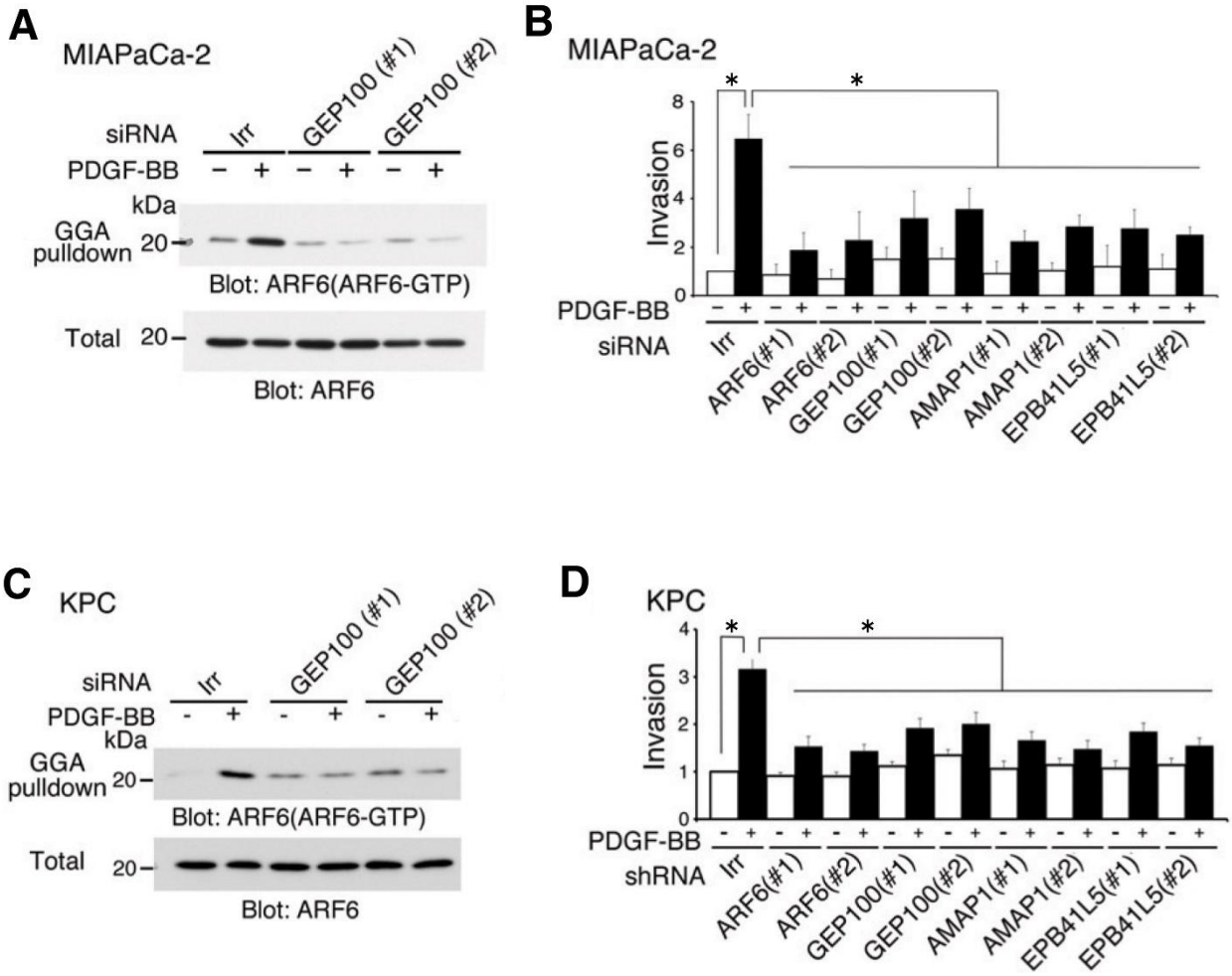
図 4　各 siRNA および shRNA の RNA 干渉効果と細胞増殖に及ぼす影響

（A、B）各 siRNA および shRNA トランスフェクション後の ARF6、GEP100、AMAP1、EPB41L5 発現量。各蛋白に対して塩基配列の異なる 2 種類の siRNA（#1、#2）、shRNA（#1、#2）を使用し、既知遺伝子配列と類似しない配列の siRNA、shRNA（*Irr*）をネガティブコントロールとした。いずれの siRNA、shRNA も有効であることを確認した。（C）*Irr* を基準とした細胞増殖率の相対値。細胞増殖率は各 siRNA および shRNA トランスフェクションの影響を受けなかった（NS: not significant）。

PDGFRβ シグナリングが膵癌細胞の浸潤性・転移性に関連することが過去の報告（Weissmueller et al., 2014）で示されているため、PDGF-BB が ARF6-AMAP1 経路を活性化させるリガンドとして考えられた。実際、MIAPaCa-2 において、PDGF-BB 刺激が ARF6 を活性化させること、*siGEP100* により PDGF-BB 刺激依存的な ARF6 活性化が抑制されること、すなわち ARF6-AMAP1 経路を活性化させる GEF は GEP100 であることが判明した（図 5A）。また、PDGF-BB 刺激によりマトリゲル浸潤活性が増強した（図 5B）。MIAPaCa-2 および KPC の増殖は *KRAS* の恒常活性型変異に依存しており、PDGF-BB は有意な増殖因子にはならないと考えられるため、ARF6 活性化による純粋な細胞浸潤活性の上昇と判断できる。さらに、*siARF6*、*siGEP100*、*siAMAP1*、*siEPB41L5* により PDGF-BB 刺激

依存的な浸潤活性が有意に抑制された（図 5B）。同様の結果が KPC からも得られた（図 5C、D）。

次に、KPC/Luc *Irr* と KPC/Luc *shEPB41L5* の転移能を動物実験で比較した。上記細胞を BALB/c nu/nu マウス尾静脈に注入し、注入 9 日後の肺転移状況を比較すると、*shEPB41L5* により KPC の肺転移が有意に抑制された（図 5E～G）。



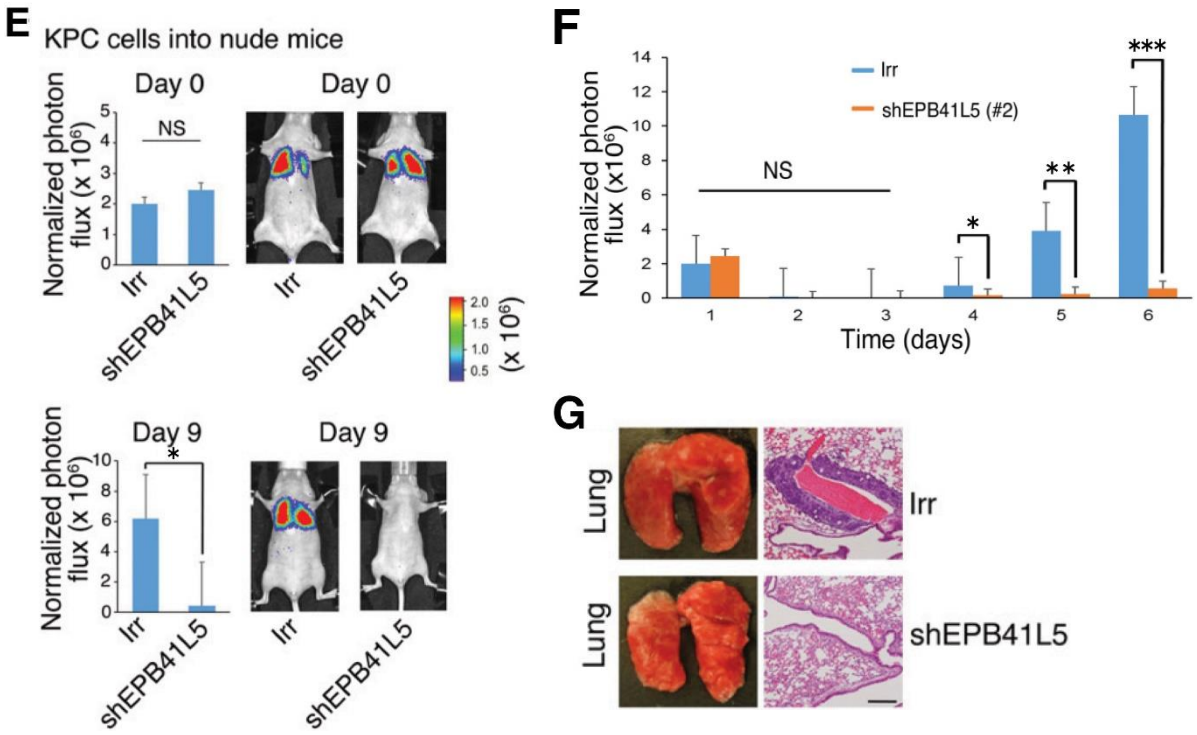


図 5 RNA 干渉が ARF6 活性化、浸潤、転移に及ぼす影響

（A～D）*GEP100* ノックダウンにより PDGF-BB 刺激依存的な ARF6 活性化が抑制され（A、C）、*ARF6*、*GEP100*、*AMAP1*、*EPB41L5* ノックダウンにより PDGF-BB 刺激依存的な細胞浸潤が抑制された（B、D）。B、D は *Irr* をトランスフェクションし、PDGF-BB 刺激しない細胞から得られた結果を 1 とした際の、各 siRNA、shRNA トランスフェクションから得られた結果との比を示している（＊：P < 0.001）。（E～G）ルシフェラーゼレポーター遺伝子を恒常的に発現する KPC *Irr* または KPC *shEPB41L5* を雌 BALBc nu/nu に静注し、肺転移形成を各群 5 個体ずつで比較。胸部の生物発光強度を静注日と静注後 1～6 日および 9 日に測定した。*shEPB41L5* 群で肺転移が有意に抑制された（＊：P＜0.05、＊＊：P＜0.01、＊＊＊：P＜0.001、NS：not significant）。（G）代表的な肺転移巣の組織像。*Irr* 群では肺血管周囲に転移巣を認めた。

癌細胞が間葉系形質に転換することで化学療法抵抗性を増強することが報告されている（Kajita et al., 2004; Arumugam et al., 2009）。また、乳癌細胞および腎癌細胞で ARF6-AMAP1 経路が化学療法抵抗性に関わることが示されている（Hashimoto S., et al., 2016; Hashimoto A., et al., 2016a; Hashimoto A., et al., 2016b）。膵癌治療で使用されている Gemcitabine、5-Fluorouracil、Oxaliplatin、Irinotecan を様々な濃度で MIAPaCa-2 培養上清に添加し、細胞増殖率を測定すると、*siARF6* および *siEPB41L5* により MIAPaCa-2 の化学療法感受性が有意に上昇することが確認された（図 6）。

