

第95回 北海道医学大会 プログラム・抄録

Program of the 95th Hokkaido Medical Congress

腫瘍系分科会

(第112回北海道癌談話会例会)

日時：平成27年9月12日(土) 10:00~16:00

会場：北海道大学医学部学友会館「フラテ」

札幌市北区北15条西7丁目

TEL (011) 716-2111

会長：北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野 教授 秋田 弘俊
特別講演

がんのワクチン療法ーサイトカイン毒性の無い免疫増強アジュバントの開発
北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 教授 瀬谷 司

開催期間

総会 平成27年10月3日(土)

分科会 自 平成27年8月29日(土)

至 平成27年11月28日(土)

総会会場 札幌グランドホテル

会 頭 吉 田 晃 敏

主 催 旭 川 医 科 大 学
札 幌 医 科 大 学
北 海 道 大 学 医 学 研 究 科
北 海 道 医 師 会

腫瘍系分科会

(第112回北海道癌談話会例会)

日時：平成27年9月12日(出) 10:00~16:00

会場：北海道大学医学部学友会館「フラテ」
札幌市北区北15条西7丁目

TEL (011) 716-2111

会長：北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野 教授 秋田 弘俊

特別講演

がんのワクチン療法ーサイトカイン毒性の無い免疫増強アジュバントの開発
北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 教授 瀬谷 司

-
1. 講演時間 7分
 2. 討論 3分
 3. プロジェクター 1台使用
 4. 発表形式 PCプレゼンテーション

お問い合わせ

札幌市北区北15条西7丁目
北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野
TEL 011-706-5551

腫瘍系分科会

(第112回北海道癌談話会例会)

日時：平成27年9月12日(土) 10:00~16:00

会場：北海道大学医学部学友会館「フラテ」

札幌市北区北15条西7丁目

TEL (011) 716-2111

会長：北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野 教授 秋田 弘俊

特別講演

がんのワクチン療法—サイトカイン毒性の無い免疫増強アジュバントの開発

北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 教授 瀬谷 司

一般演題1 (10:00~10:50)

座長 榊原 純 (北海道大学大学院呼吸器内科学分野)

1. 非小細胞肺癌におけるHER2及び関連分子異常の観察研究 (HOT1303-A) とHER2陽性非小細胞肺癌に対するトラスツズマブの第II相試験 (HOT1303-B) の進行状況報告

○合田 智宏¹, 木下 一郎¹, 大泉 聡史², 原田 敏之³, 西原 広史⁴, 畑中 豊⁵, 松野 吉宏⁵, 天野 虎次⁷, 佐藤 典宏⁷, 磯部 宏⁸, 田中 伸哉^{4,6}, 西村 正治², 秋田 弘俊¹ (北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野¹, 北海道大学大学院呼吸器内科学分野², 地域医療機能推進機構北海道病院呼吸器センター³, 北海道大学大学院探索病理学講座⁴, 北海道大学病院病理診断科⁵, 北海道大学大学院腫瘍病理学分野⁶, 北海道大学病院臨床研究開発センター⁷, KKR札幌医療センター腫瘍内科⁸)

2. 非小細胞肺癌 (NSCLC) におけるNumb、Musashi1に関する研究

○菊池 創¹, 榊原 純¹, 池澤 靖元¹, 高階 太一¹, 水柿 秀紀¹, 菊地 英毅¹, 菊地 順子¹, 品川 尚文¹, 大泉 聡史¹, 樋田 泰浩², 加賀基知三², 木下 一郎³, 秋田 弘俊³, 西村 正治¹ (北海道大学病院内科¹, 北海道大学病院循環器・呼吸器外科², 北海道大学病院腫瘍内科³)

3. 原発不明癌における分子標的治療の開発を目指したドライバー遺伝子変異解析

○木下 一郎¹, 畑中 豊^{2,3}, 本間 理央¹, 辻 靖⁴, 坂井 和子⁵, 西尾 和人⁵, 田中 里枝⁶, 鈴木 優介⁶, 松野 吉宏^{2,3}, 西原 広史⁷, 秋田 弘俊¹ (北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野¹, 北海道大学病院コンパニオン診断研究部門², 北海道大学病院病理診断科³, KKR札幌医療センター斗南病院腫瘍内科⁴, 近畿大学医学部ゲノム生物学教室⁵, ジェネティックラボ先端医療技術部⁶, 北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座⁷)

4. BH3プロファイリングを用いた進行胃癌における薬剤感受性マーカーの探索及び予後解析

○久保 智洋, 河野 豊, 石川 和真, 村瀬 和幸, 高田 弘一, 佐藤 康史, 佐藤 勉, 宮西 浩嗣, 瀧本 理修, 小船 雅義, 加藤 淳二 (札幌医科大学腫瘍・血液内科)

5. 膠芽腫においてチロシンキナーゼ阻害剤への耐性獲得におけるMSX1の役割

○鈴鹿 淳¹, 津田真寿美¹, 王 磊², 谷野美智枝¹, 木村 太一², 西原 広史², 田中 伸哉^{1,2} (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¹, 北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座²)

一般演題2 (10:50~11:50)

座長 山本 雅大 (旭川医科大学病理学講座腫瘍病理学分野)

6. ヒト大腸癌FFPE検体における、迅速免疫染色装置 (R-IHC) を用いた活性化型Rac1検出技術の開発

○堀尾 瑠奈¹, 津田真寿美¹, 王 磊², 竹浪 智子¹, 谷野美智枝¹, 木村 太一², 西原 広史², 田中 伸哉^{1,2} (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¹, 北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座²)

7. 子宮頸部腺癌におけるタイト結合関連分子の解析

○秋元 太志¹, 高澤 啓², 村田 雅樹², 高澤 久美², 野島 正寛³, 青山 智志², 田中 敏², 小山内 誠², 長谷川 匡⁴, 齋藤 豪¹, 澤田 典均² (札幌医科大学産婦人科学講座¹, 札幌医科大学病理学第二講座², 東京大学医科学研究所附属病院治験センター³, 札幌医科大学病理診断科⁴)

8. 頭頸部扁平上皮癌の悪性化におけるp63依存性タイト結合分子JAM-Aの役割

○角木 拓也^{1,2}, 黒瀬 誠¹, 高野 賢一¹, 近藤 敦¹, 小幡 和史¹, 野村 一顕¹, 宮田 遼¹, 金野 匠², 高橋 駿太², 畠山 翔翼², 幸野 貴之², 氷見 徹夫¹, 小島 隆² (札幌医科大学医学部耳鼻咽喉科学講座¹, 札幌医科大学医学部フロンティア医学研究所細胞科学部門²)

9. TJ構成因子FAKは、ムスカリンM1受容体シグナルを介した腸上皮バリア機能維持や修復の標的となる

○矢澤 隆志, 宇和田淳介, イスラムタリクル, 谷口 隆信 (旭川医科大学学生化学講座細胞制御科学分野)

10. マウス肝発癌モデルにおける腫瘍の形質に対するPI3 kinase経路、Hippo-Yap経路とc-Mycの相互作用の検討

○山本 雅大, 辛 氷, 陳 錫, 藤井 清永, 大塩 貴子, 岡田 陽子, 西川 祐司 (旭川医科大学腫瘍病理)

11. マウス肝腫瘍における代謝状態の変化：肝硬変、非肝硬変モデルの比較プロテオミクス解析

○藤井 清永, 陳 錫, 大塩 貴子, 辛 氷, 岡田 陽子, 山本 雅大, 西川 祐司 (旭川医科大学病理学講座腫瘍病理分野)

休憩 (11:50~13:00)

