

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 新規バイオマーカーPRDM14による難治性乳がん・すい臓がんの診断法の開発
(英語) Development of the diagnosis methods using PRDM14 as a novel tumor marker for intractable breast cancer and pancreatic cancer.

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人 東京大学医科学研究所 特任研究員 今井 浩三
所属 役職 氏名： (英語) Kohzoh Imai: Project Researcher, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

実施期間： 平成26年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 統合的オミックス解析による診断バイオマーカー同定、トリプルネガティブ乳がん臨床検体でのPOC取得
開発課題名： (英語) Identification of diagnostic biomarkers by integrated-omics analysis and acquirement of the proof-of-concept (POC) in clinical samples of triple negative breast cancer.

研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人がん研究会 がんプレジジョン医療研究センター リキッドバイオプシー診断開発プロジェクト 部長 前佛 均
所属 役職 氏名： (英語) Hitoshi Zembutsu : Chief of Project for Development of Liquid Biopsy Diagnosis, Cancer Precision Medicine Center, Cancer Institute.

分担研究 (日本語) 病理診断バイオマーカー同定、乳がん・膵臓がん臨床検体でのPOC取得、CTC分取・解析
開発課題名： (英語) Discovery and establishment of biomarkers for immunohistochemical diagnosis.

研究開発分担者 (日本語) 神奈川県立がんセンター臨床研究所 がん分子病態学部
総括部長 宮城 洋平

所属 役職 氏名 : (英 語) Yohei Miyagi: General Chief, Molecular Pathology and Genetics
Division, Kanagawa Cancer Center Research Institute.

分担研究 (日本語) 統合的オミックス解析による診断バイオマーカー同定、CTC 分取・解析
開発課題名 : (英 語) Identification of biomarker via omics analysis, and fractionation and
analysis of circulating tumor cells.

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医科学研究所附属病院 抗体ワクチンセンター
特任准教授 谷口 博昭

所属 役職 氏名 : (英 語) Hiroaki Taniguchi: Project associate professor, The Institute of Medical
Science, The University of Tokyo.

II. 成果の概要（総括研究報告）

【和文】

初年度

PRDM14 分子は、難治性のがんであるトリプルネガティブ乳がん(TNBC) や膵臓がん(PC) において発現亢進する特性を有しており、難治性がんを対象とした診断バイオマーカーとして最適な候補といえる。PC においては、早期検出可能なバイオマーカーの欠如、抗がん剤耐性、遠隔転移が難治性の要因となっている。PRDM14 がこれらの診断バイオマーカーとして有効性が高いと十分推察される下記の成果を得た。

- ① 乳がん臨床検体 (TNBC 含む) による PRDM14 分子の mRNA による発現解析を進め、腫瘍特異的に発現を認めた。
- ② PC 臨床検体においても PRDM14 分子の mRNA 発現解析により、腫瘍特異的に発現を認めた。
- ③ がん細胞において PRDM14 分子は抗がん剤耐性・転移に関与する。
- ④ 乳がん臨床検体を使用した発現マイクロアレイによるスクリーニングを行った。PRDM14 と強い発現相関をもつ遺伝子で分泌タンパク遺伝子にカテゴライズされる遺伝子の候補を複数見出した。
- ⑤ サスペンションアレイ解析により、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子（血清診断バイオマーカー候補）のスクリーニングを開始した。

次年度

初年度の研究をさらに進めて以下の成果を得た。

- ① PRDM14 分子は核内転写因子であるため組織診断が必要となる。組織診断に用いることが至適な抗体を 7 種の中から Biacore 法、病理組織学的判定による絞り込みを開始。
- ② PRDM14 と強い発現相関をもつ遺伝子で分泌タンパク遺伝子にカテゴライズされる候補遺伝子から、複数の遺伝子発現マイクロアレイのセットを用いて再現性がある候補遺伝子を絞り込んだ。
- ③ 患者血清を用いたサスペンションアレイ法により、複数の血清診断バイオマーカー候補が得られた。
- ④ ②③によるスクリーニングで得られた血清診断バイオマーカー候補の一部の分子に関して、患者血清を用いた ELISA 法によるバリデーションを開始した。
- ⑤ PRDM14 分子の発現亢進が前がん病変組織の一部で認められた。
- ⑥ PRDM14 分子が腫瘍の転移にも強く関与する。そこで、EpCAM により分取された Circulating Tumor Cells (CTC) を用いて、PRDM14 遺伝子増幅の有無を FISH 法により検出した。