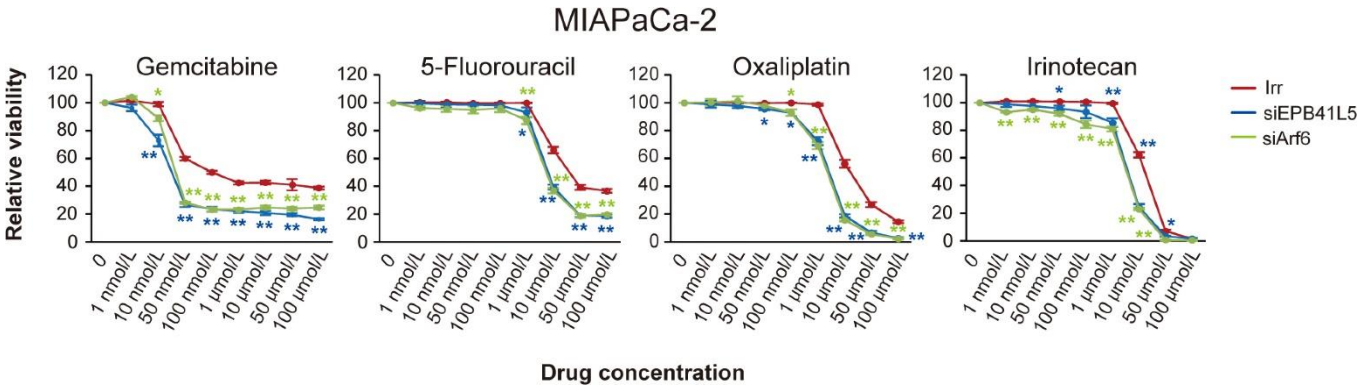


図 6 RNA 干渉が化学療法剤の効果に及ぼす影響

MIAPaCa-2 *Irr*、*siARF6*、*siEPB41L5* に Gemcitabine、5-Fluorouracil、Oxaliplatin、Irinotecan のいずれかを添加し、細胞増殖率を比較。薬剤を添加しない場合の増殖率を 100 とした際の、薬剤添加時の増殖率を比で表した。緑の＊は *Irr* と *siARF6* の比較、青の＊は *Irr* と *siEPB41L5* の比較。*siARF6* および *siEPB41L5* により化学療法剤に対する感受性が有意に上昇することが判明した（＊：$P < 0.05$、＊＊：$P < 0.01$）。

次に通常型膵癌切除標本における PDGFRβ、GEP100、AMAP1、EPB41L5、p53 の免疫染色強度と OS および DFS との関係を調べた。免疫染色で実用化されている抗 ARF6 抗体は現時点で存在せず、今回は評価対象としていない。対象患者の臨床病理学的背景を表 10 に示す。全例局所進行通常型膵癌で、術前化学療法や術前放射線療法を施行した症例は含まれていない。PDGFRβ、AMAP1、EPB41L5、GEP100、p53 の代表的な染色像を図 7A に示す。また、p53 以外の蛋白における H スコアの中央値を表 11 に示す。各蛋白につき H スコアの中央値で群分けし、中央値よりも低値を Low 群、高値を High 群とし、2 群間を比較すると、AMAP1、EPB41L5、PDGFRβ の高発現は、それぞれ単独でもそれらの組み合わせでも OS、DFS が有意に不良であることがわかった。一方、GEP100 の高発現や p53 過剰発現は単独では OS、DFS に有意な影響を与えないことも判明した（図 7B）。

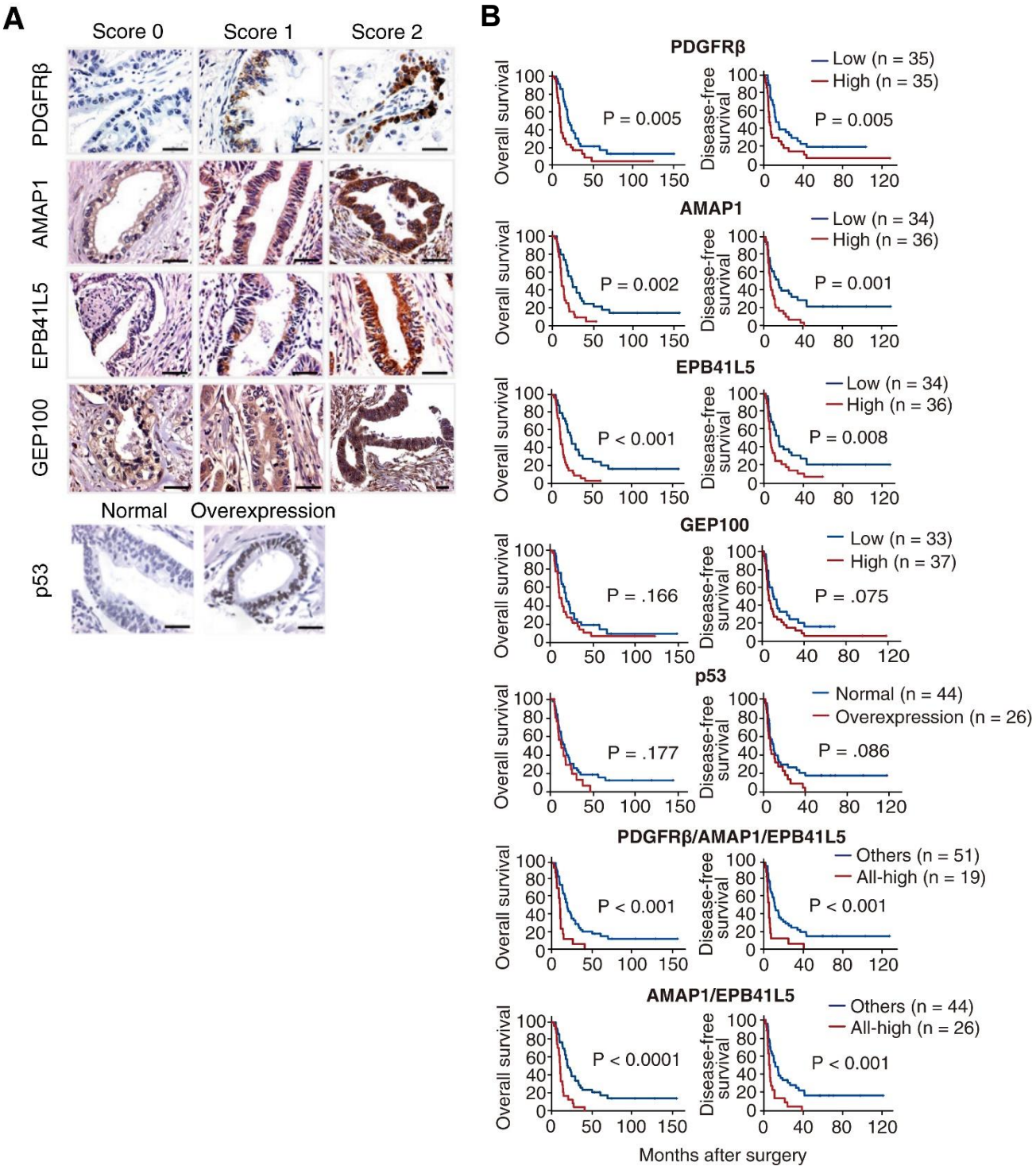

A
Score 0
Score 1
Score 2
PDGFRβ
AMAP1
EPB41L5
GEP100
Normal
Overexpression
p53
B
PDGFRβ
Low (n = 35)
High (n = 35)
P = 0.005
P = 0.005
AMAP1
Low (n = 34)
High (n = 36)
P = 0.002
P = 0.001
EPB41L5
Low (n = 34)
High (n = 36)
P < 0.001
P = 0.008
GEP100
Low (n = 33)
High (n = 37)
P = .166
P = .075
p53
Normal (n = 44)
Overexpression (n = 26)
P = .177
P = .086
PDGFRβ/AMAP1/EPB41L5
Others (n = 51)
All-high (n = 19)
P < 0.001
P < 0.001
AMAP1/EPB41L5
Others (n = 44)
All-high (n = 26)
P < 0.0001
P < 0.001
Overall survival
Disease-free survival
Months after surgery

図 7　膵癌組織の免疫染色像と予後の関係

（A）ヒト膵癌組織中の PDGFRβ、AMAP1、EPB41L5、GEP100、p53 を染色した際の、代表的な免疫染色組織像（スケールバー：100 μm）。PDGFRβ、AMAP1、EPB41L5、GEP100 の染色強度により点数付け（Score 0～2）を行った。p53 は全癌細胞の 5%以上陽性となる症例を過剰発現、それ以外を正常とした。（B）PDGFRβ、AMAP1、EPB41L5、GEP100 の染色強度および p53 陽性率で群分けした際の Kaplan-Meier 曲線。PDGFRβ、AMAP1、EPB41L5、GEP100 の各蛋白で H score を算出し、中央値より高値を High 群、低値を Low 群とし、また、AMAP1・EPB41L5 または PDGFRβ・AMAP1・EPB41L5 を組み合わせ、全て中央値より高値である群を All-High 群、ひとつでも低値があれば Others 群とした。また、p53 は過剰発現群と正常群に群分けし、OS および DFS を比較した。log-rank 検定で解析。PDGFRβ、AMAP1、EPB41L5 高発現は有意に予後不良であることが判明した

表 10　PDAC 患者の臨床病理学的背景

背景（n = 70）	患者数（%）
手術時年齢中央値（範囲）	67（35-89）
性別	
男性	44（62.9）
女性	28（37.1）
腫瘍マーカー	
CEA	
基準値内	36（51.4）
高値	34（48.6）
CA19-9	
基準値内	17（24.3）
高値	53（75.7）
DUPAN-2	
基準値内	30（42.9）
高値	40（57.1）
術前治療	
無	70（100）
有	0（0）
術後補助療法	
無	62（88.6）
有	8（11.4）

腫瘍の局在	
膵頭部	54（77.1）
膵体部	11（15.7）
膵尾部	5（7.2）
術式	
膵頭十二指腸切除術	54（77.1）
尾側膵切除術	4（5.8）
腹腔動脈幹合併切除を伴う尾側膵切除術	12（17.1）
腫瘍分化度	
高分化	12（17.1）
中分化	54（77.1）
低分化	4（5.8）
腫瘍径	
≦ 2 cm	11（15.7）
2 cm＜　≦4 cm	36（51.4）
4 cm＜　≦6 cm	17（24.3）
6 cm＜	6（8.6）
Unio Internationalis Contra Cancrum T 因子	
T1（膵内限局かつ腫瘍径≦2 cm）	0（0）
T2（膵内限局かつ 2 cm＜腫瘍径）	0（0）
T3（膵外進展あり、動脈・門脈浸潤なし）	38（54.3）
T4（膵外進展あり、動脈・門脈浸潤あり）	32（45.7）
リンパ節転移	
無（N0）	24（34.3）
有（N1）	46（65.7）
遠隔転移	
無（M0）	70（100）
有（M1）	0（0）
根治切除	
無	10（14.3）
有	60（85.7）
病理学的進行期	
IA （T1, N0, M0）	0（0）
IB （T2, N0, M0）	0（0）
IIA（T3, N0, M0）	14（20.0）

IIB（T1-3, N1, M0）	24（34.3）
III （T4, any N, M0）	32（45.7）
IV （any T, any N, M1）	0（0）

表 11　各蛋白の H スコア

染色蛋白	H スコア（中央値±標準誤差）
PDGFRβ	0.06 ± 0.01
AMAP1	0.15 ± 0.02
EPB41L5	0.07 ± 0.02
GEP100	0.14 ± 0.02