北海道癌談話会奨励賞授賞式・受賞記念講演 (13:00~13:30)

特別講演 (13:30~14:30)

座長 秋田 弘俊 (北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野)

12. がんのワクチン療法—サイトカイン毒性の無い免疫増強アジュバントの開発

○瀬谷 司, 松本美佐子 (北海道大学大学院医学研究科免疫学分野)

一般演題3 (14:30~15:10)

座長 間石 奈湖 (北海道大学遺伝子制御研究所血管生物学研究室)

13. ヒト膀胱癌微小環境におけるMyeloid-derived suppressor cellsの形成は化学療法により促進される

○武内慎太郎^{1,2}, ムハンマドバグダーディ², 土川 貴裕¹, 和田はるか², 中村 透¹, 七戸 俊明¹, 沼野研一郎², 平野 聡¹ (北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野², 北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物学分野²)

14. 低酸素環境下で増強するヒト悪性胸膜中皮腫細胞の運動・浸潤能におけるHIF1およびMUC1の役割

○項 慧慧¹, ゴウダルジホウマヌ¹, 飯笹 久^{1,2}, 坂田健一郎¹, 樋田 泰浩³, 柳原 五吉⁴, 久保 貴紀⁵, 中川 宏治⁶, 小林 正伸⁷, 入村 達郎⁸, 浜田 淳一¹ (北海道大学遺伝子病制御研究所幹細胞生物学分野¹, 島根大学医学部微生物免疫学講座², 北海道大学病院胸部外科³, 国立がん研究センター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理分野⁴, 安田女子大学薬学部⁵, 北海道大学大学院薬学研究院⁶, 北海道医療大学看護福祉学部⁷, 聖路加国際メディカルセンター医療イノベーション部⁸)

15. Tumor endothelial cell-secreted protein activates a DNA damage response

○AnnanDorcas A.¹, 間石 奈湖¹, 北條 敬之¹, 鳥居 ちさほ¹, Mohammad TAlam¹, HabibaUmma¹, 樋田 泰浩², 樋田 京子¹ (北海道大学遺伝子病制御研究所血管生物学研究室¹, 北海道大学大学院医学研究科循環器・呼吸器外科²)

16. 高転移性腫瘍miRによる血管内皮におけるIL-6を介した薬剤耐性誘導

○鳥居 ちさほ^{1,2}, 秋山 廣輔¹, 川本 泰輔¹, 間石 奈湖¹, Towfik AlamMohammad¹, 鄭 漢忠², 戸塚 靖則³, 進藤 正信³, 樋田 泰浩⁴, 南 敬⁵, 小坂 展慶⁶, 落谷 孝広⁶, 樋田 京子¹ (北海道大学遺伝子病制御研究所血管生物学研究室¹, 北海道大学大学院歯学研究科口腔顎顔面外科学², 北海道大学大学院歯学研究科口腔病理病態学³, 北海道大学大学院循環器・呼吸器外科学⁴, 東京大学先端科学技術研究センターシステム生物学⁵, 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野⁶)

一般演題4 (15:10~16:00)

座長 丸山 玲緒 (札幌医科大学医学部分子生物学講座)

17. Human Primary 大腸がん腹膜転移細胞株のがん幹細胞免疫特性解析

○王 利明¹、小川 幸司^{1,3}、広橋 良彦¹、鳥越 俊彦¹ (札幌医科大学病理学第一講座¹、札幌東徳洲会病院²、札幌医科大学第一外科講座³)

18. 肝細胞癌におけるKLF5による癌幹細胞制御機構

○佐藤 史幸¹、夏井坂光輝¹、前原 経²、浅野 彩華²、久保田良政¹、出水 孝章¹、梅村真知子¹、伊藤 淳¹、常松 聖司¹、中井 正人¹、荘 拓也¹、須田 剛生¹、森川 賢一¹、小川 浩司¹、大西 俊介¹、坂本 直哉¹ (北海道大学病院消化器内科¹、北海道大学大学院薬学研究院臨床病態解析学研究室²)

19. 癌精巢抗原BORISの肺癌幹細胞様細胞における発現とBORIS抗原を標的とした免疫療法の検討

○堀部 亮多^{1,2}、廣橋 良彦¹、鳥越 俊彦¹、高橋 弘毅²、佐藤 昇志¹ (札幌医科大学医学部病理学第一講座¹、札幌医科大学医学部呼吸器・アレルギー内科学講座²)

20. 子宮体癌における癌幹細胞の探求

○田淵 雄大^{1,2}、廣橋 良彦¹、鳥越 俊彦¹、齋藤 豪²、佐藤 昇志¹ (札幌医科大学医学部病理学第一講座¹、札幌医科大学医学部産婦人科学講座²)

21. 膵管腺癌細胞は細胞分裂時にCD44v9とMDR1の発現を亢進させる

○池下 隼司、木内 静香、宮武由甲子、笠原 正典 (北海道大学大学院医学研究科病理学講座分子病理学分野)

1. 非小細胞肺癌におけるHER2及び関連分子異常の観察研究 (HOT1303-A) とHER2陽性非小細胞肺癌に対するトラスツズマブの第II相試験 (HOT1303-B) の進行状況報告

○合田智宏¹, 木下一郎¹, 大泉聡史², 原田敏之³, 西原広史⁴, 畑中 豊⁵, 松野吉宏⁵, 天野虎次⁷, 佐藤典宏⁷, 磯部 宏⁷, 田中伸哉⁶, 西村正治², 秋田弘俊¹(北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野¹, 北海道大学大学院呼吸器内科学分野², 地域医療機能推進機構北海道病院呼吸器センター³, 北海道大学大学院探索病理学講座⁴, 北海道大学病院病理診断科⁵, 北海道大学大学院腫瘍病理学分野⁶, 北海道大学病院臨床研究開発センター⁷, KKR札幌医療センター腫瘍内科⁸)

【背景】非小細胞肺癌の約5%にHER2過剰発現・遺伝子増幅や遺伝子変異を認め、抗HER2抗体トラスツズマブが奏効した症例が報告されている。【目的・方法】前向き観察研究では、非小細胞肺癌のHER2過剰発現/遺伝子増幅/遺伝子変異を検討し、トラスツズマブの治療対象となり得る希少な患者の特定と、臨床病理学的・分子生物学的特徴やバイオマーカーの同定を目指す。癌組織を含むパラフィン包埋検体が保管されているEGFR遺伝子変異陰性の進行非小細胞肺癌患者に対し、免疫組織化学法・DISH法・直接/次世代シーケンズ法によるHER2過剰発現/遺伝子増幅/遺伝子変異の頻度、その他のドライバー遺伝子変異の頻度、臨床的病学的特徴との相関を解析する。目標症例数は200例で、EGFR陰性肺癌の約7%と予測するHER2陽性肺癌14例の特定を見込んでいた。第II相試験では、上記の観察研究もしくはSCRUM JAPANでHER2異常を認め2レジメン以上の化学療法が行われた患者におけるトラスツズマブの有効性と安全性を検討する。主要評価項目は奏効率、副次評価項目は無増悪生存期間、全生存期間と有害事象、目標症例数は10例である。【進行状況】現在まで観察研究に、他研究でHER2変異を検出されていた2例を含む63例が登録された。HER2の検出が終了した60例の中、3例に過剰発現と遺伝子増幅、5例に遺伝子変異が認められた。第II相試験にはSCRUM JAPANでHER2変異を検出された1例を含む2例が登録された。

