

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年8月27日(27.08.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/170446 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/6897 (2018.01) C12N 15/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2019/006886

(22) 国際出願日:

2019年2月22日(22.02.2019)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(71) 出願人: 国立大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).

(72) 発明者: 五十嵐 和彦 (IGARASHI, Kazuhiko); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 松本 光代 (MATSUMOTO, Mitsuyo); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 佐藤 正規 (SATO, Masaki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 西澤 弘成

(NISHIZAWA, Hironari); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).

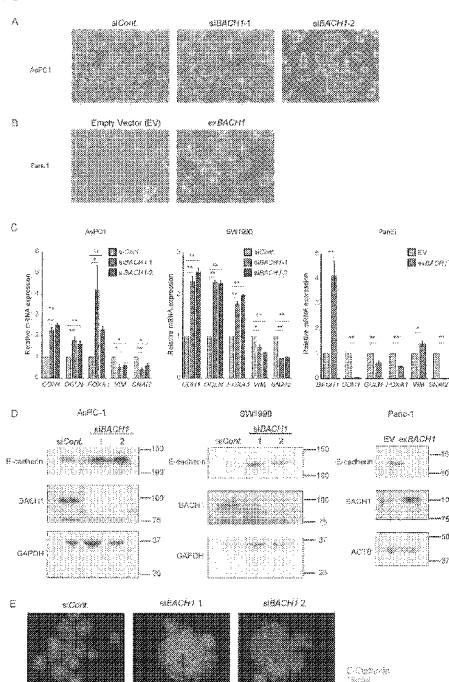
(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所 (IP FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス 2 1ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: NOVEL MARKER OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN PANCREATIC CANCER

(54) 発明の名称: 新規膵臓癌上皮間葉移行マーカー

[図3]



(57) Abstract: To clarify the pancreatic cancer malignant alteration mechanism by BACH1, the present inventors disclosed a change in gene expression depending on the expression amount of BACH1 in a pancreatic cancer cell line by an RNA sequencing method. As the results of in vitro examinations on migration capability and infiltration capability and an in vivo orthotopic implantation test, the present inventors further indicated that BACH1 is usable, either alone or in combination with FOXA1 that is a downstream regulatory factor thereof, as an excellent biomarker of epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer.

(57) 要約: BACH1の膵臓癌悪性化機序の解明のため、膵臓癌細胞株におけるBACH1の発現量による遺伝子発現変化をRNAシーケンス法によって明らかにした。さらにin vitroでの遊走能や浸潤能およびin vivoでの同所移植実験を行った結果、BACH1は単独、またはその下流制御因子FOXA1との組み合わせによって、膵臓癌の上皮間葉移行の優れたバイオマーカーとして利用できることを示した。

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：新規膵臓癌上皮間葉移行マーカー

技術分野

[0001] 本発明は、膵臓癌の上皮間葉移行能の評価のための方法、膵臓癌の転移能又は浸潤能の評価のための方法、膵臓癌の予後予測のための方法、膵臓癌転移抑制剤、及び膵臓癌転移抑制剤のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 膵臓癌は主に膵管上皮に発生する癌で、診断後の5年生存率は10%以下と最も予後不良の癌である。外科的切除のみが根治を期待できる治療法であるが、早期発見が難しく、診断時に80%の症例は手術不能であり、悪性度も高いため化学療法も効果が乏しいなど有効な診断法、治療法が少ないのが現状である。

[0003] 膵臓癌の発生機序については理解が進んでおり、1950年代から病変の病理学的観察から多段階発癌仮説が考えられてきた。近年のパワフルなゲノム変異解析は膵臓癌発癌過程に対応した変異遺伝子の蓄積を明らかにし、現在では発癌が変異遺伝子の蓄積に起因するという多段階発癌説（Genetic progression model）が受け入れられている。この発癌過程の中で前癌病変早期から認められる変異にKRAS遺伝子の変異があり、膵臓癌の90%以上はKRAS変異を持つことが分かっている。KRASは通常、受容体型チロシンキナーゼ受容体への外部刺激応答として、GTPが結合することで活性化し、RAS/RAF/MEK/ERKシグナル伝達経路を促進することで細胞増殖、アポトーシス、分化といった細胞応答を惹起する。またその活性はGTPが加水分解されGDPとなることで停止する。しかし、癌に見られるKRAS遺伝子変異の多くはこのGTPの加水分解を阻害し常に活性化状態を保つことになり、癌細胞の増殖、悪性化を促進する。この活性化RAS変異は膵臓癌以外にも全てのヒトの癌の約30%に含まれる。従って、これまでRASとGTPの競合阻害剤といったRASを標的とした阻害剤の研究は精力的にすすめられているが、GTPやGDPが細胞内に高濃度に存在するなどの

理由から十分な効果は得られず、いずれも臨床応用はされていない。

[0004] 従って、更なる膵臓癌悪性化メカニズムの解明が重要であるが、転移や再発に特異的な遺伝子変異はいまだ同定されていない。また、転移能獲得における原発腫瘍での遺伝子の発現変動やシグナル伝達の変化、さらに転移促進因子として、癌細胞の自己複製や上皮間葉移行だけでなく、癌周囲環境の影響も考えられているが、未だ不明な点が多い。

[0005] BACH1 (BTB and CNC homology 1) は、正常状態において酸化ストレスを軽減するヘムオキシゲナーゼ-1 (Heme oxygenase-1: HO-1) などの遺伝子発現を抑制しており、酸化ストレス下において核外へ排出されることで、活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の上昇を抑えるなど細胞のホメオスタシス維持に寄与している (非特許文献 1)。また BACH1 は癌抑制転写因子 p53 と複合体を形成することで、その標的遺伝子の一部の発現を抑制し、細胞老化を抑制する (非特許文献 2)。変異型 Ras を導入したマウス胚性線維芽細胞 (MEFs) をマウス皮下に移植した実験では、Bach1 欠損型 MEFs では野生型 MEFs に比べて腫瘍の形成、増殖が著しく阻害される (非特許文献 3)。BACH1 と癌の関係では、BRAF 変異を有する大腸癌や悪性黒色腫において BACH1 が CpG island のメチル化を促進し、癌抑制遺伝子の発現を抑制するとの報告を認める (非特許文献 4)。また乳癌においては、BACH1 が転移に関係する複数の遺伝子発現を制御することにより骨転移促進的に働くとの報告もある (非特許文献 5)。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献 1: Nat Rev Immunol, 2017. 17(7): p.437-450

非特許文献 2: Nat Struct Mol Biol, 2008. 15(12): p.1246-54

非特許文献 3: Oncogene, 2013. 32(27): p.3231-45

非特許文献 4: Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. 113(5): p.1250-5

非特許文献 5: J Biol Chem, 2012. 287(40): p.33533-44

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、新規の膵臓癌上皮間葉移行マーカー、膵臓癌転移又は浸潤マーカー、膵臓癌予後マーカー、膵臓癌転移抑制剤、及び膵臓癌転移抑制剤のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、BACH1に注目し、癌ゲノムアトラス（The Cancer Genome Atlas、TCGA）のデータベースを用いて、BACH1の発現と膵臓癌の予後との関係を検討して見たところ、BACH1高発現の膵臓癌において有意に予後が悪いという結果を得た。これらの知見からBACH1が膵臓癌の悪性化に寄与していることが考えられた。さらにヒト膵臓癌組織検体におけるBACH1の免疫染色の結果もBACH1高発現において予後が悪化した。

そのため、本研究では、BACH1の膵臓癌悪性化機序の解明のため、膵臓癌細胞株におけるBACH1の発現量による遺伝子発現変化をRNAシーケンスによって明らかにした。上皮間葉移行に注目し、*in vitro*での遊走能や浸潤能および*in vivo*での同所移植実験を展開した。また、BACH1はその下流制御因子との組み合わせによって、膵臓癌の上皮間葉移行の優れたバイオマーカー、膵臓癌の転移又は浸潤の優れたバイオマーカー、及び膵臓癌の予後予測のための優れたバイオマーカーとして利用できることを示した。

さらに、BACH1による転移関連遺伝子の発現を制御することにより、膵臓癌転移を抑制できることを示し、またその膵臓癌転移を抑制できる薬剤をスクリーニングする方法について示した。

[0009] 上記のような知見に基づき、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] BACH1の発現量を測定する工程を含む、膵臓癌の上皮間葉移行能を*in vitro*で評価するための方法（データ取得法）。

[2] さらに、FOX A1の発現量を測定する工程を含む、[1]の膵臓癌の上皮間葉移行能を*in vitro*で評価するための方法（データ取得法）。

[3] BACH1の発現量を測定する工程を含む、膵臓癌の転移能又は浸潤能を*in*

vitroで評価するための方法（データ取得法）。

〔4〕さらに、FOX A1の発現量を測定する工程を含む、〔3〕の膵臓癌の転移能及び浸潤能をin vitroで評価するための方法（データ取得法）。

〔5〕BACH1の発現量を測定する工程を含む、膵臓癌の予後をin vitroで予測するための方法（データ取得法）。

〔6〕さらに、FOX A1の発現量を測定する工程を含む、〔5〕の膵臓癌の予後をin vitroで予測するための方法（データ取得法）。

〔7〕BACH1遺伝子またはBACH1遺伝子のプロモーターに連結されたレポーター遺伝子を発現する細胞に医薬候補物質を添加する工程、BACH1遺伝子またはレポーター遺伝子の発現量を測定する工程、及び前記発現量を低下させる物質を選択する工程を含む、膵臓癌転移抑制剤をスクリーニングする方法。