最終年度

- ① 臨床検体数を増やし、PRDM14 分子を病理組織診断に用いて病理組織学的因子との関連の解析を完了した。
- ② 複数の血清診断バイオマーカー候補に関して市販の ELISA キットを用いてバイオマーカー候補の分泌タンパク量と PRDM14 分子の相関性のバリデーションを完了した。

- ③ 前がん病変を対象に PRDM14 分子の発現解析を実施した。*in vivo* 慢性膵炎モデルによる検証を実施した。
- ④ 実際の乳がん、膵臓がんの患者の血液を用いて、CTC が分取し細胞免疫染色に使用できる PRDM14 抗体を使用し、PRDM14 陽性 CTC を検出できた。
- ⑤ 診断バイオマーカーの特許申請の準備を行った。

【英文】

The first year:

PRDM14 is elevated in pancreas cancer (PC) and breast cancer, including triple negative breast cancer (TNBC). In contrast, PRDM14 is not expressed in normal differentiated tissues. Therefore, PRDM14 could be a good candidate for these tumor markers. It is difficult to treat pancreatic cancer, because there are no diagnostic markers from early stage of pancreatic cancer. We obtained the results using PRDM14 or PRDM14-related molecules as useful diagnostic markers of PC and TNBC, indicated below:

1. PRDM14 mRNA is elevated in clinical breast cancers, including TNBC. In contrast, PRDM14 is not expressed in normal differentiated tissues.
2. PRDM14 mRNA is elevated in clinical pancreatic cancers.
3. PRDM14 conferred phenotypes of the resistance to anticancer agents and metastatic ability to cancer cells.
4. We conducted a screening for candidate genes with strong correlation to the expression of PRDM14 and belonging to secretory proteins using one expression data set via cDNA microarray. Then, we detected several candidate genes with strong correlation to the expression of PRDM14.
5. We also started a screening for candidate genes with strong correlation to the expression of PRDM14 via the serum analysis in patients using suspension array system.

The second year:

Based on the results of previous year, we proceeded to the next stage and obtained the results indicated below:

1. We selected the antibody used for pathological diagnosis of paraffin sections from 7 antibodies using method of surface plasmon resonance (SPR) and of immunohistological analysis.
2. We conducted a screening for candidate genes with strong correlation to the expression of PRDM14 and belonging to secretory proteins using several expression data sets via cDNA microarray. Then, we reduced the number of the several candidate genes.
3. We obtained several serum markers with strong correlation to the expression of PRDM14 using suspension array system.
4. We integrated data from the results of candidate genes based on cDNA microarray and several serum markers using suspension array system. After that, we started to validate the candidate serum markers with patient' serum using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

5. PRDM14 expression is elevated among patients with early stages of cancers, including those with precancerous lesions.
6. PRDM14 conferred phenotypes of distant metastasis on breast and pancreatic cancer cells. Then, we separated circulating tumor cells from patients' total blood with EpCAM antibody, and could detect circulating tumor cells with PRDM14 gene amplification by fluorescence in situ hybridization.

The final year:

Based on the results of previous year, we proceeded to the next stage and obtained the results indicated below:

1. We finished to analyze the relationship between PRDM14 expression and clinicopathological factors by immunohistochemistry using clinical breast and pancreatic cancer tissues.
2. We validated the several candidate serum markers with ELISA kits and estimated the relationship between PRDM14 expression and candidate serum markers. We could predict the expression levels of PRDM14 in breast cancer tissues using the combination of three serum markers.
3. Using *in vivo* model, we found that PRDM14 expression is elevated from early stages of cancers.
4. We separated circulating tumor cells from patients' total blood with the anti-EpCAM antibody, and could detect circulating tumor cells with expression of PRDM14 protein in the peripheral blood by immunocytochemistry.
5. We are preparing for applying a patent for diagnostic biomarkers.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 10 件)