2. 非小細胞肺癌 (NSCLC) におけるNumb, Musashiに関する研究

○菊池 創¹, 榊原 純¹, 池澤靖元¹, 高階 太一¹, 水柿秀紀¹, 菊地英毅¹, 菊地順子¹, 品川尚文¹, 大泉聡史¹, 榎田泰浩², 加賀基知三², 木下一郎³, 秋田弘俊³, 西村正治¹(北海道大学病院内科¹, 北海道大学病院循環器・呼吸器外科², 北海道大学病院腫瘍内科³)

【背景】Notch pathwayの異常活性と癌化には密接な関連があり、非小細胞肺癌 (NSCLC) においてはtumor activatorとしての機能が示されている。NumbはNotchシグナルを抑制し、Musashi 1はNumb mRNAの翻訳を抑制している。消化器癌などの他癌種においてNumbはtumor suppressor, Musashi 1はtumor activatorとしての機能が報告されている。しかし、NSCLCにおけるNumb, Musashi 1と臨床病理学的因子や予後との関連については十分に解明されていない。【目的】NSCLC組織におけるNumbとMusashi 1の発現を評価し、臨床病理学的因子、予後との関連を検討する。【方法】1982年から1994年までに北海道大学病院で外科的切除したNSCLC 153検体のパラフィン切片を用いて、NumbとMusashi 1の発現を免疫染色で評価する。それぞれ陽性細胞率の中央値で2群に分け、検討を行う。【結果】Numb, Musashi 1陽性細胞率の中央値はそれぞれ86%、46%であった。Numbの発現は年齢、性別、喫煙歴、組織型、分化度と関連を認めたが、Musashi 1の発現と関連のある臨床病理学的因子は認めなかった。Numb陽性症例は陰性症例と比較し有意に生存期間が長かった (中央値11.25年vs2.95年, $p < 0.05$) が、Musashi 1発現は予後に関連を認めなかった。多変量解析の結果、病理病期とNumb発現が有意な予後予測因子であった。【結論】NumbがNSCLCにおいて予後予測因子となり、さらにtumor suppressorとして機能している可能性が示唆された。

3. 原発不明癌における分子標的治療の開発を目指したドライバー遺伝子変異解析

○木下一郎¹, 畑中 豊^{2a}, 本間理央¹, 辻 靖¹, 坂井和子⁵, 西尾和人⁵, 田中里枝⁶, 鈴木優介⁶, 松野吉宏^{2b}, 西原広史⁷, 秋田弘俊¹(北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野¹, 北海道大学病院コンパニオン診断研究部門^{2a}, 北海道大学病院病理診断科^{2b}, KKR札幌医療センター斗南病院腫瘍内科⁴, 近畿大学医学部ゲノム生物学教室⁵, ジェネティックラボ先端医療技術部⁶, 北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座⁷)

【目的】原発不明癌における分子標的治療の開発を目標に、ドライバー遺伝子を中心とした次世代シーケンズ (NGS) 解析を行うとともに、遺伝子発現プロファイリングにより推定された癌種との関係を検討した。【対象と方法】2004年4月から2012年12月に北海道大学病院と斗南病院で原発不明癌と診断され、生検・手術検体のFFPE標本が保管され、核酸抽出可能であった36症例。抽出されたDNAを用いたIon AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2による50遺伝子のNGS解析と、RNAを用いた定量的RT-PCRに基づく92遺伝子発現プロファイラー (CancerTYPE ID) による癌種の推定を行った。【結果】26例のNGS解析が終了し、21例に30遺伝子の体細胞変異が検出された。6例にtargetableな可能性のある6つのドライバー癌遺伝子変異が排他的に認められた (CTNNB1, 2; FGFR2/BRAF/PIK3CA/KRAS, 各1)。残りの24の遺伝子変異は癌抑制遺伝子変異であり、一部重複し20例に認められた (p53/SMAD4, 17/3; CDKN2/P16/PTEN/STK11/FBXW7, 各1)。遺伝子発現プロファイラーによって33例で癌種が推定された。ドライバー癌遺伝子変異は、推定された癌種/腫瘍5例中2例 (BRAF, KRAS)、肺扁平上皮癌4例中2例 (CTNNB1, PIK3CA)、肺神経内分泌腫瘍3例中1例 (CTNNB1) に認められ、推定された癌種に矛盾しない変異であった。【結論】原発不明癌の一部にドライバー癌遺伝子変異を検出し、分子標的治療が有効である可能性が示唆された。

4. BH3プロファイリングを用いた進行胃癌における薬剤感受性マーカーの探索及び予後解析

○久保智洋, 河野 豊, 石川和真, 村瀬和幸, 高田弘一, 佐藤康史, 佐藤 勉, 宮西浩嗣, 瀧本理修, 小船雅義, 加藤淳二(札幌医科大学腫瘍・血液内科)

【背景・目的】切除不能進行胃癌に対する化学療法の治療戦略は、殺細胞効果を有する複数の抗癌剤を併用して抗腫瘍効果を高めるものであるが、その一方で副作用が重篤になることも予想される。そこで治療開始前に予め各抗癌剤の感受性がそれぞれ予知できれば、使用する抗癌剤それぞれの量を調整することによって副作用の軽減のみならず治療効果の上昇も期待される。

【方法】胃癌細胞株11種類におけるin vitroでの3種類 (Docetaxel/CDDP/5-FU) の抗癌剤感受性試験を行った。次にこれらの胃癌細胞株におけるBH3 profilingを行い、抗癌剤感受性との関連を検討した。さらに当教室で行っているDocetaxelを含めたプロトコール (Docetaxel/CDDP/TS-1併用療法: DCS) で治療を受けた69人の進行胃癌患者における化学療法前の胃癌組織で免疫染色を行い、DCS療法後に切除可能となった手術検体における化学療法奏効効果判定並びに予後との関連を検討した。

【結果】胃癌細胞株においてDocetaxelの感受性はBim BH3 profilingと強い相関を認めた。さらにこのBim BH3 profilingはBAK蛋白発現と正の相関を認めたことから、Docetaxelのin vitroでの殺細胞効果にはBAK蛋白発現の関与が考えられた。そこで化学療法前の胃癌組織におけるBAK蛋白発現を免疫染色で定量したところ、化学療法が組織学的に奏効した患者群においては、化学療法前の胃癌組織におけるBAK蛋白発現が有意に高かった ($p = 0.018$)。またBAK蛋白発現が高い患者は無増悪期間 (HR, 2.664; 95% CI, 1.352 - 5.248; $p = 0.005$)、さらには全生存期間 (HR, 3.390; 95% CI, 1.549 - 7.422; $p = 0.002$) が延長していた。

【結論】進行胃癌におけるBAK蛋白発現は、Docetaxelの薬剤感受性を決定するバイオマーカーとなりうるかと考えられた。

5. 膠芽腫においてチロシンキナーゼ阻害剤への耐性獲得におけるMSX1の役割

○鈴鹿 淳¹, 津田真寿美¹, 王 磊², 谷野美智枝¹, 木村太一², 西原広史², 田中伸哉^{1,2}(北海道大学大学院医学研究科病理学講義座腫瘍病理学分野¹, 北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座²)