〔8〕BACH1遺伝子の発現を低下させる薬剤を有効成分とする、膵臓癌転移抑制剤。

〔9〕膵臓癌細胞の上皮間葉移行能を阻害する、〔8〕の膵臓癌転移抑制剤。

〔10〕前記薬剤がBACH1遺伝子に対するsiRNAである、〔8〕または〔9〕の膵臓癌転移抑制剤。

発明の効果

〔0011〕 本発明により、膵臓癌の上皮間葉移行能評価のためのデータ、膵臓癌の転移能又は浸潤能評価のためのデータ、及び膵臓癌の予後予測のためのデータを取得することが可能となり、膵臓癌の予後を診断することが可能となる。また、膵臓癌転移抑制剤、及び膵臓癌転移抑制剤のスクリーニングをすることが可能となる。

図面の簡単な説明

〔0012〕〔図1〕BACH1は膵臓癌の予後予測因子であることを示す。(A)TCGAデータベースより入手した臨床情報が付加された膵管癌176件のRNAシーケンスのデータをBACH1の発現量に基づいたROC曲線より求めたカットオフ値で2群に分類し(左)、分類した2群間でのカプランマイヤー法による全生存期間の解析を行った(

右)。(B)抗ヒトBACH1抗体を用いて膵臓癌臨床検体166例の免疫組織化学を行い、染色割合により3群に分類した(weak:陽性率10%未満, moderate:陽性率10%~50%, strong:陽性率50%以上)。本分類における代表的な染色像を示す(倍率, 200倍)。なお、この後の解析ではweakとmoderateをBACH1低発現群、strongをBACH1高発現群として分類した。(C)免疫組織化学のBACH1高発現群と低発現群においてカプランマイヤー法にて全生存期間を解析した。P値はログ・ランク検定により求めた。

[図2]BACH1はin vitroにおける膵臓癌細胞の増殖に影響しないことを示す。(A)BACH1をノックダウン (siBACH1) した膵臓癌細胞株 (AsPC1及びSW1990) とそれらのコントロールとなる細胞 (siCont.) においてRT-qPCR法により検出したBACH1の発現量を示す。各実験は独立して3回以上行っており、カラム図には実験毎の値をドット、平均値をカラム、標準誤差をバーとして示した。統計学的有意差の検定はStudentのt検定により行い、P値を示した(**: $P < 0.01$)。 (B)BACH1ノックダウン (siBACH1) 後のAsPC1及びSW1990並びにそれらのコントロールとなる細胞 (siCont.) の細胞数を24時間毎に72時間まで経時的に計測することで、細胞増殖の変化を折れ線グラフとして示す。実験は独立して4回行い、平均値を折れ線、標準誤差を各計時点においてバーとして示した。統計学的有意差の検定はStudentのt検定により行った(n.s.: not significant)。

[図3]BACH1は膵臓癌細胞の間葉系形質を促すことを示す。(A)BACH1ノックダウン (siBACH1) AsPC1と、(B)BACH1を過剰発現した膵臓癌細胞株 (Panc1) の細胞形態を顕微鏡像として示す。スケールは100 μm を示す。(C)BACH1ノックダウン (siBACH1) AsPC1及びSW1990並びにBACH1過剰発現 (exBACH1) Panc1、及びそれらのコントロール細胞 (siCont. 又はEV) における上皮系遺伝子 (CDH1 (Cadherin 1)、OCLN (Occludin) 及びFOXA1 (Forkhead Box A1)) と間葉系遺伝子 (VIM (Vimentin) 及びSNAI2 (Snail Family Transcriptional Repressor 2)) の発現を示す。各遺伝子はRT-qPCR法によって検出された。各因子のmRNA発現量は、 β -actin (ACTB) のmRNA発現量で補正した。実験は独立して3回行い、実験

毎の平均値をカラム、標準誤差をバーとして示した。統計学的有意差の検定はStudentのt検定により行い、P値を示した(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)。(D) BACH1ノックダウン(siBACH1)AsPC1及びSW1990並びにBACH1過剰発現(exBACH1)Panc1、及びとそれらのコントロール細胞(siCont. 又はEV)におけるE-cadherin、BACH1および内部標準タンパク質として、GAPDH又はACTBのウエスタンブロット図(写真)を示す。(E) BACH1ノックダウン時のE-cadherinの免疫蛍光染色像を示す。スケールは25 μm を示す。

[図4] BACH1はin vitroにおいて膵臓癌細胞株の遊走能と浸潤能を亢進させることを示す。(A) BACH1ノックダウン(siBACH1)AsPC1及びそのコントロール細胞(siCont.)、(B) 過剰発現(exBACH1)Panc1及びそのコントロール細胞(EV)におけるスクラッチアッセイの代表的な顕微鏡像と計測した細胞の移動度をカラム図として示す。(C) BACH1ノックダウンAsPC1及びSW1990のトランスウェルアッセイとインベーションアッセイの代表的な顕微鏡像と遊走又は浸潤した細胞数をカラム図として示す。各実験は独立して3回以上行っており、カラム図には実験毎の値をドット、平均値をカラム、標準誤差をバーとして示した。統計学的有意差の検定はStudentのt検定により行い、P値を示した(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)。

[図5] BACH1ノックアウトAsPC1細胞株の樹立を示す図である。(A) 2種類のガイドRNAより樹立したそれぞれのクローン(sgBACH1-1及びsgBACH1-2)の標的部位におけるDNAシーケンス結果を示す。2種類のガイドRNAはBACH1遺伝子のエクソン2内部配列をその標的として、sgBACH1-1は13bpの塩基欠損、sgBACH1-2は1塩基の挿入変異をそれぞれ目的としてデザインされた。なお、リファレンス配列はヒトリファレンスゲノムであるhg19を用いた。(B) BACH1ノックアウト(sgBACH1)AsPC1およびそのコントロール細胞(sgCont.)のBACH1、E-cadherinおよびその内部標準としてGAPDHのウエスタンブロット図(写真)を示す。(C) BACH1ノックアウトAsPC1のRT-qPCRの結果を示す。各因子のmRNA発現量は、ACTB mRNA発現量で補正した。実験は独立して3回行い、図には実験毎の値をドット、平均値をカラム、標準誤差をバーとして示した。統計学的有意差の検定

はStudentのt検定により行い、P値を示した(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, n.s.: not significant)。(D)ガイドRNA sgBACH1-2を用いて作出されたBACH1ノックアウトAsPC1のBACH1と、(E)E-cadherinの免疫蛍光染色像を示す。スケールはそれぞれ7.5 μm と75 μm を示している。

[図6]BACH1はin vivoにおいて転移を促進するが、腫瘍形成には影響しないことを示す。(A)BACH1ノックアウト(sgBACH1-2)AsPC1又はそのコントロール(sg Cont.)細胞をNOGマウス(BACH1野生型AsPC1: $n=17$, BACH1ノックアウトAsPC1: $n=18$)の膵臓へ移植し、5週後の膵臓に形成された腫瘍、肝転移、腸間膜への播種の代表例をそれぞれ示す。白線で囲まれた領域は膵臓に形成された腫瘍を示し、白の矢印は転移巣を示した。(B)摘出した膵臓の重量と肝転移個数、腹膜転移個数をそれぞれ箱ひげ図として示す。箱の下端はデータの25%、上端は75%、中央の線は中央値を示し、ヒゲはそれぞれ最大値と最小値を示した。統計学的有意差の検定はStudentのt検定を用い、P値を算出した。

[図7]BACH1はその機能評価を加えることでより正確な膵臓癌の予後予測マーカーなることを示す。(A)TCGAデータベースより入手した176検体のRNAシーケンスのデータをFOX A1、(B)BACH1及びFOX A1それぞれの発現量に基づいたROC曲線より求めたカットオフ値で2群又は4群に分類し、分類した群間での Kaplan-Meier法による全生存期間の解析を行った。統計学的有意差の検定はログ・ランク検定により行い、P値を示した。

発明を実施するための形態

[0013] <膵臓癌の上皮間葉移行能を評価するための方法>

本発明は、BACH1の発現量を測定する工程を含む、膵臓癌の上皮間葉移行能をin vitroで評価するための方法（データ取得法）を提供する。

[0014] BACH1遺伝子は、被検対象に由来する遺伝子であればよいが、具体的には、下記に示す塩基配列を含む遺伝子が例示される。

[0015] BACH1遺伝子の塩基配列は、被検対象がヒトである場合は配列番号1に記載する塩基配列が例示される。また、BACH1遺伝子は転写因子としての機能を有するタンパク質をコードする限り配列番号1に記載する塩基配列の相補配列を

有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAが含まれる。ここで、ストリンジェントな条件としては、例えば、 $0.1\times\text{SDS}$ 、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 68°C の条件で洗浄する条件が挙げられる。また、被検対象として異なる動物を使用する場合は、該動物由来のホモログ遺伝子が測定対象となる。

[0016] BACH1タンパク質は、被検対象に由来するタンパク質であれば限定されないが、具体的には、下記に示すアミノ酸配列を含むタンパク質が例示される。さらにBACH1タンパク質には、該タンパク質と同様の膵臓癌関連性を有するタンパク質断片、類似体、及び変異体も包含される。