臨床病理学的背景と免疫染色結果から OS について単変量解析（表 12）を行った。単変量解析から、高 CEA 血症、高 CA19-9 血症、腫瘍径、リンパ節転移陽性、非根治切除、PDGFRβ 高発現、AMAP1 高発現、EPB41L5 高発現、PDGFRβ/AMAP1/EPB41L5 全高発現、AMAP1/EPB41L5 共高発現が有意に予後不良であることが示された。これらの因子の Spearman 順位相関係数を算出すると、PDGFRβ 高発現、AMAP1 高発現、EPB41L5 高発現、PDGFRβ/AMAP1/EPB41L5 全高発現、AMAP1/EPB41L5 共高発現に非常に強い相関関係を認めた（表 13）。多重共線性の排除のため、免疫染色結果からは AMAP1/EPB41L5 共高発現のみ多変量解析の独立変数として採用することとした。高 CEA 血症、高 CA19-9 血症、腫瘍径、リンパ節転移陽性、非根治切除、AMAP1/EPB41L5 共高発現を独立変数として多変量解析を行うと、腫瘍径＞2 cm と AMAP1/EPB41L5 共高発現が独立した予後不良因子として抽出された（表 14）。

以上の結果から、ARF6-AMAP1 経路が PDAC の浸潤、転移、化学療法抵抗性に中心的な役割を果たし、ARF6-AMAP1 経路の活性化が局所進行膵癌患者の予後不良に直結することが示された。

表 12　OS に関する単変量解析結果

変数	単変量解析		
	ハザード比	95% 信頼区間	P 値
年齢 ＜ 67 / ≦ 67	0.951	0.569 - 1.590	0.848
性別 男性 / 女性	1.189	0.700 - 2.020	0.521
CEA (U/mL) 5.0 ≦ / ＜ 5.0	1.684	1.006 - 2.818	**0.0473**
CA19-9 (U/mL) 37.0 ≦ / ＜ 37.0	2.011	1.061 - 3.812	**0.033**
DUPAN-2 (U/mL) ＜ 150 / 150 ≦	1.584	0.930 - 2.696	0.0903
術後治療 有 / 無	1.321	0.620 - 2.816	0.471
腫瘍局在 頭部 / 体尾部	1.434	0.760 - 2.707	0.266
術式 膵頭十二指腸切除 / 尾側膵切除	1.434	0.760 - 2.707	0.266
腫瘍分化度 高～中分化 / 低分化	0.446	0.158 - 1.257	0.127
腫瘍径 2 cm ＜ / ≦ 2 cm	2.846	1.293 - 6.268	**0.00939**
リンパ節転移 陽性 / 陰性	2.085	1.178 - 3.689	**0.0099**
根治切除 無 / 有	2.265	1.082 - 4.742	**0.0307**
p53 過剰発現 / 正常	1.443	0.858 - 2.428	0.168
PDGFRβ 高発現 / 低発現	2.111	1.257 - 3.546	**0.0047**
GEP100 高発現 / 低発現	1.433	0.858 - 2.393	0.170

AMAP1 高発現 / 低発現	2.385	1.389 - 4.096	**0.0016**
EPB41L5 高発現 / 低発現	2.777	1.614 - 4.779	**0.00022**
PDGFRβ・AMAP1・EPB41L5 すべて高発現 / その他	2.860	1.587 - 5.154	**0.00047**
AMAP1・EPB41L5 共に高発現 / その他	2.996	1.726 - 5.201	**0.000096**

表 13 単変量解析で有意差を認めた因子の相関関係（P 値）

	CEA	CA19-9	腫瘍径	リンパ節転移	非根治切除	AMAP1	EPB41L5	PDGFRβ	AMAP1/EPB41L5	AMAP1/EPB41L5/PDGFRβ
CEA	×	0.065	0.206	0.457	0.263	0.343	0.174	0.0648	0.962	0.521
CA19-9	×	×	0.345	0.855	0.86	0.647	0.856	0.157	0.968	0.788
腫瘍径	×	×	×	0.101	0.573	0.281	0.0692	0.0871	0.0681	0.132
リンパ節転移	×	×	×	×	0.354	0.101	0.821	0.0127	0.0638	0.038
非根治切除	×	×	×	×	×	0.193	0.799	0.722	0.315	0.33
AMAP1	×	×	×	×	×	×	**< 0.001**	**< 0.001**	**< 0.001**	**< 0.001**
EPB41L5	×	×	×	×	×	×	×	**< 0.001**	**< 0.001**	**< 0.001**
PDGFRβ	×	×	×	×	×	×	×	×	**< 0.001**	**< 0.001**
AMAP1/EPB41L5	×	×	×	×	×	×	×	×	×	**< 0.001**
AMAP1/EPB41L5/PDGFRβ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

表 14　OS に関する多変量解析結果

変数	多変量解析		
	ハザード比	95% 信頼区間	P 値
CEA (U/mL) 5.0 ≦ / ＜ 5.0	1.362	0.738 - 2.136	0.4006
CA19-9 (U/mL) 37.0 ≦ / ＜ 37.0	1.374	0.683 - 2.763	0.3729
腫瘍径 2 cm ＜ / ≦ 2 cm	2.407	1.077 - 5.378	**0.03221**
リンパ節転移 陽性 / 陰性	1.690	0.950 - 3.005	0.0742
根治切除 無 / 有	1.955	0.902 - 4.236	0.0894
AMAP1・EPB41L5 共に高発現 / その他	2.650	1.522 - 4.615	**0.000574**

2）*TP53* 変異が EPB41L5 発現を誘導する。

TP53 変異は乳癌や肺癌を初めとする様々な癌の間葉系形質誘導に関わることが報告されている（Mizuno et al., 2010; Yang et al., 2014）。同様に MIAPaCa-2 および KPC でも *shTP53* により EPB41L5 発現が明らかに減少した（図 8A）。次に、EPB41L5 発現と *TP53* 変異との関係を免疫組織学的に検討した。野生型 *TP53* 発現下で EPB41L5 を高発現する可能性がある間質細胞や腫瘍関連線維芽細胞などを除外して解析した。組織学的な EPB41L5 高発現は p53 高発現と正の相関関係を認めた（図 8B）。腫瘍細胞における p53 高発現は、多くの場合 *TP53* のミスセンス変異の存在を意味する（Soussi et al., 2001）という研究結果と矛盾しない。以上の結果から、PDAC では *TP53* 変異が EPB41L5 高発現の原因であることが示唆された。また、ZEB1 は乳癌細胞において EPB41L5 発現を誘導する主要な転写因子である（Hashimoto A., et al., 2016b）。図 8A に示す如く、*shTP53* が ZEB1 発現を明らかに減弱させた。また、*shZEB1* が EPB41L5 発現を大きく減じることが判明した（図 8C）。

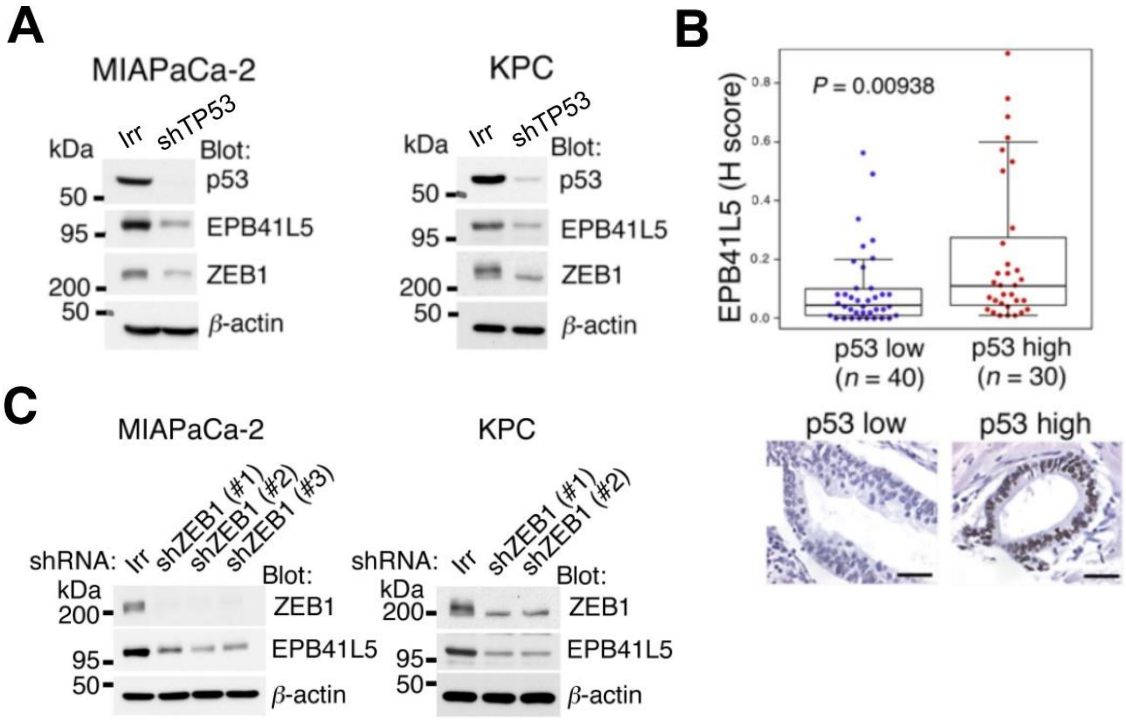
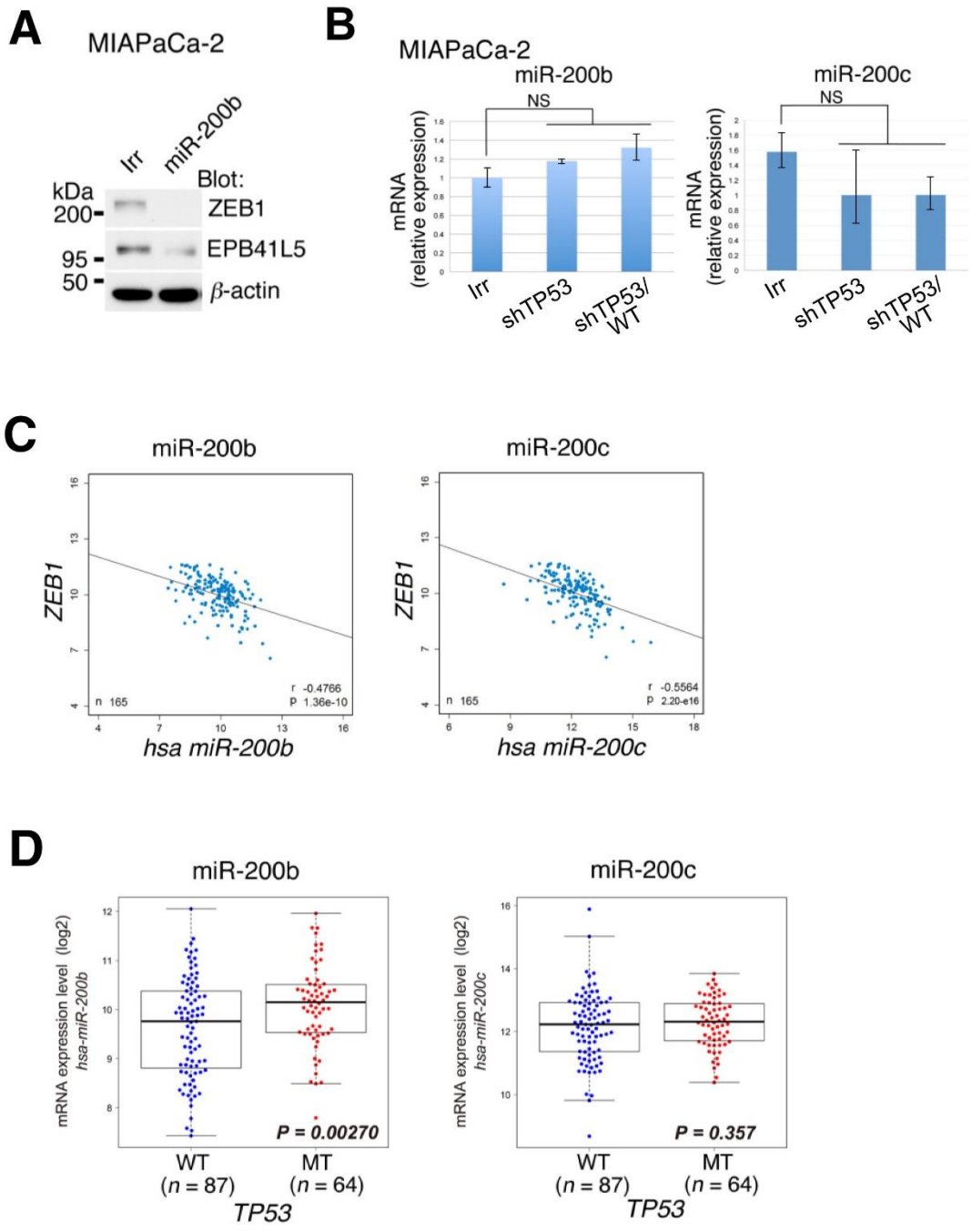