【背景と目的】膠芽腫は悪性脳腫瘍の中でも最も悪性度の高い腫瘍であり、効果的な治療法は未だ確立されていない。近年、膠芽腫において遺伝子増幅・変異が報告されている受容体型チロシンキナーゼEGFR、c-Met、PDGFRに対する分子標的治療が試みられているが、薬剤耐性や腫瘍幹細胞性を獲得することが問題視されている。本研究では、ヒト膠芽腫細胞株を用いてチロシンキナーゼ阻害剤耐性細胞株を樹立し、治療抵抗性に関与する分子の同定並びに抵抗性獲得機序を解析した。【方法】EGFR、c-Met、PDGFR阻害剤に対する耐性獲得ヒト膠芽腫細胞株KMG4を用いて、幹細胞関連PCRアレイを実施した。耐性細胞特異的に発現亢進を認めた分子はsiRNAを用いて発現抑制後、高濃度の阻害剤添加によりアポトーシス誘導能を検討した。発現抑制により阻害剤への耐性が解除された分子においては、定量的RT-PCR及びイムノブロット法により、アポトーシス関連分子や薬剤耐性関連分子、幹細胞性を規定する分子との関連性を検討した。【結果】PCRアレイ解析より、EGFR、PDGFR阻害剤耐性細胞において、転写抑制因子Msh homeobox 1 (MSX1)の発現亢進を認めた。耐性細胞特異的に発現亢進を認めた分子はsiRNAを用いて発現抑制後、高濃度の阻害剤添加によりアポトーシス誘導能を検討した。発現抑制により阻害剤への耐性が解除された分子においては、定量的RT-PCR及びイムノブロット法により、アポトーシス関連分子や薬剤耐性関連分子、幹細胞性を規定する分子との関連性を検討した。【結果】PCRアレイ解析より、EGFR、PDGFR阻害剤耐性細胞において、転写抑制因子Msh homeobox 1 (MSX1)の発現亢進を認めた。耐性細胞特異的に発現亢進を認めた分子はsiRNAを用いて発現抑制後、高濃度の阻害剤添加によりアポトーシス誘導能を検討した。発現抑制により阻害剤への耐性が解除された分子においては、定量的RT-PCR及びイムノブロット法により、アポトーシス関連分子や薬剤耐性関連分子、幹細胞性を規定する分子との関連性を検討した。【結論】膠芽腫において、MSX1はチロシンキナーゼ阻害剤に対する治療抵抗性獲得に重要な分子であり、分子標的治療の新規標的分子となり得ることが示唆された。

6. ヒト大腸癌FFPE検体における、迅速免疫染色装置 (R-IHC) を用いた活性化型Rac1検出技術の開発

○堀尾瑞奈¹, 津田真寿美¹, 王 磊², 竹浪智子¹, 谷野美智枝¹, 木村太一², 西原広史², 田中伸哉^{1,2}(北海道大学大学院医学研究科病理学講義座腫瘍病理学分野¹, 北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座²)

【背景と目的】低分子量Gタンパク質Rac1はRhoファミリーのメンバーであり、GDP結合型からGTP結合型に変換することで活性化型となり、細胞運動能亢進、癌の浸潤・転移に関与する。活性化型低分子量Gタンパク質の検出には、活性化型Gタンパク質と特異的に結合する標的分子の蛋白質間相互作用を利用するが、これまでFFPE検体においてこの結合を検出することは技術上不可能であった。本研究では、電界非接触撹拌技術を活用した迅速免疫染色装置 (Rapid-immunohistochemistry: R-IHC) を用いて活性化型Rac1と標的分子PAKの介在頻度を著しく亢進させ、ヒト大腸癌FFPE検体において活性化型Rac1の検出技術を確認することを目的とした。【材料と方法】活性化型Rac1染色の至適条件を確認するために、293T細胞にRac1V12をトランスフェクションし、セルブロックを作製した。染色条件は、賦活化の有無 (pH 6.0クエン酸バッファー)、ホルマリン固定時間 (30分、2時間、1日、2日、3日)、GST-PAK濃度 (2、5、10 μ g/ml)、抗GST抗体濃度 (50倍、100倍希釈) を検討した。GST-PAK反応時にR-IHCを使用した。至適条件確立後は、大腸癌23症例のFFPE検体を使用して、活性化型Rac1の染色強度およびパターンを検討した。【結果と考察】セルブロックでの活性化型Rac1染色条件の検討により、賦活化無し、ホルマリン固定時間30分~1日、抗GST抗体50倍希釈、GST-PAK 2 μ g/mlの条件が良好であることが明らかとなった。ヒト大腸癌FFPE検体においても活性化型Rac1の検出に成功し、腫瘍浸潤部と中心部において染色強度の相違、また腫瘍組織内での染色の極性が認められた。現在、脈管・リンパ管侵襲や予後との相関を検討中である。本技術については特許出願済みである (特願2015-043171)。

7. 子宮頸部腺癌におけるタイト結合関連分子の解析

○秋元太志¹, 高澤 啓², 村田雅樹², 高澤久美², 野島正寛³, 青山智志², 田中 敏², 小山内誠², 長谷川匡¹, 齋藤 豪¹, 澤田典均²(札幌医科大学産婦人科学講座¹, 札幌医科大学病理学第二講座², 東京大学医科学研究所附属病院院験センター³, 札幌医科大学病理診断科⁴)

タイト結合 (Tight Junction: TJ) は上皮細胞間隙の最も頂端側に位置する細胞接着装置で、claudin (CLDN)、occludin、junctional adhesion molecule (JAM) 等の分子複合体から構成され、発癌や癌の進展に関与するとされる。子宮頸部腺癌でのTJ関連分子の発現解析を行い、診断マーカーとしての有用性、治療標的への可能性を検討した。2004年~2012年に当科で切除した、上皮内腺癌を含む子宮頸部腺癌61例を対象として、免疫組織化学染色 (IHC) を行った。一次抗体に抗CLDN1抗体、抗CLDN4抗体、抗CLDN7抗体、抗occludin抗体、抗JAM-A抗体を、二次抗体及び発色はDako REALTM EnVisionTM Detection Systemを使用した。染色の局在、強度、陽性率を観察し、強度と陽性率のスコアの乗算により、染色スコア (IRS) を算出した。感度・特異度の評価はROC curve analysis of SPSS statistics ver.20で解析した。また、頸部腺癌におけるCLDN1の役割について頸部腺癌細胞株を用いて検討した。IHCでは正常頸部腺癌に比して粘液性腺癌でTJ関連分子の発現増加が認められ、特に、CLDN1、JAM-Aでは高い感度・特異度が得られた。また、CLDN1のknockout株では、細胞増殖の低下、遊走能・浸潤能の低下が認められた。以上より、CLDN1、JAM-Aは癌判別のマーカーとしての有用性が示唆され、CLDN1は発現低下により抗腫瘍効果を発揮し、治療標的となりうる可能性が示された。

8. 頭頸部扁平上皮癌の悪性化におけるp63依存性タイト結合分子JAM-Aの役割

○角木拓也^{1,2}, 黒瀬 誠¹, 高野賢一¹, 近藤 敦¹, 小幡和史¹, 野村一顕¹, 宮田 遼¹, 金野 匠², 高橋駿太², 島山翔聖², 幸野貴之², 水見徹夫¹, 小島 隆²(札幌医科大学医学部耳鼻咽喉科学講座¹, 札幌医科大学医学部フロンティア医学研究所細胞科学部門²)