[0017] BACH1タンパク質のアミノ酸配列は、被検対象がヒトである場合は配列番号2に記載するアミノ酸配列が例示される。また、転写因子としての機能を有するタンパク質である限り、このアミノ酸配列において、1または数個（例えば1〜20個）のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質でもよい。また、被検対象として異なる動物を使用する場合は、該動物由来のホモログタンパク質が測定対象となる。

[0018] 本発明は、さらに上皮系細胞マーカーの発現量を測定する工程を含んでもよい。

上皮系細胞マーカーとしては、例えばFOXA1 (Forkhead Box Protein A1)、OCLN(Occludin)、PKP2(Plakophilin 2)、CLDN3(Claudin 3)、又はCLDN4(Claudin 4)が挙げられる。好ましくは、上皮系細胞マーカーはFOXA1である。

この工程は、これらの上皮系細胞マーカーからなる群から選択される1つの上皮系細胞マーカーの発現量を測定する工程であってもよく、これらの2つ以上の上皮系細胞マーカーの発現量を測定する工程であってもよい。

[0019] FOXA1の塩基配列は、被検対象がヒトである場合は配列番号3に記載する塩基配列が例示される。また、FOXA1遺伝子は転写因子としての機能を有するタンパク質をコードする限り配列番号3に記載する塩基配列の相補配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAが含まれる。ここで、ストリンジェントな条件としては、例えば、 $0.1\times\text{SDS}$ 、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 68°C の条件で洗浄する条件が挙げられる。また、被検対象として異なる動物を使

用する場合は、該動物由来のホモログ遺伝子が測定対象となる。

[0020] FOXA1のアミノ酸配列は、被検対象がヒトである場合は配列番号4に記載するアミノ酸配列が例示される。また、転写因子としての機能を有するタンパク質である限り、これらのアミノ酸配列において、1又は数個（例えば1～20個）のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質でもよい。また、被検対象として異なる動物を使用する場合は、該動物由来のホモログタンパク質が測定対象となる。

[0021] BACH1及びFOXA1の発現量を測定するとは、特に限定されることはないが、例えばこれらのmRNA又はタンパク質の発現量を測定することである。

BACH1遺伝子及びFOXA1遺伝子の発現量は、例えば定量PCR法、RT-PCR法、定量RT-PCR法、マイクロアレイ法、ハイスループットシーケンス法、ノーザンブロット法、分光光度法、蛍光光度法により測定することができ、またBACH1タンパク質及びFOXA1タンパク質の発現量を、例えばフローサイトメトリ法、ウエスタンブロット法、ELISA法、その他の免疫化学的手法により測定することができる。

[0022] BACH1遺伝子又はFOXA1遺伝子のコード領域の塩基配列である配列番号1又は配列番号3に記載する配列を利用して遺伝子発現解析用のプライマーやプローブ等を設計又は取得することができる。前記塩基配列は、配列番号1又は配列番号3に記載する塩基配列とそれぞれ90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上の同一性を有するものであってよい。また、前記プライマーやプローブ等は、前記塩基配列と特異的に結合できる限り、前記塩基配列の相補配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上の同一性を有するものであってよい。

[0023] 定量PCR法は常法により行うことができ、限定されることはないが、インターカレーターを用いる方法又は蛍光標識プローブを用いる方法を行うことができる。例えば、インターカレーターとしては、SYBR（登録商標） Green Iを用いることができる。

[0024] BACH1タンパク質又はFOXA1タンパク質の発現量を測定するために使用する

抗体は、市販の抗体を用いることもできるし、配列番号2又は配列番号4に記載するBACH1タンパク質又はFOX A1タンパク質のアミノ酸配列の一部を抗原として作成した抗体を用いることもできる。前記アミノ酸配列は、配列番号2又は配列番号4に記載するアミノ酸配列とそれぞれ90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上の同一性を有するものであってよい。また、前記抗体等は、前記アミノ酸配列と特異的に結合できる限り、前記アミノ酸配列の相補配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上の同一性を有するものであってよい。

[0025] 抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでもよいが、安定した品質の抗体を安定して供給するためには、モノクローナル抗体であることが好ましい。Fab' 又はF(ab')₂などのモノクローナル抗体の断片でもよい。

また、各抗体は一般的に用いられているマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、トリ由来のもの等が使用できるがこれらに限定されず、BACH1タンパク質又はFOX A1タンパク質に特異的に結合する抗体であれば何れも使用できる。この抗体が標識化されていてもよく、又は標識化二次抗体を用いてもよい。

標識化二次抗体を使用する場合は、一次抗体を認識するものであれば特に限定されず使用できる。例えば、一次抗体がラビット抗体である場合は標識化抗ラビットIgG抗体を、一次抗体がマウス抗体である場合は標識化抗マウスIgG抗体を、二次抗体として用いることができる。

[0026] 標識物質は、酵素、放射線同位元素、蛍光物質、発光物質、金コロイド等が挙げられる。

これらのうち、感度および操作の簡便さの観点から酵素が好ましく、ペルオキシダーゼ (PO)、西洋わさび過酸化酵素 (HRP)、アルカリフォスファターゼ (AP)、グルコースオキシダーゼ (GOD) 等がより好ましい。標識物質としてHRPを用いる場合はTMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) 等を、APを用いる場合はAMPPD (3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3'-

ホスホリルオキシ) フェニル-1,2-ジオキセタンニナトリウム塩)、9-(4-クロロフェニルチオホスホリルオキシメチリデン)-10-メチルアクリダンニナトリウム塩等を基質として使用することができる。また、標識物質としては、他にFITC (fluorescein isothiocyanate)、ローダミン等の蛍光色素等も使用することができる。

[0027] 測定対象物質の検出・定量方法は、標識の方法によって異なり、当業者に周知慣用の方法で行うことができ、特に限定されない。例えば、標識物質としてPO、HRP、AP、GOD等を用いた場合は、発色基質や発光基質を添加することで、吸光度や発光強度の変化を測定して測定対象物質を定量することができる。また、標識物質として蛍光物質を用いた場合は、その蛍光強度を測定することで測定対象物質を定量することができる。また、標識物質として放射性同位元素を用いた場合は、放射能を測定することで測定対象物質を定量することができる。また、標識物質として金コロイドを用いた場合は、吸光度を測定することで測定対象物質を定量することができる。

定量の際は、例えば、予め既知の濃度の試料で検量線(標準曲線)を作成しておき、測定値を検量線に照合して試料中のBACH1タンパク質又はFOX A1タンパク質発現量を算出することができる。

[0028] 抗体溶液の濃度は、抗原-抗体反応を妨げない限り、また検体中のBACH1タンパク質又はFOX A1タンパク質発現量に対して過度に少なくない限り、特に限定されない。

本発明において、抗原-抗体反応を行う時間、本発明の方法を行う温度、試料や試薬の希釈液および洗浄液の組成やpH等は特に限定されず、一般的に行われるタンパク質の定量法に適用する条件でよい。

[0029] 被検対象は、BACH1を発現する哺乳類であれば特に限定されることはないが、ヒトが好ましい。

測定する対象試料は、例えば、被検対象又は健常対象から得た生体試料である。

生体試料とは、例えば、脾臓の細胞又は組織、脾臓周辺の細胞又は組織、

その他膵臓癌の転移が考えられ得るあらゆる部位の細胞又は組織等であってもよい。また、生体試料は膵臓癌細胞が含まれ得る血液、リンパ液等の体液であってもよく、血中循環癌細胞でもよい。血中循環癌細胞は、特に限定されることはないが、例えば膵臓癌を認識する抗体でコーティングされた磁気ビーズを血液に作用させて、磁気による正の選択をすることで回収することができる。

[0030] 上皮間葉移行とは、上皮細胞がその細胞接着能を無くし、遊走能を有する間葉系様の細胞に変化することである。

[0031] 上皮間葉移行能については、例えば、次の方法によって評価することができる。癌ゲノムアトラス（The Cancer Genome Atlas、TCGA）のデータベースより得た膵臓癌臨床検体の臨床データを用いて作成した受信者動作特性（Receiver Operating Characteristic、ROC）曲線からBACH1の発現量のカットオフ値を算出し、被検対象から得た生体試料中のBACH1の発現量がそのカットオフ値を超えた場合に膵臓癌は上皮間葉移行能が高いと評価することができ、カットオフ値以下である場合に膵臓癌は上皮間葉移行能が低いと評価することができる。

[0032] さらに、上皮系細胞マーカーであるFOX A1の発現量と組み合わせて、より正確に膵臓癌の上皮間葉移行能を評価することができる。BACH1と同様に、TCGAのデータベースより得た膵臓癌臨床検体の臨床データを用いて作成した受信者動作特性（Receiver Operating Characteristic、ROC）曲線からFOX A1の発現量のカットオフ値を算出する。そして、被検対象から得た生体試料中のFOX A1の発現量がそのカットオフ値を超えており、且つBACH1の発現量がそのカットオフ値以下であった場合に膵臓癌は上皮間葉移行能が低いと評価することができ、一方、被検対象から得た生体試料中のFOX A1の発現量がそのカットオフ値以下であり、且つBACH1の発現量がそのカットオフ値を超える場合に膵臓癌は上皮間葉移行能が高いと評価できる。