1. Taniguchi H, Hoshino D, Moriya C, Zembutsu H, Nishiyama N, Yamamoto H, Kataoka K, Imai K. Silencing PRDM14 expression by an innovative RNAi therapy inhibits stemness, tumorigenicity, and metastasis of breast cancer. *Oncotarget*. 2017, 16776. [Epub ahead of print].
2. Moriya C, Taniguchi H, Imai K. Inhibition of PRDM14 expression in pancreatic cancer suppresses cancer stem-like properties and liver metastasis in mice. *Carcinogenesis*, 2017, in press.
3. Tsuji S, Washimi K, Kageyama T, Yamashita M, Matsuura R, Yokose T, Kamada Y, Hayashi H, Morohoshi T, Tsuura Y, Yusa T, Sato T, Togayachi A, Narimatsu H, Nagasaki T, Nakamoto K, Moriwaki Y, Misawa H, Hiroshima K, Miyagi Y, Imai K. HEG1 is a novel mucin-like membrane protein that serves as a diagnostic and therapeutic target for malignant mesothelioma. *Scientific Reports*, 2017, 7:45768.
4. Matsunaga Y, Adachi Y, Sasaki Y, Koide H, Motoya M, Nosho K, Takagi H, Yamamoto H, Sasaki S, Arimura Y, Tokino T, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The effect of forced

expression of mutated K-RAS gene on gastrointestinal cancer cell lines and the IGF-1R targeting therapy. *Mol Carcinogen*, 2017, 56(2):515-526.

5. Taniguchi H, Moriya C, Igarashi H, Saitoh A, Yamamoto H, Adachi Y, Imai K. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer. *Cancer Sci*, 2016, 107(11):1556-1562.
6. Shimada N, Ishiki H, Iwase S, Chiba T, Fujiwara N, Watanabe A, Kinkawa J, Nojima M, Tojo A, Imai K. Cancer transitional care for terminally ill cancer patients can reduce the number of emergency admissions and emergency department visits. *Am J Hosp Palliat Med*, 2016, Epub ahead of print.
7. Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Kitajima H, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Yamano H, Sugai T, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Suzuki H. A genomic screen for long noncoding RNA genes epigenetically silenced by aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Scientific Reports*, 2016, 6:26699.
8. Kurihara H, Maruyama R, Ishiguro K, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Mitsuhashi K, Igarashi H, Ito M, Tanuma T, Sukawa Y, Okita K, Hasegawa T, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y, Nosho K. The relationship between EZH2 expression and microRNA-31 in colorectal cancer and the role in evolution of the serrated pathway. *Oncotarget*, 2016, 7(11):12704-17.
9. Nosho K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Igarashi H, Maruyama R, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2016, 22:557-66.
10. Goto A, Noto H, Noda M, Ueki K, Kasuga M, Tajima N, Ohashi K, Sakai R, Tsugane S, Hamajima N, Tajima K, Imai K, Nakagama H. Report of the Japan diabetes society/Japanese cancer association joint committee on diabetes and cancer, Second report. *Cancer Sci*, 2016, 107(3):369-71.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. PRDM14発現抑制による乳腺腫瘍の形成・転移の抑制とPRDM14新規腫瘍マーカーとしての可能性, ポスター, 谷口博昭, 森谷千春, 山本博幸, 今井浩三. 第75回日本癌学会学術総会 2016/10/07, 国内 (パシフィコ横浜)
2. 転写因子Xは大腸癌の幹細胞性を誘導し悪質形質を促進する, ポスター, 五十嵐央祥, 谷口博昭, 森谷千春, 斎藤杏里, 宮城洋平, 今井浩三. 第75回日本癌学会学術総会 2016/10/06, 国内 (横浜、パシフィコ横浜)
3. PRDM14標的siRNAは膵管癌のがん幹細胞様形質を抑制し、肝転移を減少させる, ポスター, 森谷千春, 谷口博昭, 今井浩三. 第75回日本癌学会学術総会 2016/10/06, 国内 (横浜、パシフィコ横浜) .
4. 液性検体の質とTime Stamp. シンポジウム 宮城洋平. 臨床検査と液性試料 (検体) : 質の観点から. 第63回日本臨床検査医学会学術集会, 2016/09/02, 国内 (神戸、神戸国際会議場).

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 生命科学研究の最前線「いのちのしくみに迫り、健康を守る」、市民公開シンポジウム、今井浩三（主催：生命科学連携推進協議会研究支援代表者）、2017/1/15、国内（東京、日本橋ライフサイエンスビルディング）。

(4) 特許出願

なし