細胞間接着装置タイト結合分子Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A) は、食道癌、乳癌、頭頸部扁平上皮癌で高発現し、浸潤・転移への関与が知られているが、その発現調節機構についてはよく分かっていない。一方p63は、p53がん抑制遺伝子ファミリーの1つで、一部の癌の悪性化に関与がみられ、一部の癌のマーカーであるGATA-3を調節している。以前我々は、頭頸部扁平上皮癌細胞株におけるp63依存性のJAM-Aの高発現機構を報告した。今回我々は、頭頸部扁平上皮癌細胞株だけでなく頭頸部扁平上皮癌組織から分離培養した癌細胞を用いて、p63/GATA-3経路におけるJAM-Aの発現調節機構の解明を試みた。頭頸部癌患者の手術材料を用いて、頭頸部扁平上皮癌におけるJAM-A、p63の発現について検討した。また頭頸部扁平上皮癌患者血清を用いて可溶性JAM-Aを測定した。次にJAM-A、p63を高発現している頭頸部扁平上皮癌細胞株 (Detroit562) においてJAM-A、p63、GATA-3の発現を抑制し、増殖能、浸潤能への関与を検討した。発現調節機構においては、Detroit562、頭頸部扁平上皮癌組織から分離培養した初発癌細胞を用いて検討した。頭頸部扁平上皮癌において、JAM-A、p63、GATA-3の発現亢進が認められた。頭頸部扁平上皮癌患者血清では健常者血清と比較して可溶性JAM-Aの増加を認めた。癌細胞株のJAM-A発現をsiRNAで低下させたところ細胞増殖、浸潤、遊走能の低下が認められた。癌細胞株、初発癌細胞において、p63をsiRNAで低下させたところJAM-A、GATA-3の発現低下がみられ、GATA-3をsiRNAで低下させたところJAM-Aの発現低下が認められた。JAM-Aはp63/GATA-3経路を介して頭頸部扁平上皮癌の悪性化への関与が考えられた。頭頸部扁平上皮癌のJAM-Aの発現調節機構の解明は、頭頸部扁平上皮癌の治療開発に有用と考えられた。

9. TJ構成因子FAKは、ムスカリンM1受容体シグナルを介した腸上皮バリア機能維持や修復の標的となる
○矢澤隆志, 宇和田淳介, イスラムタリクル, 谷口隆信(旭川医科大学学生化学講座細胞制御科学分野)

上皮細胞は、タイトジャンクション(TJ)により強固なバリアを形成する。TJの異常や崩壊は、炎症性疾患や癌化に繋がる。私たちは、以前の研究で接着斑キナーゼ(Focal adhesion kinase, FAK)がTJ構成因子であり、その活性化がバリア機能の維持に重要であることを報告している(BBA Mol Bas Dis, 2012)。さらに私たちは、腸上皮細胞ではムスカリンM1受容体が高いレベルで発現しており、M1受容体を介したERKの活性化がバリア機能に関わる可能性を示している(J. Gastroenterol. 2013)。本研究では、ヒト結腸癌由来のT-84細胞を用いて、TJ機能維持や修復時におけるM1受容体-ERKシグナルとFAK機能の関連を検討した。T 84細胞へのカルバコールの添加は、ERKとFAKを活性化し、これはM1受容体のアンタゴニストであるMT-7により阻害された。一方、エタノールによる上皮バリア障害モデルでは、ERKとFAKの活性は著しく低下した。その後のエタノール除去によりERKとFAKの活性は速やかに回復し、続いてバリア機能の回復が観察された。カルバコールは、バリア機能の回復を促進したが、これはMT-7と共に、ERK阻害剤のU 0126やFAK阻害剤のPF-228により抑制された。FAKの活性化は、U 0126により抑制されたことから、ERKシグナルがFAKを活性化してバリア機能を回復させると考えられる。また、IFN- γ による炎症疾患モデルにおいても、バリア機能の低下と共に、ERKとFAKの活性化が低下した。この時、細胞のM1受容体とGq/11の発現が著しく低下していた。以上の結果より、M1受容体を介したFAKの活性化が腸上皮のバリア機能の維持に重要な役割を果たしており、その破壊が疾患に繋がる可能性が示唆される。

10. マウス肝発癌モデルにおける腫瘍の形質に対するPI3 kinase 経路、Hippo-Yap経路とc-Mycの相互作用の検討
○山本雅大, 辛 氷, 陳 錫, 藤井清水, 大塩貴子, 岡田陽子, 西川祐司(旭川医科大学腫瘍病理)

【目的】肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)、胆管細胞癌 (cholangiocarcinoma, CC)、肝芽腫では、PI3 kinase経路、Hippo-Yap経路、c-Mycの活性化が重要であるされているが、肝腫瘍形質決定におけるシグナル経路の相互作用の意義は不明な点が多い。我々は、マウス肝細胞でこれらを様々な組み合わせで活性化させ腫瘍を誘導し、それらの形質を検討した。【方法】Sleeping Beauty transposonおよびhydrodynamic tail vein injectionを用い、マウス肝細胞にin vivoで遺伝子を導入し、誘発された腫瘍を組織学的、免疫組織学的に検討し、肝上皮系細胞の分化に関わる遺伝子発現をRT-qPCRで調べた。【結果】ミリスチル化Akt (myrAkt)を導入した場合約7ヶ月で、一部にcytokeratin 19 (CK19)陽性胆管上皮への分化を伴う多発性HCCが誘導された。c-Mycまたは変異活性化型Yap (YapS127A)をmyrAktと同時に導入すると6-8週間で、myrAkt+c-MycではHCC、myrAkt+YapS127AではCK19陽性管状構造からなるCCと対称的な組織像の腫瘍が形成された。myrAkt、c-Myc、YapS127Aを同時に導入すると2週間後には、低分化HCCが肝をびまん性に浸潤・置換した。一方、c-Myc、YapS127Aを同時に導入した場合、8-20週後に多発性腫瘍が出現し、組織学的に、結節辺縁部にCK19陽性細胞を伴うが、全体的には分化の方向が不明瞭な比較的小型の腫瘍細胞からなっていた。Notch関連遺伝子、Ctgf、Tnfの発現はmyrAktとYapS127Aで誘導されたCCで増加したが、myrAkt、YapS127AおよびMycで誘発した腫瘍では増加しなかった。また、c-MycとYapS127A誘発腫瘍では肝芽細胞で高発現するDlk1とともにSox2が特異的に上昇した。【結論】Hippo-Yap経路はPI3 kinase経路とともに働くことと肝細胞からのCCの発生に寄与するが、c-Mycはこれに対し抑制的に働くことが明らかになった。また、Hippo-Yap経路とc-Mycが同時に活性化された場合、肝細胞の脱分化が起こることが示唆された。

11. マウス肝腫瘍における代謝状態の変化：肝硬変、非肝硬変モデルの比較プロテオミクス解析
○藤井清水, 陳 錫, 大塩貴子, 辛 氷, 岡田陽子, 山本雅大, 西川祐司(旭川医科大学病理学講座腫瘍病理分野)

【背景】我々はこれまで、肝腫瘍の発生過程が異なる肝硬変、非肝硬変モデルを用いて、腫瘍化に伴う肝細胞の代謝変化をプロテオーム解析により検討してきた。肝腫瘍組織における代謝関連タンパク質の発現変動を捉えることにより、腫瘍に特徴的な代謝経路を示すことができたが、モデル間での違いを特徴づけるまでには至らなかった。本研究では検体数を増やし、より詳細な解析を試みた。【方法】肝硬変モデルでは四塩化炭素 (CCl₄) の反復投与 (約25週間) により、非肝硬変モデルではdiethylnitrosamine (DEN) の生後2週間における単回投与により肝腫瘍を誘発した。両実験モデルの肝腫瘍組織 (DEN腫瘍, 5検体; CCl₄腫瘍, 3検体) とコントロールマウスの肝組織の可溶性タンパク質画分を対象に、LC-MS/MSを用いた定量プロテオーム解析を行った。約600種類の代謝関連タンパク質が同定され、これらの発現変動を両モデル間で比較検討した。【結果】CCl₄腫瘍、DEN腫瘍に共通して、タンパク質および脂肪酸の合成が促進されるが、クエン酸回路およびアミノ酸の分解が抑制される傾向が認められた。いずれの腫瘍でも解糖系が亢進していたが、乳酸デヒドロゲナーゼ発現はCCl₄腫瘍で特異的に低下していた。ペントースリン酸経路の酸化的経路は両腫瘍で、非酸化的経路はCCl₄腫瘍のみで亢進していた。脂肪酸の分解はCCl₄腫瘍では抑制されたが、DEN腫瘍では促進されていた。また、プロテアソームによるタンパク質分解はCCl₄腫瘍で促進されたが、DEN腫瘍では抑制されていた。【考察】マウス肝腫瘍では、Warburg効果に準じたエネルギー代謝へと変化した。核酸、タンパク質ならびに脂肪酸などの細胞構成成分の合成が増進することが明らかになった。ペントースリン酸経路の活性化の違いは、CCl₄腫瘍のより高い増殖性に関連している可能性がある。本研究により、肝腫瘍の発生過程の違いに応じ、腫瘍細胞は特有の代謝状態を呈しうることが示唆された。