[0033] <膵臓癌の転移能又は浸潤能を評価するための方法>

本発明は、BACH1の発現量を測定する工程を含む、膵臓癌の転移能又は浸潤

能をin vitroで評価するための方法（データ取得法）を提供する。

[0034] 膵臓癌の転移能又は浸潤能については、例えば、次の方法で評価することができる。癌ゲノムアトラス（The Cancer Genome Atlas、TCGA）のデータベースより得た膵臓癌臨床検体の臨床データを用いて作成した受信者動作特性（Receiver Operating Characteristic、ROC）曲線からBACH1の発現量のカットオフ値を算出し、被検対象から得た生体試料中のBACH1の発現量がそのカットオフ値を超えた場合に膵臓癌は転移能又は浸潤能が高いと評価することができ、カットオフ値以下である場合に膵臓癌は転移能又は浸潤能が低いと評価することができる。

[0035] さらに、上皮系細胞マーカーであるFOX A1の発現量と組み合わせて、より正確に膵臓癌能が転移能又は浸潤能を評価することができる。BACH1と同様に、TCGAのデータベースより得た膵臓癌臨床検体の臨床データを用いて作成した受信者動作特性（Receiver Operating Characteristic、ROC）曲線からFOX A1の発現量のカットオフ値を算出する。そして、被検対象から得た生体試料中のFOX A1の発現量がそのカットオフ値を超えており、且つBACH1の発現量がそのカットオフ値以下であった場合に膵臓癌は転移能又は浸潤能が低いと評価することができ、一方、被検対象から得た生体試料中のFOX A1の発現量がそのカットオフ値以下であり、且つBACH1の発現量がそのカットオフ値を超える場合に膵臓癌は転移能又は浸潤能が高いと評価することができる。

[0036] <膵臓癌の予後予測のための方法>

本発明は、BACH1の発現量を測定する工程を含む、膵臓癌の予後をin vitroで予測するための方法（データ取得法）を提供する。

[0037] 本発明において、予後とは、一般に、疾患に対する今後の見通しのことである。予後予測において、例えば、膵臓癌が寛解又は改善した場合や、長期の生存期間、長期の無増悪期間である場合、予後が良好であり、一方で例えば、膵臓癌が再発、再燃、又は転移した場合や、短期の生存期間、短期の無増悪期間である場合に、予後が不良である。

[0038] 具体的には、例えば、癌ゲノムアトラス（The Cancer Genome Atlas、TCGA

）のデータベースより得た膵臓癌臨床検体の臨床データを用いて作成した受信者動作特性（Receiver Operating Characteristic、ROC）曲線からBACH1の発現量のカットオフ値を算出し、被検対象から得た生体試料中のBACH1の発現量がそのカットオフ値を超えた場合に予後が悪いと予測することができ、カットオフ値以下である場合に予後が良いと予測することができる。

[0039] さらに、上皮系細胞マーカーであるFOX A1の発現量と組み合わせて、より正確に予後を予測することができる。BACH1と同様に、TCGAのデータベースより得た膵臓癌臨床検体の臨床データを用いて作成した受信者動作特性（Receiver Operating Characteristic、ROC）曲線からFOX A1の発現量のカットオフ値を算出する。そして、被検対象から得た生体試料中のFOX A1の発現量がそのカットオフ値を超えており、且つBACH1の発現量がそのカットオフ値以下であった場合に予後が良いと予測でき、一方、被検対象から得た生体試料中のFOX A1の発現量がそのカットオフ値以下であり、且つBACH1の発現量がそのカットオフ値を超える場合に予後が悪いと予測できる。

[0040] 上記のような予後予測の結果に基づき、治療方針を決定することができる。例えば、外科的治療、放射線治療、化学療法、内分泌療法（ホルモン療法）の何れを行うかを決定でき、また、内分泌療法として他の何れの内分泌剤を使用するかを決定できる。

[0041] <膵臓癌転移抑制剤をスクリーニングする方法>

本発明は、BACH1遺伝子又はBACH1遺伝子のプロモーターに連結されたレポーター遺伝子を発現する細胞に医薬候補物質を添加する工程、BACH1遺伝子またはレポーター遺伝子の発現量を測定する工程、及び前記発現量を低下させる物質を選択する工程を含む、膵臓癌転移抑制剤をスクリーニングする方法を提供する。

[0042] 例えば、候補化合物の存在下において、BACH1遺伝子又はBACH1遺伝子のプロモーターに連結されたレポーター遺伝子の発現量が、候補化合物の添加を行っていないコントロールと比べて低下した場合、具体的には、例えば20%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは90%以上低下する場合に、当該候補

化合物を膵臓癌の治療薬の候補として選択することができる。

[0043] BACH1遺伝子を発現する細胞は、BACH1遺伝子を発現する細胞を含む生体試料、BACH1遺伝子を発現する培養細胞株、又はBACH1遺伝子を強制発現した培養細胞株の何れを用いてもよいがBACH1遺伝子を強制発現した培養細胞株を用いることが好ましい。

BACH1遺伝子を発現する培養細胞株とは、BACH1遺伝子を発現する細胞株であれば特に限定されることはないが、例えば膵臓癌細胞由来の細胞株が挙げられる。

BACH1遺伝子を強制発現した培養細胞株とは、例えば、BACH1遺伝子を哺乳類細胞に遺伝子を導入するためのプラスミドやウイルスベクターなどに組み込み、リポフェクション等の通常の方法にて細胞にトランスフェクションした培養細胞株が挙げられる。トランスフェクションは一過的でも安定的でもよい。

[0044] BACH1遺伝子のプロモーターに連結されたレポーター遺伝子を発現する細胞は、例えばこれらのレポーター遺伝子をBACH1遺伝子のプロモーターに連結し、これを哺乳類細胞に遺伝子を導入するためのプラスミドやウイルスベクターなどに組み込み、既知の方法であるリポフェクション等の通常の方法によって細胞にトランスフェクションした、レポーター遺伝子を強制発現した培養細胞株を使用する事ができる。トランスフェクションは一過的でも安定的でもよい。

[0045] BACH1遺伝子のプロモーターに連結されたレポーター遺伝子を用いる場合、BACH1遺伝子のプロモーターとしては、転写開始点の上流約1kbpを含む領域が好ましく、上流約2kbpを含む領域がより好ましい。

レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、GFP遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等を使用する事ができ、好ましくはルシフェラーゼ遺伝子又はGFP遺伝子を使用する事ができる。

[0046] 本発明において、候補化合物とは、高分子化合物又は低分子化合物の何れでもよく、特に限定されることはないが、高分子化合物としては、例えばタ

ンパク質、抗体、ペプチド、非ペプチド性化合物、核酸、又はRNA等が挙げられる。これらの化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよく、これらの化合物を含む、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液等でもよい。

候補化合物の中から、候補化合物非添加の場合と比較して、BACH1遺伝子の発現量を低下させる化合物を選択することで、膵臓癌の治療薬となり得る物質を得ることができる。

[0047] 候補化合物の濃度添加濃度は、BACH1遺伝子の発現量を低下することが確認できる濃度であれば特に限定されることはない。また、添加方法、反応時間、反応温度等は、用いる被検検体に従って適宜選択することができる。

[0048] <膵臓癌転移抑制剤>

本発明は、BACH1遺伝子の発現を低下させる薬剤を有効成分とする、膵臓癌転移抑制剤を提供する。

[0049] BACH1遺伝子の発現を低下させる薬剤は、高分子化合物又は低分子化合物の何れでもよく、特に限定されることはないが、高分子化合物としては、例えばタンパク質、抗体（抗BACH1抗体）、ペプチド、非ペプチド性化合物、核酸、又はRNAが挙げられる。好ましくは、RNAであり、さらに好ましくは、siRNAである。

siRNAの塩基配列は、BACH1遺伝子の発現を低下させる限り限定されることはないが、例えば配列番号5又は配列番号6に記載する塩基配列が挙げられる。

実施例

[0050] 以下実施例により、本発明をより詳細に説明するが、本発明の範囲が実施例のみに限定されないことは言うまでもない。

[0051] <実施例1> in silicoによるBACH1発現量と予後との関係の検討

癌ゲノムアトラス（The Cancer Genome Atlas、TCGA）のデータベースに登録されている膵臓癌患者検体におけるBACH1の発現量と予後の間に関連があるか調べた。TCGAのデータベースより膵臓癌患者176人のRNA-sequenceの臨床デ

ータを入手し、ソフトウェアJMP pro v13.1.0によってその臨床データに基づく受信者動作特性 (Receiver Operating Characteristic、ROC) 曲線から求めたカットオフ値に基づき、BACH1低発現群 (n=134) と高発現群 (n=42) の2群に分類し(図1A左)、カプランマイヤー法で全生存率 (Overall survival、OS) を解析した。

その結果、BACH1高発現群で有意にOSが低いことが分かった (ログ・ランク検定; $P < 0.0001$ 、図1A右)。このことは、BACH1が膵臓癌悪性化因子として機能している可能性を示唆し、本研究では膵臓癌におけるBACH1の機能に注目して解析を行うことにした。

[0052] <実施例2>膵臓癌臨床検体におけるBACH1の発現の検討

BACH1タンパク質発現と予後との関係を調べるため、東北大学病院消化器外科で手術された膵臓癌の臨床検体を用いて、抗ヒトBACH1モノクローナル抗体 (9D11、自家製抗体、dilution 1:100) を用いた免疫組織化学を行った。膵臓癌の臨床検体は、2007年から2014年までに東北大学病院消化器外科で切除術を施行された膵臓癌症例116検体を対象とした。なお、この抗ヒトBACH1モノクローナル抗体の特異性は、ノックダウンやノックアウトを行った細胞を用いた実験により確認済みである (データ不掲載)。