図 8 *shTP53* と *shZEB1* による EPB41L5 発現の変化と膵癌組織中の EPB41L5 発現量と p53 発現の相関

（A）*TP53* shRNA（#1）もしくは *Irr* shRNA をトランスフェクションした MIAPaCa-2 および KPC における EPB41L5 および ZEB1 蛋白発現。*shTP53* により EPB41L5 および ZEB1 発現が抑制された。（B）ヒト膵癌組織における p53 の過剰発現の有無と EPB41L5 発現量の関係を箱ひげ図で示す（n=70）。p53 過剰発現と EPB41L5 高発現が相関する。p53 染色の代表的な組織像を下段に示す（スケールバー：100 μm）。（C）MIAPaCa-2 *shZEB1* および KPC *shZEB1* における EPB41L5 蛋白発現。*shZEB1* により EPB41L5 発現が抑制された。

一方、野生型 p53 蛋白がいくつかの microRNA（以下、miRNA）を誘導し、*ZEB1* を抑制することが他の癌腫で報告されている（Chang et al., 2011; Kim et al, 2011）。PDAC では *miR-200* により *ZEB1* が抑制されることがわかっている（Wellner et al., 2009）。実際、MIAPaCa-2 では *miR-200b* の外因性発現により ZEB1 および EPB41L5 発現が抑制された（図 9A）。しかし、変異型 *TP53* をノックダウンし、野生型 *TP53* を発現させた MIAPaCa-2（*shTP53/WT*）では *miR-200b* や *miR-200c* は誘導されなかった（図 9B）。さらに、TCGA RNAseq dataset では、*ZEB1* と *miR-200b* および *miR-200c* の発現量に負の相関を認めるが（図 9C）、miRNA 発現と野生型 *TP53* の間には、変異型 *TP53* と比較して、正の相関を認めなかった（図 9D）。また、この dataset から *EPB41L5* mRNA と *ZEB1* mRNA の発

現量には正の相関を認めるが、他の転写因子である *TWIST* や *SNAI* とはそのような相関を認めないことがわかった（図 9E)。以上のように、ZEB1 は EPB41L5 を誘導する主要な転写因子であることが明らかとなったが、他の癌腫で報告されているような p53-miRNA-ZEB1 といった直接的な関連を PDAC では証明できなかった。



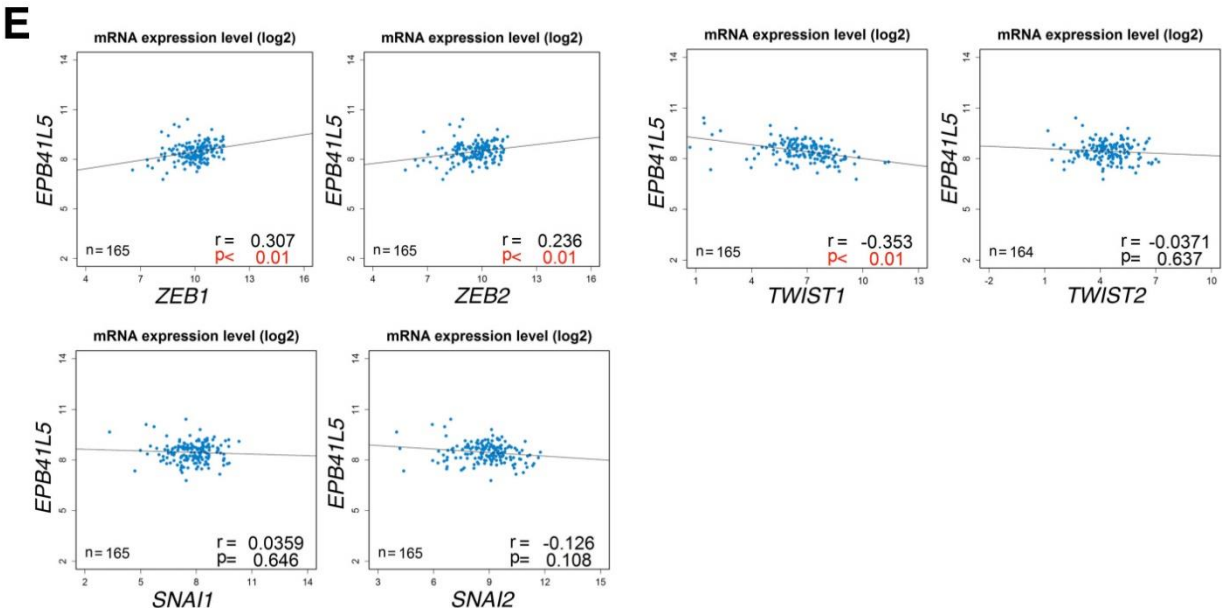


図 9　*miR-200b*、*miR-200c* 発現と *TP53*、*ZEB1*、*EPB41L5* との関係

（A）*pre-miR-200b* をトランスフェクションし、72 時間培養した MIAPaCa-2 における ZEB1 および EPB41L5 蛋白発現。*miR-200b* 発現により ZEB1 および EPB41L5 発現が抑制された。（B）MIAPaCa-2 *shTP53*、*shTP53* に野生型 *TP53* を発現させた MIAPaCa-2（*shTP53/WT*）、Irr shRNA をトランスフェクションした MIAPaCa-2（*Irr*）における *miR-200b* および *miR-200c* 発現量。*miR-200b* および *miR-200c* の発現量は *TP53* ステータスに有意な影響を受けなかった（NS：not significant）。（C）*ZEB1* mRNA 発現量と *miR-200b* および *miR-200c* 発現量の関係を TCGA RNAseq dataset から解析（n =165）。*ZEB1* と *miR-200b* および *miR-200c* の発現量に負の相関を認めた。（D）*miR-200b* および *miR-200c* 発現量を *TP53* 野生型（WT）と *TP53* 変異型（MT）で比較（n=151）。*miR-200b* 発現量と *TP53* 変異型に相関を認めた。一方、*miR-200c* にはそのような相関を認めなかった。（E）*EPB41L5* mRNA 発現量と *ZEB1*、*ZEB2*、*TWIST1*、*TWIST2*、*SNAI1*、*SNAI2* mRNA 発現量の相関（n=165）。*ZEB1* および *ZEB2* と *EPB41L5* 発現に正の相関を認めた。*TWIST1* と *EPB41L5* 発現に負の相関を認めた。それ以外の転写因子発現量と *EPB41L5* 発現量に相関を認めなかった。

3）MVP は PDGFR による ARF6 活性化に重要な役割を果たしている。

乳癌細胞では EGFR による ARF6 活性化に MVP の活性化に加えて、GGT-II および RAB11b の働きが必要であることが報告されている（Morishige et al., 2008; Sabe et al., 2009; Hashimoto A., et al., 2016a）。また、*TP53* 変異による持続的な MVP 活性化が EGFR による ARF6 活性化を促進することも判明している（Freed-Pastor et al., 2012; Hashimoto A., et al., 2016a）。*GGT-II* および *RAB11b* に対する siRNA を

MIAPaCa-2 にトランスフェクションし、その効果をウェスタンブロット法で確認した（図 10A）。また、細胞増殖能は *siGGT-II*、*siRAB11b* により有意な影響を受けないことを併せて確認した（図 10B）。MIAPaCa-2 において *siGGT-II*、*siRAB11b* により PDGF-BB 刺激依存的な ARF6 活性化が阻害され、マトリゲル浸潤活性が抑制されることが判明した（図 10C、D）。また、*siGGT-II*、*siRAB11b* により Gemcitabine に対する感受性が有意に改善した（図 10E）。