12. がんのワクチン療法-サイトカイン毒性の無い免疫増強アジュバントの開発
○瀬谷 司, 松本美佐子(北海道大学大学院医学研究科免疫学分野)

がん細胞は何らかの理由で免疫系を回避して腫瘍化する。PD1抗体が一部の進行がんを覚醒しうることはがん患者でも免疫ががん進展を阻止しうる潜在能力を保持することを示唆する。しかし、固形がんではPD-1阻害は30%程度の有効率である。一般にがんの術後化学療法は副作用が強く、患者の高QOLを保証し難い。がん特異的な細胞傷害リンパ球を誘導できればがん細胞だけを選択的に見つけて傷害するという理論で、副作用の少ない特異療法が期待できる。しかし、多くのがん抗原の同定とペプチドワクチン療法が企画されたにも拘わらず、抗がんワクチンや細胞免疫療法の開発は困難を極めていた。感染症ワクチンは一般に抗原のみでなく樹状細胞を成熟させるパターン分子 (アジュバント) を含むために終生免疫を起動できる。がん抗原はパターン分子を含まないために樹状細胞は成熟しない。即ち、抗原投与のみでは細胞性免疫を起動できないと考えられる。現在がんワクチンのアジュバントはAlumのような炎症性アジュバントしか認可されておらず、これらは樹状細胞依存性の細胞性免疫の活性化を殆ど上げない。PolyI:Cなど効果のあるアジュバントはサイトカイン血症などの毒性のため、十分量をヒトに使えない。現況を打破するには副作用なく抗がん免疫を誘導するワクチンアジュバントを開発することが急務である。がんワクチンのアジュバント開発に向けて、我々は自然免疫の理解からpolyI:Cに代わる合成RNAアジュバントARNAXをケミカルバイオロジーの手法でデザインした。ARNAXはがん免疫を起動しながら炎症を誘起せず副作用を極小化する。マウスモデルでARNAXはサイトカイン血症を起こさずにがん退縮させた。ARNAXはヒトの血液細胞でもマウスの結果を裏付けた。ARNAXと既成の抗がんワクチン、PD-1抗体療法を組み合わせたれば多くの進行がんや転移がんにも効果が見込めるはずである。ARNAXは現在前臨床試験に入っている。

13. ヒト肺癌微小環境におけるMyeloid-derived suppressor cellsの形成は化学療法により促進される

○武内 慎太郎^{1,2}, ムハンマドバグダーディ², 土川 貴裕¹, 和田はるか², 中村 透¹, 七戸 俊明¹, 清野 研一郎², 平野 聡¹
(北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野¹, 北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物学分野²)

【背景と目的】 肺癌は周囲炎症環境の形成や強い免疫反応を特徴とする癌で、これらの微小環境が肺癌の進行や転移に大きく関連している。近年、マウスの肺癌発癌モデルにおいては微小環境においてMyeloid-derived suppressor cells (MDSC)が形成され、腫瘍免疫の抑制を介してその発生や進行に関与することが報告されているが、ヒト肺癌とMDSCの関係、また、化学療法という治療環境での変化は明らかとなっていない。【材料と方法】 ヒト肺癌細胞株の培養上清を、健常人より容易に分離・採取可能なCD14陽性単球に作用させ、分化した血球の遺伝子、蛋白質を解析し、さらにT細胞と共培養し、その抑制能を解析した。同様の実験を肺癌細胞に抗腫瘍剤を作用させた後に採取した培養上清でも行った。手術検体を用いて、術前に化学療法を受けた肺癌の手術検体 (n=9) と、同時期に化学療法を受けていない肺癌の手術検体 (n=6) の間質におけるMDSC関連マーカー (CD14,HLA-DR,CD66b) の免疫組織化学染色を行い発現細胞数の数や割合を統計学的に比較検討した。【結果】ヒト肺癌細胞の培養上清により分化したヒト単球は、HLA-DRの発現低下やNOS2, ARG1の発現上昇など、MDSCに特徴的な遺伝子・蛋白質発現を有し、T細胞の増殖を抑制した。さらに抗腫瘍剤投与後に採取した肺癌細胞の培養上清により分化した単球では、これらの遺伝子・蛋白質発現やT細胞抑制能は抗腫瘍剤非投与時より顕著となった。術前に化学療法を行ったヒト肺癌組織においてCD14陽性細胞中のHLA-DR陽性を示す細胞の数と割合は、化学療法未施行群と比べて有意に少なく、CD66b陽性細胞は化学療法未施行群と比べて有意に多かった。【結論】ヒト肺癌微小環境においては周囲にMDSCの形成が起り、さらにその作用は化学療法により促進される可能性がある。

14. 低酸素環境下で増強するヒト悪性胸膜中皮腫細胞の運動・浸潤能におけるHIF1およびMUC1の役割

○項 翌慧¹, ゴウダグジホウマ¹, 飯塚 久^{1,2}, 坂田 健一郎¹, 植田 泰浩³, 柳原 五吉⁴, 久保 貞紀⁵, 中川 宏治⁶, 小林 正伸⁷, 入村 達郎⁸, 浜田 淳一¹ (北海道大学遺伝子病制御研究所幹細胞生物学分野¹, 島根大学医学部微生物免疫学講座², 北海道大学病院胸部外科³, 国立がん研究センター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理解分⁴, 安田女子大学薬学部⁵, 北海道大学大学院薬学研究院⁶, 北海道医療大学看護福祉学部⁷, 聖路加国際メディカルセンター医療イノベーション部⁸)

我々は、ヒト悪性胸膜中皮腫 (MPM) 細胞を低酸素 (1% O₂) 下で培養するとその運動・浸潤能が増強すること、さらにこの低酸素下での細胞運動・浸潤能の増強には、HIF1シグナルに依存して発現の増加するMUC1が重要な役割を果たしていることを示してきた。本研究では、MUC1の発現亢進だけで運動・浸潤能が増強されるのか否かを明らかにするために、MPM細胞にMUC1を過剰発現させ、常酸素圧 (21% O₂) 下で培養した。その結果、MUC1を過剰発現させたMPM細胞の運動・浸潤能は、21% O₂下では対照細胞と同程度であったが、1% O₂下では対照細胞よりもさらに高まった。つぎに、常酸素圧下で培養しているMPM細胞をHIF1αの分解を抑制できる塩化コバルトで処理した。塩化コバルトの添加は、低酸素下で培養した場合と同様に常酸素圧下におけるMPM細胞のHIF1αの分解を抑制し、MUC1の発現を亢進させた。常酸素圧下で細胞運動・浸潤能を調べたところ、塩化コバルトで処理されたMPM細胞の運動・浸潤能は未処理細胞のそれらと同程度であり、低酸素下における運動・浸潤能に比べ有意に低いことがわかった。以上の結果から、低酸素環境下におけるMPM細胞の運動・浸潤能の増強には、HIF1-MUC1経路の活性化だけでなく低酸素で誘導あるいは活性化される他の因子の介在も必要であると考えられた。