免疫組織化学は、抗ヒトBACH1モノクローナル抗体を用いて行った。10%パラホルムアルデヒドで固定したパラフィン包埋切片を3 μm に薄切し、剥離防止コートスライドガラスに接着固定した。切片をキシレンで脱パラフィン処理した後、エタノールで脱水処理した。抗原の賦活化は、TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0、1mM EDTA) による30分間の煮沸にて行った。内因性ペルオキシダーゼ阻害は、1 %過酸化水素/メタノールでの10分間の反応で行った。ブロッキングは正常ヤギ血清 (DakoCytomation、Glostrup、Denmark) で行った。一次抗体反応は4°Cで24時間行った。ヒストファイン シンプルステインMAX-P0(M) (Nichirei Biosciences Inc.、Tokyo、Japan) を用いて、室温で2時間二次抗体反応を行った。その後、0.1M Tris bufferに溶解した 3,3'-Diamino benzidineと過酸化水素で5分間発色を行い、ヘマトキシリンにて核を染色し

た。顕微鏡観察において、内部標準をリンパ球として、染色強度により弱陽性 (weak positive、陽性率10%未満)、中陽性 (moderate positive、陽性率10~50%)、強陽性 (strong positive、陽性率50%以上) の3段階で評価した後、強陽性をBACH1高発現群 (n=28)、弱陽性及び中陽性を低発現群 (n=88) として分類した (図1B)。

[0053] <実施例3> BACH1の発現と全生存率の関係

免疫組織化学的分類に基づくBACH1タンパク質の発現と予後との関係を調べるため、 Kaplan-Meier法でOSを解析した。

TCGAデータベースに登録されている臨床データを利用したBACH1の発現と予後の関係と一致して、BACH1タンパク質の高発現群では、OSが有意に低く (ログ・ランク検定; $P=0.0213$)、BACH1が膵臓癌の予後不良因子であることを見出した (図1C)。

単変量解析を行ったところ、OSではリンパ節転移 ($P = 0.0094$)、遠隔転移 ($P = 0.0004$)、BACH1発現量 ($P=0.0231$) が予後因子としての有意性を示した。そこでこれらの予後因子候補に組織グレード ($P=0.0638$) を追加してCox比例ハザードモデルに基づく多変量解析を行った。OSではリンパ節転移 ($P=0.011$) とBACH1発現量 ($P=0.0296$) が、独立した予後因子としての有意性を示した (表1)。

[表1]

Variate analysis				
Variables	univariate analysis		multivariate analysis	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age	1.009 (0.624-1.690)	0.971		
Gender	1.234 (0.783-1.979)	0.372		
hist grade	2.011 (0.886-3.962)	0.0638	2.279 (0.993-4.573)	0.0517
Tumor size	1.346 (0.858-2.133)	0.1968		
LN metastasis	2.131 (1.238-3.910)	0.0094	2.072 (1.175-3.870)	0.0110
Metastasis	2.716 (1.512-4.647)	0.0004	1.565 (0.839-2.759)	0.1528
BACH1	1.772 (1.062-2.866)	0.0231	1.781 (1.061-2.900)	0.0296

[0054] <実施例4> BACH1の発現と細胞増殖の関係

BACH1発現の癌細胞増殖への影響を調べるため、膵臓癌細胞株AsPC1、SW1990において、siRNAによるRNA干渉法を用いたBACH1のノックダウンを行った。s

siRNAによるノックダウンは次の方法によって行った。BACH1のsiRNA (Stealth RNAi (商標) siRNA Duplex Oligoribonucleotides, Invitrogen, CA, USA) を使用した。コントロールとして、Stealth RNAi (商標) siRNA Negative Control, Low GC (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)を使用した。Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、製品説明書に従ってリポフェクション法にてsiRNAを導入した。使用したsiRNAの配列は以下の通りである。

siBACH1-1; 5' -GGUCAAGGACUUUCACAACAUUAA-3' (配列番号5)

siBACH1-2; 5' -GGGCACCAGGGAAGAUAGUAGUGUU-3' (配列番号6)

その結果、AsPC1、SW1990の両細胞種ともに、BACH1ノックダウンによる細胞増殖への影響は認められなかった(図2)。

[0055] <実施例 5> BACH1ノックダウンおよび過剰発現による細胞の形態変化

実施例 4 と同様の手順によりBACH1をノックダウンした膵臓癌細胞株AsPC1は、図3Aに示すように細胞間の接着が強くなり、上皮様の細胞形態を示した(図3A)。

そこで、BACH1タンパク質の発現量がAsPC1と比べて低いPanc1にBACH1を過剰発現させた。過剰発現は、6 cmの培養皿で培養したPanc1に、市販のトランスフェクション用キットであるFugene (登録商標) HDを用いて添付の製品説明書に従いプラスミド導入を行った。コントロールとしては、市販のベクターであるpcDNA3.1(-) (Addgene) を7.2 μ g導入し、一方、過剰発現としては、市販のベクターであるpCMV2に、配列番号1に記載する塩基配列であるBACH1遺伝子を組み込んだベクターであるpCMV2-BACH1を7.2 μ g及び薬剤選択のためにpcDNA3.1(-)を1 μ gを導入し、2週間に渡って、2,000 μ g/mlのG418 (Calbiochem, Germany) を添加したPanc1用培地で培養した。培養はRPMI 1640 medium (Sigma Aldrich, MO, USA) にAsPC1は20%ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma Aldrich) 0.1 mg/mlペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO, NY, USA) 、10 mM HEPES (GIBCO) 、SW1990、Panc1は10% FBS、0.1 mg/mlペニシリン/ストレプトマイシン、10 mM HEPESを添加した培地で行っ

た。培養後、薬剤耐性を獲得することで生き残った細胞によって形成されたコロニーを顕微鏡下で単離し、クローニングした。

その結果、BACH1過剰発現Panc1はBACH1ノックダウンAsPC1の時とは逆に細胞間の接着が弱くなり、仮足様の歪な細胞形態を示した（図3B）。つまりBACH1による上皮間葉移行（epithelial to mesenchymal transition、EMT）が促進することが考えられた。

そのため、上皮系遺伝子（CDH1, OCLN, FOXA1）と間葉系遺伝子（VIMとSNAI2）の発現を次に記載する手順による定量RT-PCR法にて確認した。まず、RNA抽出は、RNeasy（登録商標） Plus Mini Kit（Qiagen、Germany）を使用して添付の製品説明書に従い行った。cDNA合成は抽出したRNAをOmniscrypt Reverse Transcription kit（Qiagen）を用いて添付の製品説明書に従い、逆転写反応を行った。逆転写反応には1 μ gのRNAを用い、200 ngのRandom primer（Invitrogen）を使用して、37°Cで60分間反応させ、93°Cで5分間の熱処理によって、逆転写反応を停止させた。目的の遺伝子の発現量の測定には、インターカレーターとしてSYBR（登録商標） GreenIを用いた定量PCR法を用いた。LightCycler（登録商標） Fast Start DNA Master SYBR GreenI（Roche, Swiss）を用い、添付の製品説明書に従って、cDNAから各遺伝子特異的なプライマーを使用して、定量PCR機LightCycler（登録商標） Nano（Roche）で測定した。目的の遺伝子のmRNAの発現量は、内部標準遺伝子の発現量で補正し、検体間の比較を行う相対定量で評価した。内部標準遺伝子には β -actinの遺伝子（ACTB）を用いた。各プライマーの配列は以下の通りである。

ACTB

(Forward) 5' -ATTTGCGGTGGACGATGGAG-3' (配列番号7)

(Reverse) 5' -AGAGATGGCCACGGCTGCTT-3' (配列番号8)

BACH1

(Forward) 5' -AATCGTAGGCCAGGCTGATG-3' (配列番号9)

(Reverse) 5' -AGCAGTGTAGGCAAACTGAA-3' (配列番号10)

CDH1

(Forward) 5' -TCCTGGCCTCAGAAGACAGA-3' (配列番号11)

(Reverse) 5' -CCTTGGCCAGTGATGCTGTA-3' (配列番号12)

OCLN

(Forward) 5' -GAGTTGACAGTCCCATGGCA-3' (配列番号13)

(Reverse) 5' -CTGAAGTCATCCACAGGCGA-3' (配列番号14)

FOXA1

(Forward) 5' -GGTGGCTCCAGGATGTTAGG-3' (配列番号15)

(Reverse) 5' -CCCAGGCCTGAGTTCATGTT-3' (配列番号16)

VIM

(Forward) 5' -GGACCAGCTAACCAACGACA-3' (配列番号17)

(Reverse) 5' -GGGTGTTTTCGGCTTCCTCT-3' (配列番号18)

SNAI2

(Forward) 5' -CAACGCCTCCAAAAAGCCAA-3' (配列番号19)

(Reverse) 5' -ACAGTGATGGGGCTGTATGC-3' (配列番号20)

その結果、BACH1ノックダウン細胞 (AsPC1、SW1990) では、上皮系遺伝子の発現が、コントロール細胞と比較して上昇し、一方で、間葉系遺伝子の発現は有意に低下した。また、BACH1過剰発現細胞 (Panc1) では、上皮系遺伝子の発現が低下し、間葉系遺伝子VIMの発現が上昇したが、SNAI2の発現は低下した (図3C)。