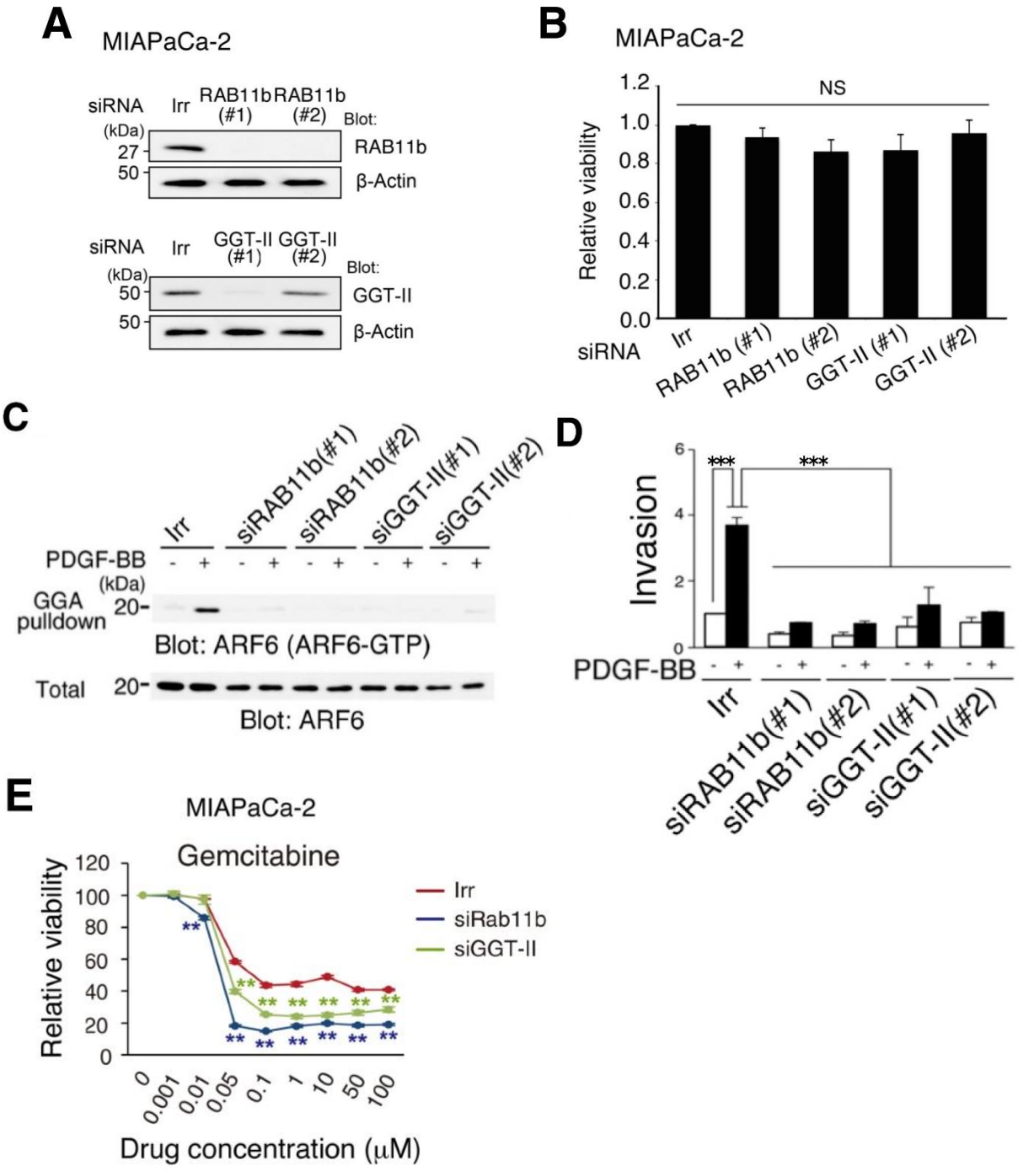
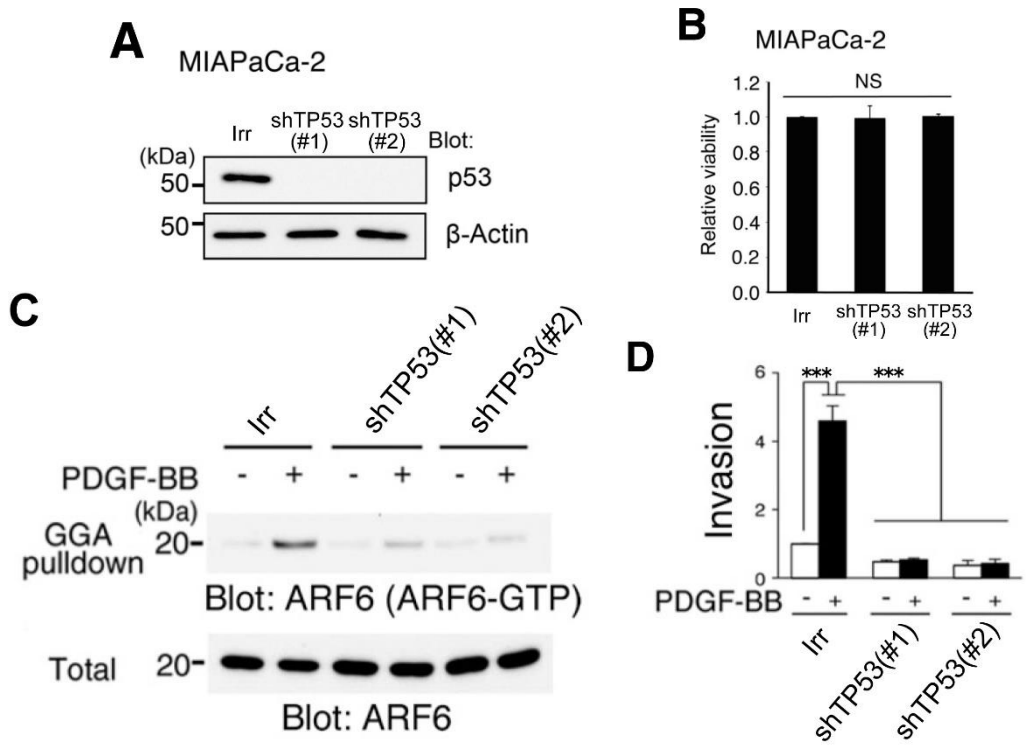


図 10　*siRAB11b*、*siGGT-II* が ARF6 活性化、浸潤、化学療法感受性に及ぼす影響

（A）MIAPaCa-2 *siRAB11b*、*siGGT-II* における、siRNA の効果を評価し、有効であることを確認した。それぞれ塩基配列の異なる 2 種類の siRNA を使用した。(B) MIAPaCa-2 *siRAB11b*、*siGGT-II* の細胞増殖率を、Irr を 1.0 としたときの比で表した。*siRAB11b* および *siGGT-II* は細胞増殖に有意な影響を与えなかった。（C、D）*siRAB11b* および *siGGT-II* による PDGF-BB 刺激依存的な ARF6 活性化阻害（C）と細胞浸潤活性阻害（D）を、それぞれ GST-GGA pulldown とマトリゲル浸潤アッセイで評価。*siRAB11b*、*siGGT-II* により ARF6 活性化は抑制され、細胞浸潤活性が低下した（＊＊＊: P＜0.001）。(E) MIAPaCa-2 *Irr*、*siRAB11b*、*siGGT-II* に、Gemcitabine、5-Fluorouracil、Oxaliplatin、Irinotecan のいずれかを添加し、細胞増殖率を比較。薬剤を添加しない場合の増殖率を 100 とした際の、薬剤添加時の増殖率を比で表した。青の＊は *Irr* と *siRAB11b* の比較、緑の＊は *Irr* と *siGGT-II* の比較（＊：P < 0.05、＊＊：P < 0.01）。

次に、*TP53* に対する shRNA を MIAPaCa-2 にトランスフェクションし、有効であることを確認した（図 11A）。また、細胞増殖能は *shTP53* により有意な影響を受けないことが判明した（図 11B）。*siGGT-II* および *siRAB11b* と同様に *shTP53* でも PDGF-BB 刺激依存的な ARF6 活性化とマトリゲル浸潤活性が抑制された（図 11C、D）。一方、*KRAS* 変異型かつ *TP53* 野生型である Capan-2 では PDGF-BB 刺激による ARF6 活性化を認めず、*siARF6* および *siAMAP1* による浸潤能抑制も認めなかった（図 11E、F）。Capan-2 の増殖能は *siARF6* および *siAMAP1* の影響を受けないことが判明した（図 11G）。



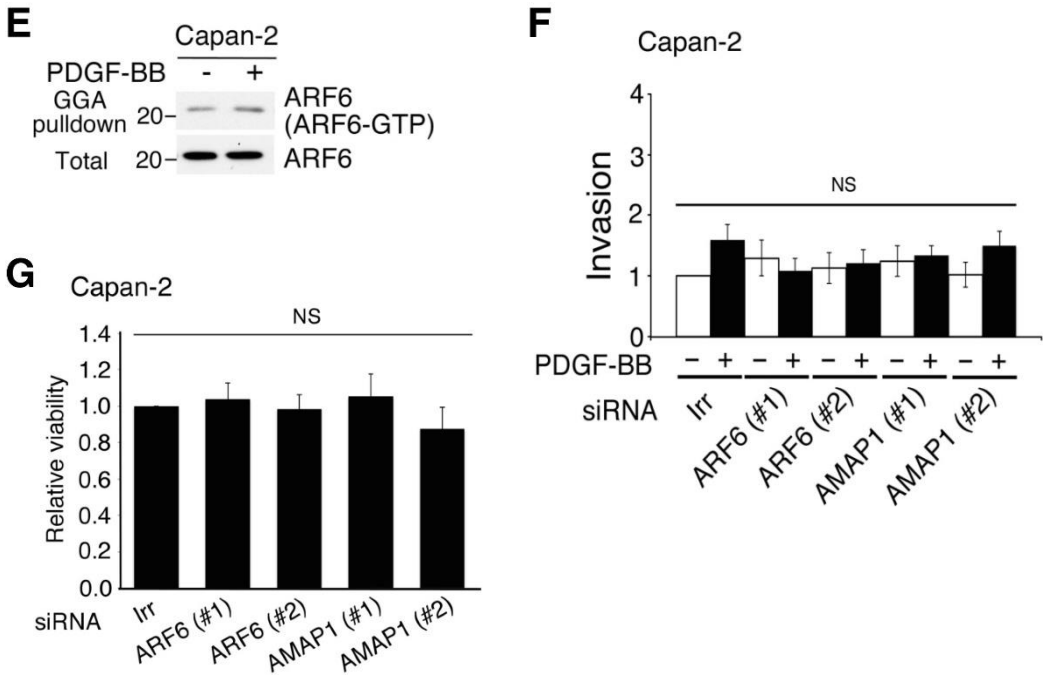


図 11 *shTP53* が ARF6 活性化、浸潤活性に及ぼす影響

（A）MIAPaCa-2 *shTP53* における、shRNA の効果を評価し、有効であることを確認した。それぞれ塩基配列の異なる 2 種類の shRNA を使用した。（B）MIAPaCa-2 *shTP53* の細胞増殖率を、Irr を 1.0 としたときの比で表した。*shTP53* は細胞増殖に有意な影響を与えなかった。(C) *shTP53* による PDGF-BB 刺激依存的な ARF6 活性化阻害（C）と細胞浸潤活性阻害（D）を、それぞれ GST-GGA pulldown とマトリゲル浸潤アッセイで評価。*shTP53* により ARF6 活性化は抑制され、細胞浸潤活性が低下した（＊＊＊：P＜0.001）。（E、F）Capan-2 における PDGF-BB 刺激による ARF6 活性化と浸潤活性を評価。PDGF-BB 刺激依存的な ARF6 活性化や浸潤活性増強を認めず、*siARF6* および *siAMAP1* による浸潤活性低下も認めない（NS: not significant）。(G) Capan-2 *siARF6*、*siAMAP1* の細胞増殖率を、Irr を 1.0 としたときの比で表した。*siARF6* および *siAMAP1* は細胞増殖に有意な影響を与えなかった（NS: not significant）。

さらに、MVP 阻害薬である Simvastatin で MIAPaCa-2 を処理しても *siRAB11b*、*siGGT-II*、*shTP53* と同様に、細胞増殖に影響を有意な影響を与えず、ARF6 活性化が阻害され、浸潤活性が減弱し、化学療法感受性が上昇した（図 12A～D）。以上から、乳癌細胞と同様に、MIAPaCa-2 では *TP53* 変異により RTK を介した ARF6-AMAP1 経路活性化が促進する可能性が示唆された。また、その活性化に MVP 活性化と GGT-II、RAB11b が必須であると考えられた。