15. Tumor endothelial cell-secreted protein activates a DNA damage response

○Annan Dorcas A.¹, 間石 奈湖¹, 北條 敬之¹, 鳥居 ちさほ¹, Mohammad T Alam¹, Habiba Umma¹, 植田 泰浩², 植田 京子¹
(北海道大学遺伝子病制御研究所血管生物学研究室¹, 北海道大学大学院医学研究科循環器・呼吸器外科²)

Tumours require an efficient vascular system to proliferate and metastasise. The vasculature surrounding tumours are usually abnormal in structure as compared to normal vasculature. In addition, we have shown that tumour endothelial cells (TECs) are significantly different in functionality compared to normal endothelial cells (NECs); TECs are karyotypically aneuploid and show an up-regulation of several genes which are pro-angiogenic or related to drug-resistance and stemness. Among these TEC markers are several secreted proteins, including Factor-X. Factor X has pro-angiogenic effects on endothelial cells in an autocrine manner and its expression is upregulated by reactive oxygen species (ROS) in the tumor microenvironment. Although we have found that ROS induces aneuploidy in endothelial cells, no reports have been made concerning the effect of Factor X on the chromosomal instability. In this study, we addressed the contribution of Factor X to the activation of DNA damage response (DDR) in TECs. Primary cultured NEC and TEC isolated from normal dermis and human tumor xenografts respectively, were treated with Factor X core protein exogenously. Immunocytochemistry was performed with p-histone H2A.X antibody to analyse DDR. Factor X induces phosphorylation of H2AX in normal endothelial cells, suggesting that Factor X causes damage to DNA which may contribute to chromosomal instability observed in TECs.

16. 高転移性腫瘍miRによる血管内皮におけるIL-6を介した薬剤耐性誘導

○鳥居 ちさほ^{1,2}, 秋山 廣輔¹, 川本 泰輔¹, 間石 奈湖¹, Towfik Alam Mohammad¹, 鄭 漢忠³, 戸塚 靖則⁴, 進藤 正信², 植田 泰浩⁵, 南 敬⁶, 小坂 展寛⁷, 落谷 孝広⁸, 植田 京子¹ (北海道大学遺伝子病制御研究所血管生物学研究室¹, 北海道大学大学院歯学研究科口腔顎顔面外科学², 北海道大学大学院歯学研究科口腔病理病態学³, 北海道大学大学院循環器・呼吸器外科学⁴, 東京大学先端科学技術研究センターシステム生物学⁵, 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野⁶)

腫瘍血管新生は腫瘍の進展や転移に重要な役割を果たしている。近年、腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と比較し、様々な点で異なることがわかってきた。我々もこれまでに、高転移性腫瘍血管内皮細胞は幹細胞マーカーを発現すること (Ohga, Am J Pathol, 2012)、ALDH活性の高い血管内皮細胞が存在すること (Kakutani-Omura, PLOS One, 2014)、ABCトランスポーター-p-gpの発現が高く薬剤耐性をもっていること (Akiyama, Am J Pathol, 2012) を報告した。しかし、そのメカニズムに関しては不明であった。そこで本研究では血管内皮が幹細胞性や薬剤耐性を獲得するメカニズムを解明することを目的とした。A375SM (高転移性ヒト悪性黒色腫細胞株) 培養上清処理により、HMVEC (ヒト微小血管内皮細胞) においてIL-6やALDHなどの幹細胞マーカーの発現亢進、スフェロイド形成能や分化能などの幹細胞性の一部が誘導され、5-FUに対する薬剤耐性が獲得された。そのメカニズムとして、高転移性腫瘍と低転移性腫瘍由来のExtracellular vesicles内のmicroRNAの網羅的比較により、A375SM培養上清中のmiR-Xに着目した。miR-XはHMVECにおけるSTAT3の活性化を介し、ALDHやIL-6の発現を亢進させた。また、IL-6はHMVECにおけるAktを活性化させることにより、5-FUに対する薬剤耐性を誘導した。このことから、高転移性腫瘍から分泌されたmiR-Xは血管内皮に薬剤耐性を獲得させ、癌の悪性化に寄与していることが示唆された。

17. Human Primary 大腸がん腹膜転移細胞株のがん幹細胞免疫特性解析

○王利明¹, 小川宰司^{1,3}, 広橋良彦¹, 鳥越俊彦¹(札幌医科大学病理学第一講座¹, 札幌東徳洲会病院², 札幌医科大学第一外科講座³)

【背景】大腸がんは悪性腫瘍の中でも、世界的に発病率2位、癌死4位を占める。新規診断患者の約70%は進行がんであり、進行がんに対してははまだ決定的な根治治療法がないのが現状である。がん幹細胞はがん細胞集団の中で、造腫瘍能、自己複製能、多分化能を有する亜集団であり、治療後の再発や、遠隔転移等の原因になると考えられている。大腸がんにおけるがん幹細胞研究は、現在のところ細胞株を用いたものが多い。細胞株は長期間にわたるin vitro 培養を介するために、プライマリーのがん細胞の性格を評価出来るか問題点がある。本研究において、プライマリー大腸がん幹細胞を分離し、その解析を行う。【方法】消化器がん術後に採取された検体から、酵素処理を経てsingle cell浮遊液を調整し、血清非存在下浮遊培養にてsphere培養を、血清存在下付着培養にて serum培養を行った。Sphere 培養およびserum 培養により得られた細胞を解析するため、RNAを抽出し、幹細胞マーカーであるLGR5, OCT3/4, SOX2の発現を検討した。また、Micro-Arrayで両グループ培養した細胞のGene発現差を考量して新しい幹細胞Geneを探索する。【結果】今まで11症例の消化器がん(膵癌1例、胃がん2例、肝癌1例、大腸がん7例)を分離して、大腸がん腹膜転移症例と胃がんリンパ節転移の2症例細胞株を確率した。大腸がん腹膜転移のsphere培養ではLGR5,SOX2,OCT3/4発現量も高かった。【考察】今回得られたsphere培養は、プライマリーがん幹細胞解析を進める上で有効な手段である可能性が示唆された。

18. 肝細胞癌におけるKLF5による癌幹細胞制御機構

○佐藤史幸¹, 夏井坂光輝¹, 前原 経², 浅野彩華², 久保田良政¹, 出水孝章¹, 梅村真知子¹, 伊藤 淳¹, 常松聖司¹, 中井正人¹, 荘 拓也¹, 須田剛生¹, 森川賢一¹, 小川浩司¹, 大西俊介¹, 坂本直哉¹(北海道大学病院消化器内科¹, 北海道大学大学院薬学研究院臨床病態解析学研究室²)

【目的】Kruppel-like factor 5 (KLF5) は多くの癌でoncogeneとして作用する事が知られており、既報ではKLF5は癌幹細胞 (CSCs) の制御においても重要な役割を持つ可能性が示唆されているが、肝細胞癌におけるKLF5の機能については未だ報告はなく、肝細胞癌CSCsに対するKLF5の機能解明を目的に本研究を遂行した。

【方法】細胞株Huh7およびHepG2を用い、CSCsは抗CD44抗体と抗CD133抗体を用いて、fluorescence-activated cell sorting (FACS) により検出した。CD44,CD133が高発現の細胞集団(CD44^{high}/CD133^{high}細胞)をCSCsとしFACS Aria III (Becton Dickinson) により分離した。MTS assayにて5FU, CDDPに対する感受性を測定した。次世代シーケンサーを用いたRNA sequencingにより肝細胞癌CSCsにおける重要な遺伝子を網羅的に解析した。KLF5を過剰発現させたstable cell lineはレトロウイルスを用いて作成し、KLF5のknock-downにはsiRNAを用いた。腫瘍形成能はcolony formation assayにて評価した。