さらにAsPC1において、E-カドヘリン (E-cadherin) タンパク質をウェスタンブロット法によって検出した。SDSサンプル緩衝液 (0.0625M Tris-HCl (pH 6.8)、2.2% SDS、10% glycerol、0.01%BPB、5% β -ME) に細胞を懸濁し、可溶化させることでタンパク質を調整した後、95℃で5分間の変性処理をした。熱変性した細胞の全タンパク質抽出液を7.5%~12%のポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し分子量に応じて展開した。ウェット法にて、ゲルからポリビニルデンフルオイド膜 (PVDF膜、Millipore、Germany) に転写した。転写後のPVDF膜はブロッキング処理のため、終濃度3% スキムミルク (Wako Jyun-Yaku Co., Osaka, Japan) を添加したT-TBS (0.05% Tween 20を含むTBS (25

mM Tris-HCl (pH 7.4)、137 mM NaCl、3 mM KCl)) 中にて、室温で1時間、振盪した。一次抗体は上記ブロッキング液で抗BACH1抗体 (1 : 1000、自家製)、抗GAPDH抗体 (1 : 5000、ab8245、Abcam、England)、抗 β -Actin抗体 (1 : 1000、GTX109639、GeneTex、CA、USA)、抗E-cadherin抗体 (1 : 1000、ab1416、Abcam) を希釈し4℃で一晩反応させた。HRP conjugated anti-mouse IgG blotting reagents (1 : 5000、GE Healthcare、NJ、USA) を上記ブロッキング液で希釈したものを用意し、一次抗体反応後のPVDF膜に添加し、室温で60分間反応させた。wash bufferによる洗浄の後に、SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific Inc.) またはECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた化学発光により、X-フィルム (GE Healthcare) に感光して検出した。その結果、BACH1ノックダウンによって遺伝子発現 (CDH1、図3C) に続き、タンパク質発現量も増加した (図4D左)。また同様の効果はAsPC1だけでなくSW1990においても確認された (図3D中央)。さらに、BACH1過剰発現Panc1ではE-cadherinの遺伝子発現及びタンパク質発現は減少することが判明した (図3D右)。ここで、E-cadherinは上皮細胞の代表的なマーカータンパク質であり、細胞間接着因子として機能することを考えると (図3E)、これが細胞形態を変化させた要因の1つであることが示唆された。これらの結果は、BACH1が膵臓癌における間葉細胞形質の発現および維持に重要であることを示唆する。

[0056] <実施例 6> BACH1の遊走能、浸潤能への影響

BACH1が膵臓癌細胞の遊走能や浸潤能を促進し得るかを調べるために、以下の手順でスクラッチアッセイを行い、遊走能を確認した。まず、6ウェルプレートにコンフルエントになった細胞に、1,000 μ lのピペットチップを用いて傷 (直線) を形成し、傷形成直後と24時間後の創傷部を比較することで細胞移動面積を計測した。また移動面積はソフトウェアImage J (NIH、<https://imagej.nih.gov/ij/>) を使用し、ピクセル数を計測し、同様の実験を独立して3回以上行った。その結果、BACH1ノックダウンAsPC1では、コントロール細胞と比べ有意に遊走能が低下し (図4A)、BACH1過剰発現Panc1では、コントロ

ール細胞と比べ有意に遊走能が増加した（図4B）。

さらにボイデンチャンバー法を用いて、遊走能および浸潤能を確認した。まず下部24穴プレートに血清入りの使用細胞に合った培地を（AsPC1は20%FBS、SW1990は10%FBS）を添加し、その上にインサートを静置したのち、無血清培地に懸濁した細胞（AsPC1は 2×10^5 個、SW1990は 1×10^5 個）をこのインサート中に播種した。24時間後にインサートメンブレン上面に存在する細胞を綿棒で全て除去した後、インサートメンブレン下面に移動した細胞をクリスタルバイオレット溶液（4.2%ホルマリン、0.05%クリスタルバイオレット、10%エタノール）に10分間浸すことで、固定および染色した。染色後のメンブレンを蒸留水でよく洗った後に、乾燥させ顕微鏡下で目視にて遊走および浸潤した細胞数を計測した。1回の実験は、各検体2度繰り返して行い、AsPC1はメンブレン全体の細胞数を計測した。SW1990はそれぞれ独立した5視野の細胞数をカウントして平均した。同様の実験を独立して3回以上行った。その結果、BACH1ノックダウンAsPC1、SW1990において有意に遊走能、浸潤能の低下を認めた（図4C）。

以上より、膵臓癌細胞においてBACH1は遊走能、浸潤能を亢進させることが判明した。

[0057] <実施例7> BACH1ノックアウト細胞株の樹立

BACH1が転移促進機能を有することに関して、マウスへの移植実験によって *in vivo* の検証を行うために、CRISPR/CAS9システムを用いてBACH1ノックアウト膵臓癌細胞株を作製した。CRISPR/CAS9システムは次の方法で行った。制限酵素BsmB1（認識配列：5' CGTCTC3'）で処理したウイルスベクターlentiCRISPR v2（Addgene、MA、USA）に、下記ガイドRNAをライゲーションさせ、目的のガイドRNAを持ったウイルスベクターを作製した。ヒト胎児由来腎臓上皮細胞である293T細胞にFugene（登録商標）HD（Promega、WI、USA）を用いて、製品説明書に従ってトランスフェクションし、2日後、培養上清をウイルス液として回収した。回収したウイルス液を用いて目的のガイドRNAを持ったウイルスをAsPC1に感染させ、培地に10 $\mu\text{g/ml}$ のピューロマイシン（Sigma Aldri

ch) を添加し、3週間薬剤選択をした後、形成されたコロニーを顕微鏡下で単離することにより単クローンを得た。遺伝子変異とタンパク質の発現消失はそれぞれゲノムシーケンスとウエスタンブロット法により確認した。シングルガイドRNA (sgRNA) はBACH1の以下の配列を標的とした。

ガイドRNA-1; 5' -CCGCGCUCACCGGUCCGUGCUGG-3' (配列番号21)

ガイドRNA-2; 5' -CCACUCAAGAAUCGUAGGCCAGG-3' (配列番号22)

作製したBACH1ノックアウト細胞は、図5Aのリファレンス配列に示した2種類のガイドRNAの標的領域に、目的とする13塩基欠失変異 (sgBACH1-1)、又は1塩基挿入変異が入っていることを (sgBACH1-2)、シーケンス解析にて確認した (図5A)。またウエスタンブロット法にてBACH1タンパク質発現の消失を確認した (図5B)。さらに、BACH1ノックアウトによりBACH1ノックダウン時と同様に上皮系遺伝子の発現亢進および間葉系遺伝子の発現低下が起きるか、定量RT-PCR法で確認したところ、上皮系遺伝子の有意な発現亢進はみられたが、間葉系遺伝子の発現低下は観察されなかった (図5C)。また、E-cadherinタンパク質発現量をウエスタンブロット法によって確認したところ、CDH1の発現はsgBACH1-1およびsgBACH1-2細胞において共に増加していたが (図5C)、E-cadherinタンパク質発現量はsgBACH1-2細胞においてのみ、siRNA干渉時の結果と同様の著しい増加を認めた (図5B)。さらに、免疫蛍光染色を行い、BACH1のタンパク質とE-cadherinタンパク質の発現量の変化を確認した。免疫蛍光染色は、次の方法で行った。スライドガラスの上で培養した細胞を4%ホルムアルデヒド/PBSで10分間固定した。一次抗体BACH1 (9D11、自家製)、E-cadherin (ab1416、abcam) を1%ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin、BSA) /PBSで200倍希釈した抗体液にスライドガラス上の細胞を浸し、37°Cで1時間反応させた。PBSで洗浄した後、二次抗体 (抗マウスIgG抗体-FITC (F3008、Sigma Aldrich)) を1% BSA/PBSで1000倍希釈した抗体液に細胞を浸し、37°Cで1時間反応させた。PBSで洗浄後、核染色を20 μ g/mlのHoechst33342/PBSで行い、VECTASHIELD Mounting Medium (Funakoshi、Tokyo、Japan) を用いて封入した細胞を蛍光倒立顕微鏡である高速蛍光イメージングシステ

ム AF6500 (Leica, Germany) を用いた。その結果、本細胞におけるBACH1のタンパク質の消失とE-cadherinのタンパク質発現量の増加を確認した (図5D、E)。

[0058] <実施例 8> BACH1の腫瘍形成、転移能への影響

マウス個体内でのBACH1の機能を解析するため超免疫不全マウス (NOG (NOD, Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/ShiJic) マウス) の膵臓組織へのBACH1ノックアウトAsPC1とそのコントロール細胞の同所癌細胞移植を行った。実験には6~8週齢のNOGマウスを使用した。マウスに3種混合麻酔薬 (メドミジン0.3 mg/kg、ミダゾラム4 mg/kg、ブトルファノール5 mg/kg) を腹腔投与した後、BACH1野生型AsPC1とBACH1ノックアウトAsPC1を用いて膵臓への同所移植を行った。同所移植は左上腹部を1.5 cm開腹し、膵臓を体外へ遊離し、膵尾部の被膜下へ27Gの注射針を用いて、 10^4 個 ($100 \mu\text{l}$ PBSに懸濁) の細胞を移植した。移植後、膵臓を体内に戻し、3-0の吸収糸で閉腹を行った。5週間後、膵臓組織重量、肝臓への転移数および腹膜播種として腸間膜、横隔膜、腹膜への転移数を解剖により目視にて計測した。図6Aには解剖時の代表的な膵臓、肝臓、腸間膜の像を示す。in vitroにおける細胞増殖の結果と一致して、膵臓 (移植巣) における腫瘍増殖能に有意な差は認められなかった (図6B左)。しかし、肝転移、腹膜播種はBACH1 ノックアウトAsPC1では有意に減少した (図6B中央と右)。本結果は、BACH1が膵臓癌細胞において、原発の腫瘍形成には影響しないものの、転移能を高めることを示した。