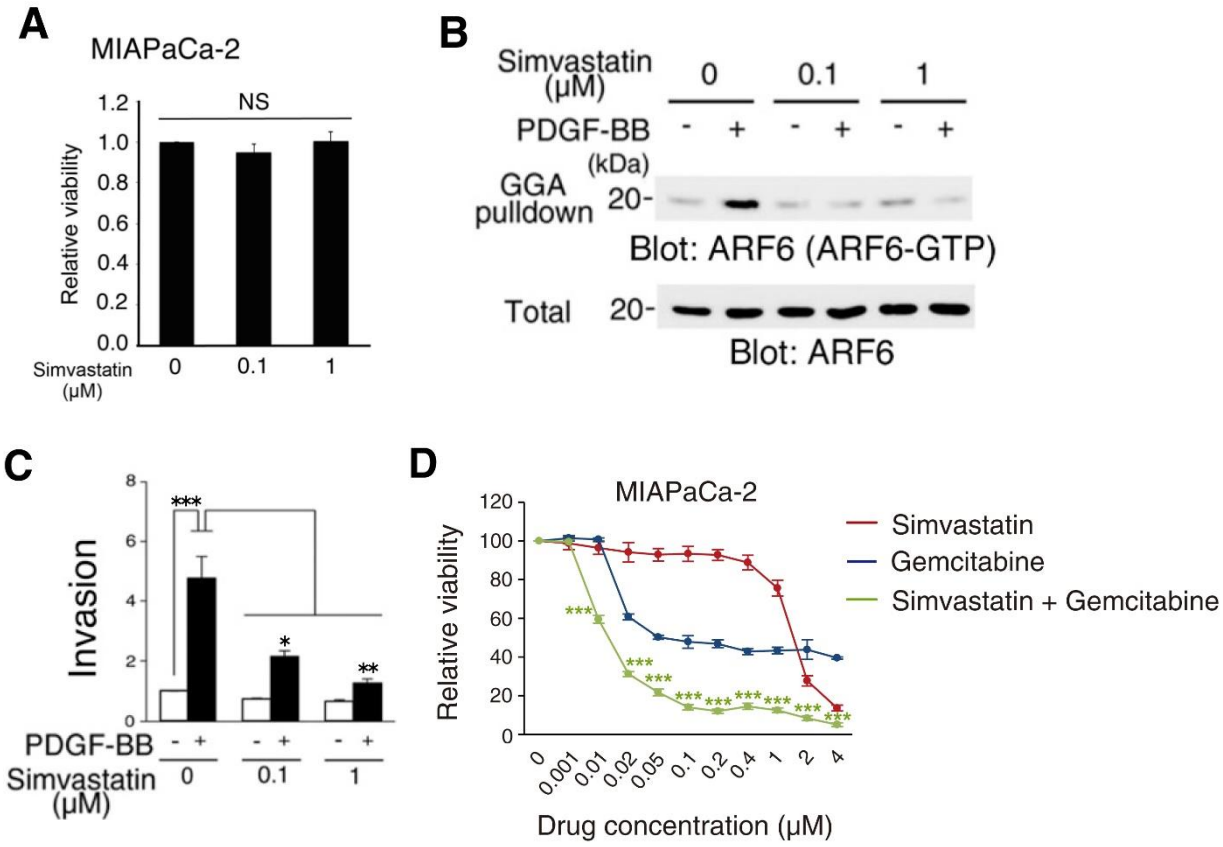


図 12 MIAPaCa-2 に対する Simvastatin の効果

(A) MIAPaCa-2 に Simvastatin を 0.1 μM もしくは 1.0 μM で添加した際の細胞増殖率を、Simvastatin を添加しない場合の細胞増殖率を 1.0 とした際の比として示した。Simvastatin は細胞増殖に有意な影響を与えなかった（NS: not significant）。（B、C）*shTP53* による PDGF-BB 刺激依存的な ARF6 活性化阻害（B）と細胞浸潤活性阻害（C）を、それぞれ GST-GGA pulldown とマトリゲル浸潤アッセイで評価。Simvastatin 添加により ARF6 活性化は抑制され、細胞浸潤活性が低下した（＊: P＜0.05、＊＊: P＜0.01、＊＊＊: P＜0.001）。(D) MIAPaCa-2 の培養上清に Simvastatin 単独、Gemcitabine 単独、Simvastatin と Gemcitabine の両方を種々の濃度で添加した際の細胞増殖率を、薬剤添加しない際の細胞増殖率を 100 とした際の比で表した。Gemcitabine 単独と Simvastatin・Gemcitabine 併用の増殖率の差を統計学的に解析した。Simvastatin 併用により Gemcitabine の抗癌作用が増強した（＊＊＊：P＜0.001）。

考察

本研究では、PDAC において *TP53* 発癌性変異により ARF6-AMAP1 経路が活性化され、浸潤性、転移性、化学療法抵抗性を促進することを示した。膵発癌過程において *KRAS* 変異に引き続き起こる *TP53* 変異が PDGFRβ による ARF6 活性化を惹起すると同時に MVP を活性化させることで、ARF6 活性化を補助する（図13）。本研究から、PDAC は発癌過程ですでに浸潤性・転移性・化学療法抵抗性を発揮する潜在能力を持つこと、AMAP1 および EPB41L5 が PDAC の予後予測因子として有用であることが示唆された。

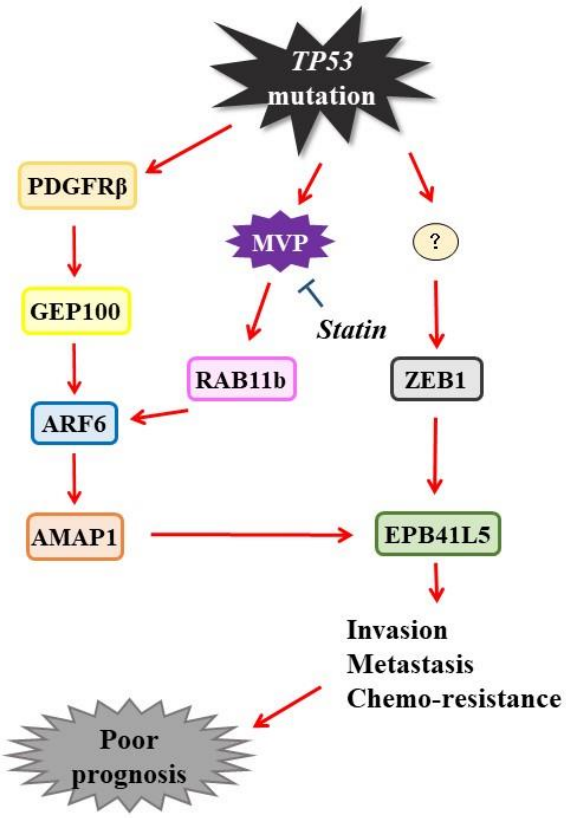


図 13 *TP53* 変異に起因する ARF6-AMAP1 経路を介した PDAC 悪性度進展モデル

TP53 変異は PDGFRβ と MVP の発現を増加させることで、RTK による ARF6 活性化を促進する。RTK による ARF6 の活性化には、ARF6 の細胞膜への輸送に必要な RAB11b の翻訳後修飾のために MVP 活性は必須である。EPB41L5 は ZEB1 により発現が誘導される。*TP53* 変異が ZEB1、EPB41L5 を誘導しうるが、PDAC ではこのリンクの分子基盤は複雑であり、miRNA による単純な仲介ではない。ARF6-AMAP1 経路は、EPB41L5、PRKD2 やその他の蛋白と AMAP1 との相互作用により癌細胞の運動性を制御し、また、β1-initegrin や E-cadherin の細胞内移動を促進するた

めに必要である。ARF6-AMAP1 経路活性化により癌細胞は浸潤性、転移性、化学療法抵抗性を獲得し、予後不良の原因となる。スタチン系薬剤は MVP 阻害により ARF6-AMAP1 経路活性化を抑制する。

EPB41L5 高発現と PDAC 患者の予後不良との密接な関係を示した本研究結果により、EMT が癌悪性度進展に重要であるという通説が確認された。また、EPB41L5 が PDAC 細胞の浸潤、転移および化学療法抵抗性を促進することを示した。ZEB1 を介して EPB41L5 の発現が誘導されるメカニズムについて検討した結果、*TP53* 変異が ZEB1-EPB41L5 連関の誘導に非常に重要であることを示すことができたが、それと同時に、*TP53* 変異が ZEB1 発現を誘導する経路は、乳癌細胞で証明されたような p53-miRNA-ZEB1 といった単純な経路ではないことも確認された（Hashimoto A., et al., 2016b; Handa et al., 2018）。したがって、本研究では EPB41L5 や、それと関連する間葉系の特性が PDAC で出現する正確なメカニズムを解明することはできなかった。

乳癌では EGFR や HER2 といった RTK の過剰発現が乳癌における主要なリスク因子であることが言われている（Yarden et al., 2012）。一方、多くの PDAC で RTK の下流に位置する *KRAS* の恒常活性型変異を認めるにも関わらず、PDGFRβ の過剰発現がリスク因子になると報告されているが（Weissmueler et al., 2014）、理由については明らかにされていない。本研究では PDAC 細胞で PDGFR が GEP100 を介して ARF6 を活性化することを示した。この結果は PDGFR の過剰発現が ARF6-AMAP1 経路を過剰に活性化させることで、PDAC のリスク因子になりうることを示している。さらに、GEP100 は他の RTK にも結合することが他の癌腫で報告されている（Menju et al., 2011; Hashimoto et al., 2011; Hashimoto et al., 2016a）。それゆえ、もし癌細胞が *KRAS* 変異を伴っていたとしても MVP 活性を増強する能力があれば、PDGFR 以外の RTK の過剰発現も PDAC のリスク因子になりうる。実際、EGFR の過剰発現が PDAC の予後不良と癌進行に関連することが報告されている（Xiong, 2004; Ueda et al, 2004）。現時点で、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の Erlotinib が Gemcitabine 単剤療法に対する上乗せ効果が臨床試験で確認された唯一の分子標的治療薬であるが、生存期間中央値で 0.3 ヶ月程度の上乗せ効果が認められたのみである（Moore et al., 2007）。やはり単純な受容体阻害薬では、下流の *RAS* や *TP53* が関わるシグナル伝達が持続するため顕著な治療効果が得られない可能性がある（Han et al., 2006）。

本研究では ARF6-AMAP1 経路が膵癌細胞の化学療法抵抗性に関与することが示したが、そのメカニズムの詳細については追求できなかった。化学療法剤は作用機序からアルキル化薬、代謝拮抗薬、白金製剤、トポイソメラーゼ阻害剤、

抗癌性抗生物質、微小管作用薬に分けられる。今回使用した Gemcitabine および 5-Fluorouracil は代謝拮抗薬、Oxaliplatin は白金製剤、Irinotecan はトポイソメラーゼ阻害剤に分類される。細かな機序は異なるが、いずれも正常な細胞分裂を阻害することで、癌細胞をアポトーシスに誘導する点は共通している。化学療法剤によるアポトーシスの誘導過程で主にミトコンドリア由来の活性酸素種が関連することが報告されている（Varbiro et al., 2001; Murata et al., 2004）。癌細胞では活性酸素種に対する耐性を持つことが化学療法抵抗性に寄与することが示唆されている（Liou et al., 2010; Gorrini et al., 2013; Sullivian et al., 2014; Panieri et al., 2016）。通常、ミトコンドリアは細胞核周囲に密集し、ひとつのミトコンドリアで発生した活性酸素種が近傍のミトコンドリアに次々に伝播していくことで細胞内の活性酸素種が増幅し、細胞死に至ると考えられているが（Zorov et al., 2000; Park et al., 2011; Zorov et al. 2014）、乳癌細胞株を用いた研究では、ARF6-AMAP1 経路の活性化によりミトコンドリアが細胞内に分散し、活性酸素種の増幅を抑制することで放射線療法抵抗性を獲得することが報告されている（Onodera et al., 2018）。膵癌の化学療法抵抗性についても同様の機序が予想される。