【結果】CD44^{high}/CD133^{high}細胞はCD44^{low}/CD133^{low}細胞に比べ5FU, CDDPに対し薬剤耐性を示し、colony形成能も有意に高かった。RNA sequencingによりCD44^{high}/CD133^{high}細胞とCD44^{low}/CD133^{low}細胞における遺伝子発現を網羅的に解析すると、2群間の遺伝子発現のプロファイルは大きく異なり、CD44^{high}/CD133^{high}細胞においてKLF5を含む500以上のmRNAが高発現していた。また、KLF5過剰発現細胞ではCD44^{high}/CD133^{high}細胞の比率が増加し、5FU, CDDPに対する薬剤耐性とcolony形成能の有意な増加を認めた。対照的にsiRNAでKLF5をknock-downすると、CD44^{high}/CD133^{high}細胞の減少を認めた。

【結論】KLF5は肝細胞癌においてCSCsを制御する重要な転写因子である事が明らかとなり、肝細胞癌CSCsに対する新規治療標的となり得る可能性が期待された。

19. 癌精巢抗原BORISの肺癌幹細胞様細胞における発現とBORIS抗原を標的とした免疫療法の検討

○堀部亮多^{1,2}, 廣橋良彦¹, 鳥越俊彦¹, 高橋弘毅², 佐藤昇志¹(札幌医科大学医学部病理学第一講座¹, 札幌医科大学医学部呼吸器・アレルギー内科学講座²)

BORIS (Brother of the regulator of imprinted sites) はCTCF (CCCTC-binding factor)の唯一の遺伝子パラログであり、精子形成に重要な役割を果たすことが報告されている。正常細胞では胚細胞のみに発現している一方で、癌細胞では肺癌を含む様々な癌腫での発現が確認されており、癌精巢抗原の側面も有する。そのため、癌免疫療法の理想的な標的となりうるものと考えられる。BORISはスプライシングバリエーションにより6つのsubfamilyに分けられるが、癌腫によりそのsubfamilyの発現様式が大きく異なることも報告されている。我々は、肺癌の各種細胞株、臨床検体のadhesion culture及びsphere cultureで得られた細胞を用い、BORIS各subfamilyの遺伝子発現をそれぞれRT-PCRで確認した。その結果、癌細胞において自己複製能、多分化能、高い造腫瘍能を有する亜集団である癌幹細胞様細胞 (CSCs) の性質を有すると考えられているsphere culture側でBORIS subfamily 5,6の発現増強が高頻度に認められることを確認した。これらのBORIS抗原を標的とした癌免疫療法の検討のため、subfamily 5,6におけるBORIS抗原ペプチドを特定し、向ペプチドを認識する細胞障害性T細胞 (CTL) の誘導を試み、それぞれのCTLクローンを樹立した。それらCTLクローンに対する肺癌細胞の反応性、抗腫瘍効果等に関して検討した結果を報告する。

20. 子宮体癌における癌幹細胞の探求

○田湖雄大^{1,2}, 廣橋良彦¹, 鳥越俊彦¹, 齋藤 奈², 佐藤昇志¹(札幌医科大学医学部病理学第一講座¹, 札幌医科大学医学部産婦人科学講座²)

はじめに近年本邦においては子宮体癌症例の増加が懸念されており、特に進行癌では再発や転移により治療に難渋することも日常臨床で経験される。癌細胞は癌幹細胞と非癌幹細胞に分けて考えることができ、癌幹細胞は自己複製能や多分化能を有し、抗腫瘍治療や放射線療法に耐性を持ち、このことが癌の進行や再発の原因となっていると考えられている(癌幹細胞仮説)。つまり、非癌幹細胞を既存の治療で除去できても、生き延びた少数の癌幹細胞が再発に関与するという考え方である。今回我々は、手術で摘出された子宮体癌組織から癌細胞を採取・培養し、癌幹細胞の同定・解析を試みている。方法・結果摘出された癌組織を蛋白質分解酵素などを用いて処理した後に、ウシ胎児血清を添加した接着培地と、血清を添加しない非接着培地の二通りの方法で培養した。癌幹細胞は血清なしの非接着培地でも増殖し、楕円体を形成する特徴があるとされる(sphere forming assay)。これまで4症例においてsphere forming assayを試みており、3例ではsphereを形成できなかったが、1例でその形成に成功した。接着培地で増殖した非癌幹細胞と非接着培地で増殖した癌幹細胞をさまざまな方法で比較、解析を行っている。癌幹細胞は非癌幹細胞よりも腫瘍形成能が高いとされているため、これらの細胞を免疫不全マウスに移植し、腫瘍サイズを計測して腫瘍形成能の比較を行っている(mouse xenograft assay)。また、幹細胞マーカーとされるALDH1A1, Nanog, Oct3/4, SOX2, CD44などを用いてreal time PCR法により非癌幹細胞と癌幹細胞での遺伝子発現量の差に関して検討を行っている。これらの検討を複数症例で行い、癌幹細胞をDNAマイクロアレイにて遺伝子発現プロファイルの検討を行い、癌幹細胞における特異的な遺伝子を特定していく予定である。まとめ将来的には癌幹細胞をターゲットにした新たな治療戦略の構築が目標であるが、今回はその研究の進捗状況を報告する。

21. 膵管腺癌細胞は細胞分裂時にCD44v9とMDR1の発現を亢進させる

○池下隼司, 木内静香, 宮武由甲子, 笠原正典(北海道大学大学院医学研究科病理学講座分子病理学分野)

膵癌のほとんどは、膵管上皮から発生する膵管腺癌(PDAC)であり、診断時にすでに進行癌であることも多く、5年生存率は10%前後と極めて低い。その要因として、PDAC細胞の高い浸潤・転移能、治療抵抗性などが挙げられる。癌組織中には癌の発生・再発の原因となる癌幹細胞がこくわずかに存在すると考えられている。重要な癌幹細胞マーカーであるCD44は、CD44スタンダード(CD44s)のほかにも多くのバリエーション(CD44v)が存在する。中でもCD44v8-10は、強力な活性酸素抑制作用があり癌治療抵抗性に関与する。また、CD44vからCD44sへの移行が上皮間葉転換(EMT)に重要な役割を果たすことが報告されている。本研究にて、5種のPDAC細胞株についてCD44発現パターン解析を行ったところ、E-cadherin陽性の上皮系形質を持つCD44v high PDAC細胞株(3種)とVimentin陽性の間葉系形質を持つCD44s high PDAC株(2種)の2つのフェノタイプが存在した。CD44v high PDAC細胞株では、細胞分裂期の前期から終期にかけて、細胞膜表面におけるCD44v9の発現亢進を認められたが、細胞質分裂時や間期では発現が低下していた。CD44v high PDAC細胞株からCD44v9陰性細胞を分離培養したところ、同様の細胞分裂前期から終期におけるCD44v9の発現亢進を再び認めた。さらにCD44v high PDAC細胞株では、細胞分裂時における α -tubulin陽性像に一致して多剤耐性因子MDR1の細胞内発現も観察された。以上より、EMTを起こしていないPDAC細胞では、細胞分裂時にCD44v9とMDR1の発現が亢進することが明らかとなった。これは、PDAC細胞の分裂期特異的な難治性性質獲得を示唆するものであり、膵癌治療抵抗性の新たな原因の一つとなり得ると考えられる。