[0059] <実施例 9> BACH1とFOXA1を組み合わせた予後予測の検討

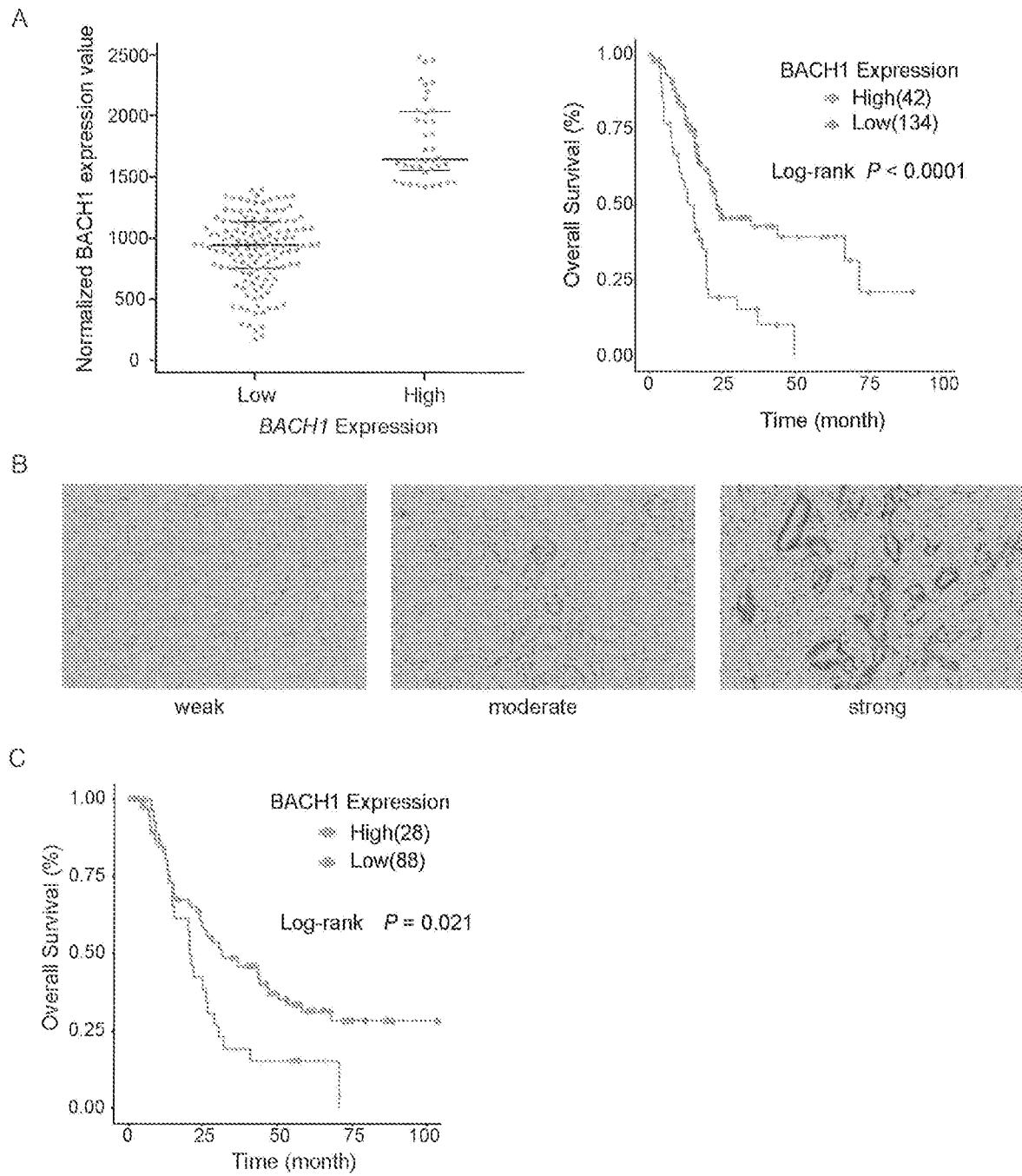
TCGAの膵臓癌患者のRNA-sequenceデータを用いてFOXA1の発現と予後との関係を解析した。FOXA1は高発現ほど有意に予後がよい結果であった (図7A)。さらに、BACH1の下流の因子とBACH1の発現をさらに組み合わせて解析することで、BACH1の予後における機能を再評価した。するとBACH1がその転写抑制機能を強く発揮するBACH1高発現且つFOXA1低発現の組み合わせで予後が最も悪く、BACH1がその転写抑制機能を失っているBACH1低発現且つFOXA1高発現の組み合わせで予後が良い結果であった (図7B)。本結果はBACH1が、その下流遺

伝子であるFOX A1遺伝子の発現を用いて機能評価も考慮することで、膵臓癌における優れた予後予測のためのバイオマーカーとして利用できることを示した。また、膵臓癌の転移傾向の強さを示す指標となると考えられる。