本研究で示したとおりスタチンは、ARF6 活性化を阻害することで PDAC 細胞の浸潤性を抑制し、化学療法抵抗性を改善する。スタチンによる転移抑制効果については今回の研究では直接的には証明できていないが、その効果は乳癌細胞を用いた動物実験で証明されている（Hashimoto A., et al., 2016a）。スタチンの制癌作用は基礎研究レベルで他の癌腫でも認められ、スタチン単独治療や化学療法・放射線療法との併用に関する臨床試験が行われている。その結果、スタチン単独治療はどの癌腫でも有効ではないことが示唆されている（Thibault et al., 1996; Kim et al., 2001）。一方、化学療法・放射線療法との併用についてはスタチンの上乗せ効果が一部の癌腫で報告されているが（Kawata et al., 2001; Katz et al., 2005; Kollmeier et al., 2011）、いずれも後方視的研究であり、エビデンスレベルは高くない。膵癌については、スタチン単独治療は倫理的に問題があり、報告がない。局所進行または遠隔転移を有する膵癌に対する Gemcitabine 単剤と Gemcitabine と Simvastatin の併用を比較した無作為 2 重盲検第Ⅱ相試験では、スタチンの上乗せ効果は否定された（Hong et al., 2014）。このネガティブな結果にはいくつかの理由が考えられる。ひとつめは研究デザインの問題である。本研究結果から、スタチンは *TP53* 変異により MVP 活性が亢進し、ARF6-AMAP1 経路が活性化された患者に最も効果が現れると予想される。したがって、ARF6-AMAP1 経路が活性化された患者をあらかじめ選別し、これを治療群と偽薬群に群分けした臨床研究が必要と考えられる。ふたつめにスタチンそのものの問題である。現在臨床で使用されているスタチンの多くは、肝臓に選択的に集積し、

他の腹部臓器にはほとんど分布しないことが動物実験で明らかになっている（Duggan, et al. 1989; Vickers, et al. 1990; Nezasa, et al. 2002）。また、Simvastatin 5mg（常用量）の内服で 3.3nM 程度の血中濃度になるが（陶、2003）、図 12D に示すように 10nM 以上で Gemcitabine との併用効果が現れるため、常用量の内服では効果が得られないと考えられる。したがって、有効な濃度のスタチンを膵臓に供給するドラッグデリバリーシステムの構築か、膵臓に分布するスタチンの開発が必要である。

PDAC の根治には適切なリンパ節郭清を伴った外科的切除が最低限必要であるにも関わらず、初診断時、80 %以上の PDAC 患者が局所進行または遠隔転移により切除不能である。また、根治切除を施行されても高率に再発を来すことから、術前・術後化学療法の効果次第で予後が左右されると言っても過言ではない。スタチン系薬剤を術前化学療法と併用することで、腫瘍縮小効果を増強し、初診断時、切除不能と診断された患者を切除可能にできるか、切除可能患者の根治切除率を上げることができるか、また、術後化学療法と併用することで再発率を低下させ、OS および DFS を延長できるかについては、膵癌組織に有効な濃度のスタチンが分布するシステムを構築し、適切な群分けを伴った臨床試験で明らかにする必要がある。

総括および結論

本研究から得られた新知見は以下の(1)～(3)の通りである。

（1）PDAC 発癌過程で起こる *TP53* 変異により、PDGFRβ シグナリングおよび MVP 活性化を介して ARF6 が活性化し、ARF6-AMAP1 経路を駆動する。また、転写因子 ZEB1 が誘導され、EPB41L5 蛋白発現が促進する。その結果、膵癌細胞の浸潤性、転移性、化学療法抵抗性が増強する。

（2）膵癌患者から得た切除標本中の AMAP1 かつ EPB41L5 の高発現は、膵切除後の独立した予後不良因子である。

（3）MVP を阻害する Simvastatin により ARF6-AMAP1 経路活性化は抑制され、その結果、膵癌細胞の浸潤性、転移性、化学療法抵抗性が減弱する。

本研究により、PDAC では ARF6-AMAP1 経路により「発癌」と浸潤、転移、化学療法抵抗性を初めとする「悪性度増強」が同時に進行することを見いだした。これは膵癌の悪性度増強メカニズムを体系的に説明する極めて重要な知見である。

PDAC は初診断時、80%以上の症例が局所進行や遠隔転移のため切除不能である。多くの症例は延命を目的とした化学療法を施行するが、年単位の生存は困難である。近年、初診断時切除不能である症例で、化学療法により切除可能となる症例が増加しているが、再発率が高く、大幅な予後改善を認めていない。このような患者に化学療法剤とスタチンを併用することにより、腫瘍縮小効果が上昇し、かつ、周囲組織への浸潤や遠隔転移を抑制することで、初診断時切除不能症例でも根治切除可能となる症例が増加する可能性がある。ただし、スタチンは ARF6-AMAP1 経路が活性化している症例でより強く効果が現れると考えられるため、化学療法導入前に生検検体の免疫組織染色で AMAP1 および EPB41L5 が過剰発現しているかを確認する必要がある。また現在、薬事承認されているスタチンは、内服後その大半が肝臓に集積し、膵臓にはほとんど分布しないことが判明している。したがって、有効な濃度のスタチンを膵臓に供給するドラッグデリバリーシステムの構築か、膵臓に集積するスタチンの開発が必要である。これらの問題を解決した上で、臨床試験を行い、スタチンの上乗せ効果のエビデンスを構築することが求められる。

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外科学講座消化器外科学分野Ⅱ（現、北海道大学大学院医学研究院外科学分野消化器外科学教室Ⅱ）平野 聡 教授、並びに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（現、北海道大学大学院医学研究院生化学分野分子生物学教室）佐邊 壽孝 教授に深く感謝致します。研究全般にわたり直接御指導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（現、北海道大学大学院医学研究院生化学分野分子生物学教室）橋本 茂 准教授（現職、大阪大学免疫学フロンティア研究センター免疫機能統御学 准教授）並びに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（現、北海道大学大学院医学研究院生化学分野分子生物学教室）橋本 あり 助教に深く御礼申し上げます。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医学研究科外科学講座消化器外科学分野Ⅱ（現、北海道大学大学院医学研究院外科学分野消化器外科学教室Ⅱ）の皆様、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（現、北海道大学大学院医学研究院生化学分野分子生物学教室）の皆様、また、膵癌切除検体を御提供いただいた患者様に心より感謝致します。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Agarwal, B., Bhendwal, S., Halmos, B., Moss, S.F., Ramey, W.G., Holt, P.R. (1999). Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. Clin. Cancer Res. *5*, 2223-2229.

Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., DePinho, R.A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. Genes. Dev. *17*, 3112-3126.

Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K.F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J.L., Gallick, G.E., Logsdon, C.D., McConkey, D.J., Choi, W. (2009). Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. Cancer Res. *69*, 5820-5828.

Bardeesy, N., Aguirre, A.J., Chu, G.C., Cheng, K.H., Lopez, L.V., Hezel, A.F., Feng, B., Brennan, C., Weissleder, R., Mahmood, U. et al. (2006). Both p16 (Ink4a) and the p19 (Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *103*, 5947-5952.

Bryant, K.L., Mancias, J.D., Kimmelman, A.C., Der, C.J. (2014). KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. Trends Biochem. Sci. *39*, 91-100.

Butturini, G., Stocken, D.D., Wente, M.N., Jeekel, H., Klinkenbijl, J.H., Bakkevold, K.E., Takeda, T., Amano, H., Dervenis, C., Bassi, C., et al. (2008). Influence of resection margins and treatment on survival in patients with pancreatic cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. Arch. Surg. *143*, 75-83.

Chang, C.J., Chao, C.H., Xia, W., Yang, J.Y., Xiong, Y., Li, C.W., Yu, W.H., Rehman, S.K., Hsu, J.L., Lee, H.H., et al. (2011). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. Nat. Cell Biol. *13*, 317-323.

Dimitroulakos, J., Thai, S., Wasfy, G.H., Hedley, D.W., Minden, M.D., Penn, L.Z. (2000). Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid

leukemias. Leuk. Lymphoma *40*, 167-178.

Donaldson JG. (2003). Multiple roles for Arf6: Sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. J. Biol. Chem. *278*, 41573-41576.

Donaldson, J.G., Jackson, C.L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 362-375.

Donghui, L., Keping, X., Robert, W., James, L.A. (2004). Pancreatic cancer. Lancet *363*, 1049-1057.

Duggan, D.E., Chen, I.W., Bayne, W.F., Halpin, R.A., Duncan, C.A., Schwartz, M.S., Stubbs, R.J., Vickers, S. (1989). The physiological disposition of lovastatin. Drug Metab. Dispos. *17*, 166-173.

Feleszko, W., Mlynarczuk, I., Balkowiec-Iskara, E.Z., Czajka, A., Switaj, T., Giermasz, A., Jakobisiak, M. (2000). Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cadiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice. Clin. Cancer Res. *6*, 2044-2052.

Freed-Pastor, W.A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerod, A., Moon S.H., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., et al. (2012). Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. Cell *148*, 244-258.

Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W. (2013). Nodulation of oxidative stress as an anticancer strategy. Nat. Rev. Drug Discov. *12*, 931-947.

Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. Cancer Cell *4*, 111-120.

Han, S.W., Kim, T.Y., Jeon, Y.K., Hwang, P.G., Im, S.A., Lee, K.H., Kim, J.H., Kim, D.W., Heo, D.S., Kim, N.K., et al. (2006). Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor

mutation, K-ras mutationm and Akt phosphorylation. Clin. Cancer Res. *12*, 2538-2544.

Handa, H., Hashimoto, A., Hashimoto, S., Sugino, H., Oikawa, T., Sabe, H. (2018). Epithelial-specific histone modification of the miR-96/182 locus targeting AMAP1 mRNA predisposes p53 to suppress cell invasion in epithelial cells. Cell Commun. Signal *16*, 94.

Hashimoto, A., Hashimoto, S., Ando, R., Noda, K., Ogawa, E., Kotani, H., Hirose, M., Menju, T., Morishige, M., Manabe, T., et al. (2011). GEP100-Arf6-AMAP1-Cortactin Pathway Frequently Used in Cancer Invasion Is Activated by VEGFR2 to Promote Angiogenesis. PLoS One *6*, e23359.

Hashimoto, A., Oikawa, T., Hashimoto, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Otsuka, Y., Handa, H., Onodera, Y., Nam, J.M., Oneyama, C., et al. (2016a). P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. J. Cell Biol. *213*, 81-95.

Hashimoto, A. Hashimoto, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Onodera, Y., Handa, H., Oikawa, T., Sabe, H. (2016b). ZEB1 induces EPB41L5 in the cancer mesenchymal program that drives ARF6-based invasion, metastasis and drug resistance. Oncogenesis *5*, e259.

Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A., Sabe, H. (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *101*, 6647-6652.

Hashimoto, S., Hashimoto, A., Yamada A., Onodera, Y., Sabe, H. (2005). Assays and Properties of the ArfGAPs, AMAP1, and AMAP2, in Arf6 Function. Methods Enzymol. *404*, 216-231.

Hashimoto, S., Mikami, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Hashimoto, A., Onodera, Y., Furukawa, S., Handa, H., Oikawa, T., Okada, Y., et al. (2016). Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. Nat. Commun. *7*, 10656.

Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. N. Engl. J. Med. *362*, 1605-1617.

Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Marita, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. Cancer Cell *4*, 437-450.

Hirano, M., Hashimoto, S., Yonemura, S., Sabe, H., Aizawa, S. (2008). EPB41L5 functions post- transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. J. Cell Biol. *182*, 1217-1230.

Hong, J.Y., Nam, E.M., Lee, J., Park, J.O., Lee, S.C., Song, S.Y., Choi, S.H., Heo, J.S., Park, S.H., Lim, H.Y., et al. (2014). Randomized double-blinded, placebo-controlled phase II trial of simvastatin and gemcitabine in advanced pancreatic cancer patients. Cancer Chemother. Pharmacol. *73*, 125-130.

Hotz, B., Arndt, M., Dullat, S., Bhargava, S., Buhr, H.J., Hotz, H.G. (2007). Epithelial to Mesenchymal Transition: Expression of the Regulators Snail, Slug, and Twist in Pancreatic Cancer. Clin. Cancer Res. *13*, 4769-4776.

Ishibashi, H., Suzuki, T., Suzuki, S., Moriya, T., Kaneko, C., Takizawa, T., Sunamori, M., Handa, M., Kondo, T., Sasano, H. (2003). Sex steroid hormone receptors in human thymoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. *88*, 2309-2317.

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., et al. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. Science *321*, 1801-1806.

Kajita, M., McClinic, K.N., Wada, P.A. (2004). Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. Mol. Cell Biol. *24*, 7559-7566.

Kanda Y. (2014). Investigation of the freely-available easy-to-use software “EZR” (Easy R) for medical statistics. Bone Marrow Transplant. *48*, 452-458.

Katz, M.S., Minsky, B.D., Saltz, L.B., Riedel, E., Chessin, D.B., Guillem, J.G. (2005). Association of statin use with a pathologic complete response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. *62*, 1363-1370.

Kawata, S., Yamasaki, E., Nagase, T., Inui, Y., Ito,N., Matsuda, Y., Inada, M., Tamura, S., Noda, S., Imai, Y., Matsuzawa, Y. (2001). Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A ramdomized controlled trial. Br. J. Cancer *84*, 886-891.

Kollmeier, M.A., Katz, M.S., Mak, K., Yamada, Y., Feder, D.J., Zhang, Z., Jia, X., Shi, W., Zelefsky, M.J. (2011). Improved Biochemical Outcomes With Statin Use in Patients With High-Risk Localized Prostate Cancer Treated With Radiotherapy. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. *79*, 713-718.

Kim, T., Veronese, A., Pinchiorri, F., Lee, T.J., Jeon, Y.J., Volinia, S., Pineau, P., Marchio, A., Palatini, J., Suh, S.S., et al. (2011). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. J. Exp. Med. *208*, 875-883.

Kim, W.S., Kim, M.M., Choi, H.J., Yoon, S.S., Lee, M.H., Park, K., Park, C.H., Kang, W.K. (2001). Phase II Study of High-Dose Lovastatin in Patients With Advanced Gastric Adenocarcinoma. Invest. New Drugs *19*, 81-83.

Kinoshita, R., Nam, J.M., Ito, Y.M., Hatanaka, K.C., Hashimoto, A., Handa, H., Otsuka, Y., Hashimoto, S., Onodera, Y., Shimizu, S., et al. (2013). Co-Overexpression of GEP100 and AMAP1 Proteins Correlates with Rapid Local Recurrence after Breast Conservative Therapy. PLoS One *8*, e76791.

Liou, G.Y., Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. Free Radic. Res. *44*, 479-496.

Maitra, A., Adsay, N.V., Argani, P., Lacobuzio-Donahue, C., De, Marzo, A., Cameron, J.L., Yeo, C.J., Hruban, R.H. (2003). Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. Mod. Pathol. *16*, 902-912.

Makohon-Moore, A., Lacobuzio-Donahue, C.A. (2016). Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. Nat. Rev. Cancer *1*6, 553-565.

Menju, T., Hashimoto, S., Hashimoto, A., Otsuka, Y., Handa, H., Ogawa, E., Toda, Y., Wada, H., Date, H., Sabe, H. (2011). Engagement of overexpressed Her2 with GEP100 induces autonomous invasive activities and provides a biomarker for metastases of lung adenocarcinoma. PLos One. *6*, e25301.

Mizuno, H., Spike, B.T., Wahl, G.M., Levine, A.J. (2010). Inactivation of p53 in breast cancers correlates with stem cell transcriptional signatures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *107*, 22745-22750.

Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Au, S.G., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., Campos, D., et al. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase Ⅲ trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J. Clin. Oncol. *25*, 1960-1966.

Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., Wei, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Yano, H., et al. (2008). GEP100 linkes to epidermal growth factor receptor signaling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. Nat. Cell Biol. *10*, 85-92.

Morson, B.C., Dowdon, I.M.P. (1972). Gastrointestinal Pathology. (Oxford: Blackwell Scientific Publications).

Murata, M., Suzuki, T., Midorikawa, K., Oikawa, S., Kawanishi, S. (2004). Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. Free Radic. Biol. Med. *37,* 793-802.

Nakajima, S., Doi, R., Toyoda, E., Tsuji, S., Wada, M., Koizumi, M., Tulachan, S.S., Ito, D., Kami, K., Mori, T., et al. (2004). N-Cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. Clin. Cancer Res. *10*, 4125-4133.

Nezasa, K., Takao, A., Kimura, K., Takaichi, M., Inazawa, K., Koike, M. (2002).

Pharmacokinetics and Disposition of Rosuvastatin, a New 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitor, in Rat. Xenobiotica *32*, 715-727.

Onodera, Y., Hashimoto, S., Hashimoto, A., Morishige, M., Mazaki, Y., Yamada, A., Ogawa, E., Adachi, M., Sakurai, T., Manabe, T., et al. (2005). Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. EMBO J. *24*, 963-973.

Onodera, Y., Nam, J.M., Hashimoto, A., Norman, J.C., Shirato, H., Hashimoto, S., Sabe, H. (2012). Rab5c promotes AMAP1- PRKD2 complex formation to enhance β-1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. J. Cell Biol. *197*, 983-996.

Onodera, Y., Nam, J.M., Sabe, H. (2013). Intracellular trafficking of integrins in cancer cells. Pharmacol. Ther. *140*, 1-9.

Onodera, Y., Nam, J.M., Horikawa, M., Shirato, H., Sabe, H. (2018). Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. Nat. Commun. *9*, 2682.

Panieri, E., Santoro, M.M. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. Cell Death Dis. *7*, e2253.

Park, J., Lee, J., Choi, C. (2011). Mitochondrial network determines intracellular ROS dynamics and sensitivity to oxidative stress through switching inter-mitochondrial messengers. PLoS ONE *6*, e23211.

Pena, C., Garcia, J.M., Silva, J., Garcia, V., Rodriguez, R., Alonso, I., Millan, I., Salas, C., de Herreros, A.G., Munoz, A., et al. (2005). E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correations. Hum. Mol. Genet. *14*, 3361-3370.

Sabe, H. (2003). Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. J. Biochem. *134*, 485-489.

Sabe, H., Hashimoto, S., Morishige, M., Ogawa, E., Hashimoto, A., Nam, J.M., Miura,

K., Yano, H., Onodera, Y. (2009). The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. Traffic *10*, 982-993.

Sadeghi, M.M., Collinge, M., Pardi, R., Bender, J.R. (2000). Simvastatin Modulates Cytokine-Mediated Endothelial Cell Adhesion Molecule Induction: Involvement of an Inhibitory G Protein. J. Immunol. *165*, 2712-2718.

Sato, H., Hatanaka, C.K., Hatanaka, Y., Hatakeyama H, Hashimoto, A., Matsuno, Y., Fukuda, S., Sabe, H. (2014). High level expression of AMAP1 protein correlates with poor prognosis and survival after surgery of head and neck squamous cell carcinoma patients. Cell Commun. Signal *12*, 17.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2017). Cancer statistics. CA. Cancer J. Clin. *67*, 7-30.

Soussi, T., Beroud, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. Nat. Rev. Cancer *1*, 233-240.

Sullivan, L.B., Chandel, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. Cancer Metab. *2*, 17.

Tape, C.J., Ling, S., Dimitriadi, M., Mcmahon, K.M., Worboys, J.D., Leong, H.S., Norrie, I.C., Miller, C.J., Poulogiannis, G., Lauffenburger, D.A., et al. (2016). Oncogenic KRAS Regulates Tumor Cell Signaling via Stromal Reciprocation. Cell *165*, 910-920.

Thibault, A., Samid, D., Tompkins, A.C., Figg, W.D., Cooper, M.R., Hohl, R.J., Trepel, J., Liang, B., Patronas, N.,Venzon, D.J., et al. (1996). Phase I Study of Lovastatin, an inhibitor of the Mevalonate Pathway, in Patients With Cancer. Clin. Cancer Res. *2*; 483-491.

Thierry, J.P., Acloque, H. and Huang, R.Y.J. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transition in Development and Disease. Cell *139,* 871-890.

Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K.,

Watanabe, M. (1999). A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. Anal. Commun. *36*, 47-50.

Uchikado, Y., Natsugoe, S., Okumura, H., Setoyama, T., Matsumoto, M., Ishigami, S., Aikou, T. (2005). Slug expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Clin. Cancer Res. *11*, 1174-1180.

Ueda, S., Ogata, S., Tsuda, H., Kawarabayashi, N., Kimura, M., Sugiura, Y., Tamai, S., Matsubara, O., Hatsuse, K., Mochizuki, H. (2004). The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. Pancreas *29*, e1-8.

Varbiro, G., Veres, B., Gallyas, F., Sumegi, B. (2001). Direct effect of Taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition. Free Radic. Biol. Med. *31,* 548-558.

Vickers, S., Duncan, C.A., Chen, I.W., Rosegay, A., Duggan, D.E. (1990). Metabolic disposition studies on simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug. Drug Metab. Dispos. *18*, 138-145.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H., Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. Lancet *378*, 607-620.

Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., et al. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. Nature *518*, 495-501.

Weissmueller, S., Manchado, E., Saborowski, M., Morris, J.P. 4th., Eagenblast, E., Davis, C.A., Moon, S.H., Pfister, N.T., Tschanharganeh, D.F., Kitzing, T., et al. (2014). Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor signaling. Cell *157*, 382-394.

Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A.,

Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., et al. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. Nat. Cell Biol. *11*, 1487-1495.

Wiemer, A.J., Wiemer, D.F., Hohl, R.J. (2011). Geranylgeranyl disphosphate synthase: an emerging therapeutic target. Clin Pharmacol Ther. *90*, 804-812.

Wong, W.W., Dimitroulakos, J., Minden, M.D., Penn, L.Z. (2002). HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. Leukemia *16*, 508-519.

Xiong, H.Q. (2004). Molecular targeting therapy for pancreatic cancer. Cancer Chemother. Pharmacol *54* Suppl 1, S69-77.

Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R.H., Eshleman, J.R., Nowak, M.A., et al. (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. Nature *467*, 1114-1117.

Yarden, Y., Pines, G. (2012). The ERBB network: At least, cancer therapy meets systems biology. Nat. Rev. Cancer *12*, 553-563.

Yang, Y., Ahn, Y.H., Chen, Y., Tan, X., Guo, L., Gibbons, D.L., Ungeweiss, C., Peng, D.H., Liu, X., Liu, S.H., et al. (2014). ZEB1 sensitizes lung adenocarcinoma to metastasis suppression by PI3K antagonism. J. Clin. Invest. *124*, 2696-2708.

Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., et al. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabokic glucose metabolism. Cell *149*, 656-670.

Zheng, X., Castens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.C., LeBleu, V.S., Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. Nature *527*, 525-530.

Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.O., Zweier, J.L., Sollott, S.J. (2000). Reactive

oxygen specoes (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. J. Exp. Med. *192*, 1001-1014.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., Sollot, S.J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Physiol. Rev. *94*, 909-950.

厚生労働省 (2019). 平成 30 年(2018)人口動態統計(確定数)の概況, p16

陶易王（2003）. シンバスタチン5mg錠の生物学的同等性試験－リポダウン® 錠5とリポバス錠®5の比較－. 医学と薬学. 49巻, 959-964.

日本膵臓学会膵癌取り扱い規約検討委員会 (2016). 膵癌取り扱い規約第7版. (東京都：金原出版).