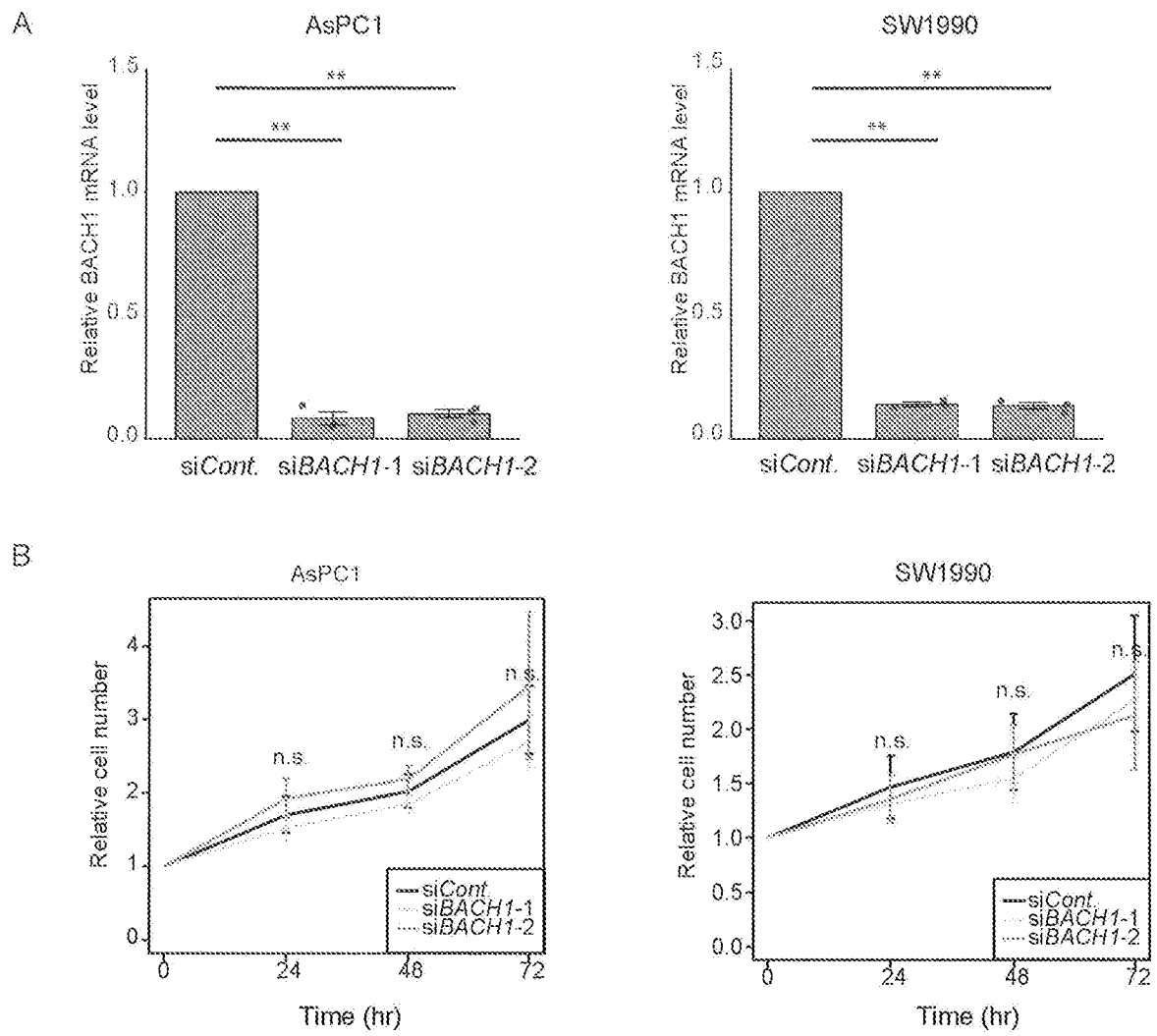
請求の範囲

- [請求項1] BACH1の発現量を測定する工程を含む、膵臓癌の上皮間葉移行能をin vitroで評価するための方法。
- [請求項2] さらに、FOXA1の発現量を測定する工程を含む、請求項1に記載の膵臓癌の上皮間葉移行能をin vitroで評価するための方法。
- [請求項3] BACH1の発現量を測定する工程を含む、膵臓癌の転移能又は浸潤能をin vitroで評価するための方法。
- [請求項4] さらに、FOXA1の発現量を測定する工程を含む、請求項3に記載の膵臓癌の転移能及び浸潤能をin vitroで評価するための方法。
- [請求項5] BACH1の発現量を測定する工程を含む、膵臓癌の予後をin vitroで予測するための方法。
- [請求項6] さらに、FOXA1の発現量を測定する工程を含む、請求項5に記載の膵臓癌の予後をin vitroで予測するための方法。
- [請求項7] BACH1遺伝子またはBACH1遺伝子のプロモーターに連結されたレポーター遺伝子を発現する細胞に医薬候補物質を添加する工程、BACH1遺伝子またはレポーター遺伝子の発現量を測定する工程、及び前記発現量を低下させる物質を選択する工程を含む、膵臓癌転移抑制剤をスクリーニングする方法。
- [請求項8] BACH1遺伝子の発現を低下させる薬剤を有効成分とする、膵臓癌転移抑制剤。
- [請求項9] 膵臓癌細胞の上皮間葉移行能を阻害する、請求項8に記載の膵臓癌転移抑制剤。
- [請求項10] 前記薬剤がBACH1遺伝子に対するsiRNAである、請求項8または9に記載の膵臓癌転移抑制剤。

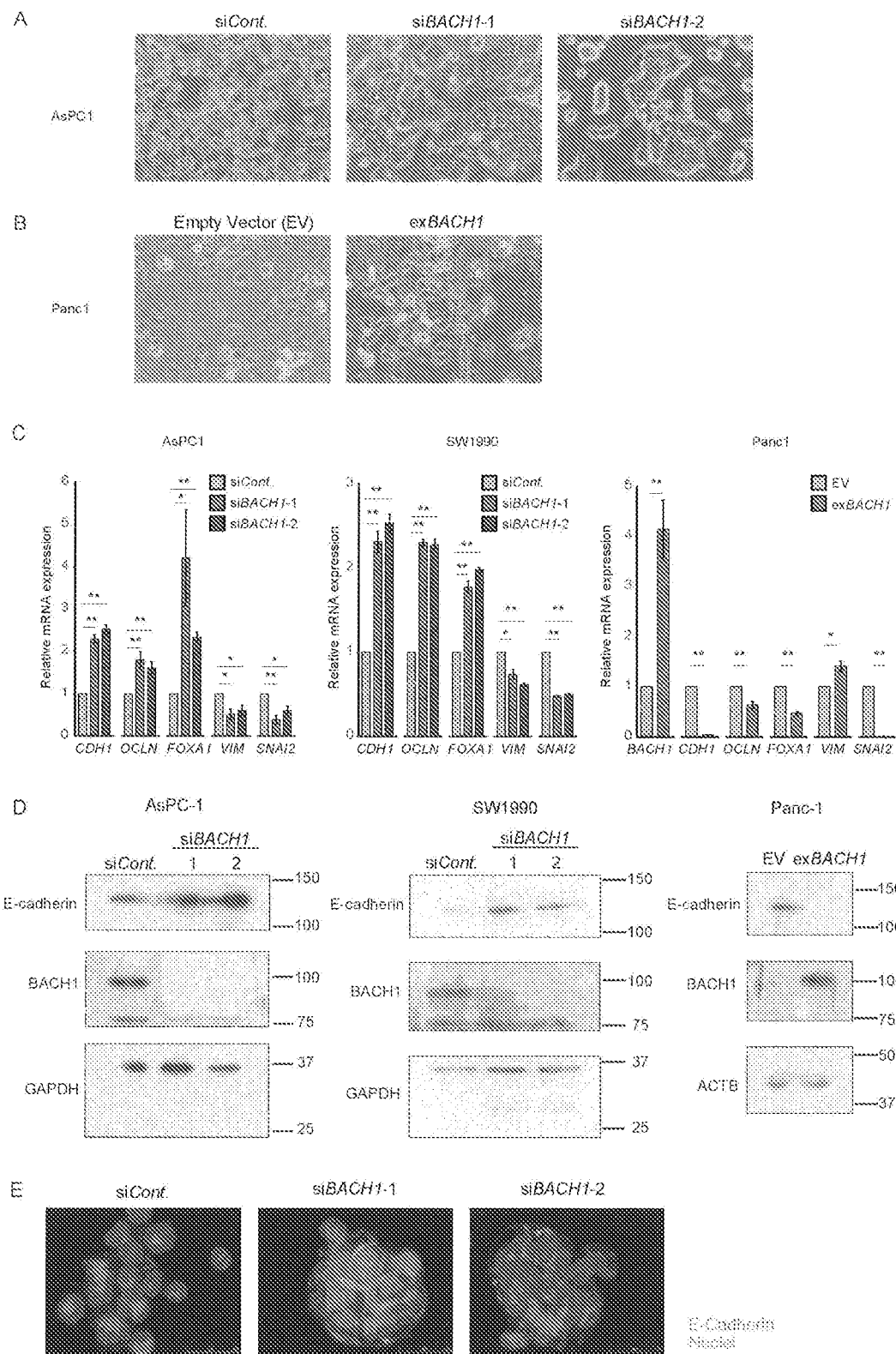
[図1]



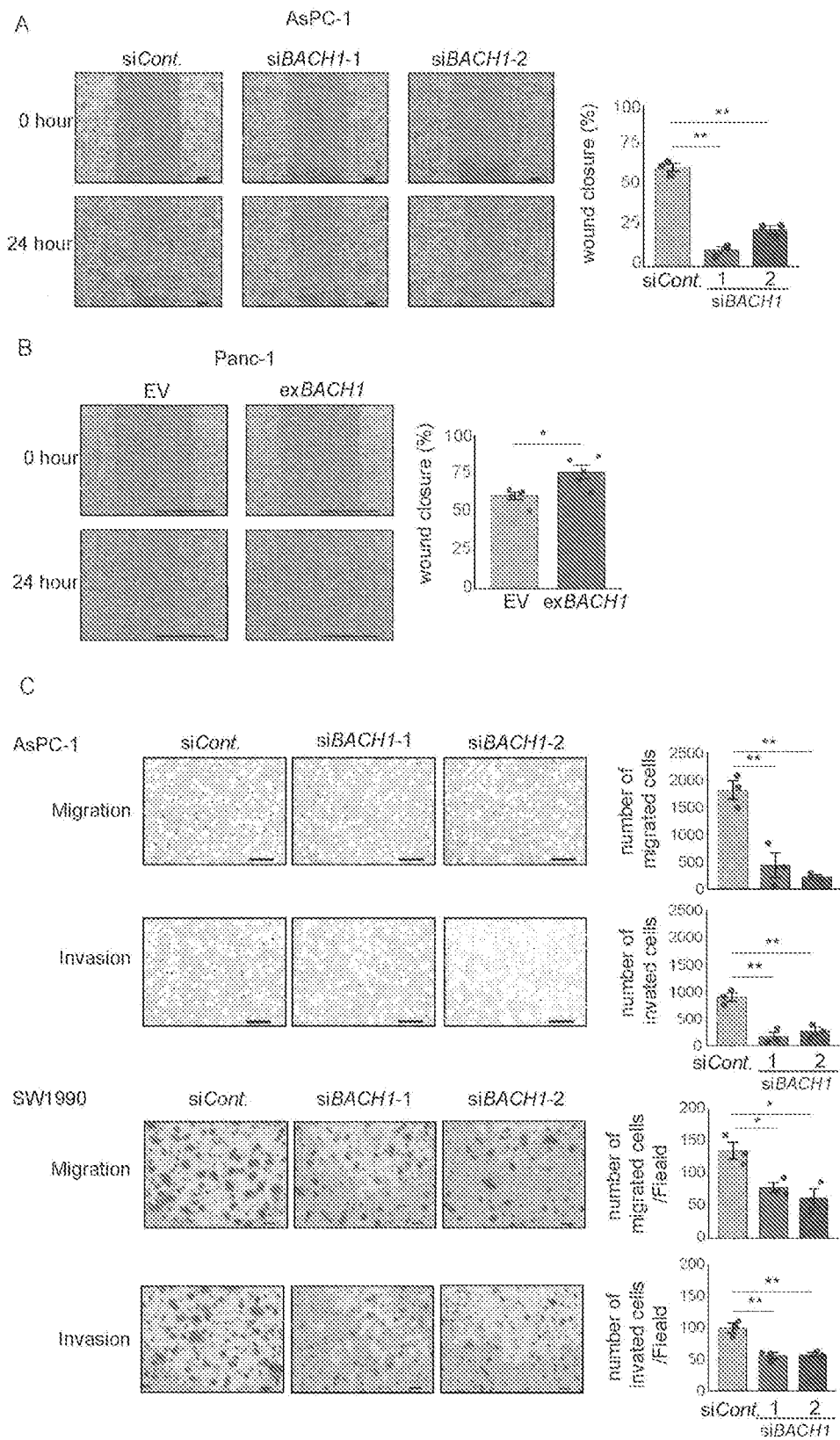
[図2]



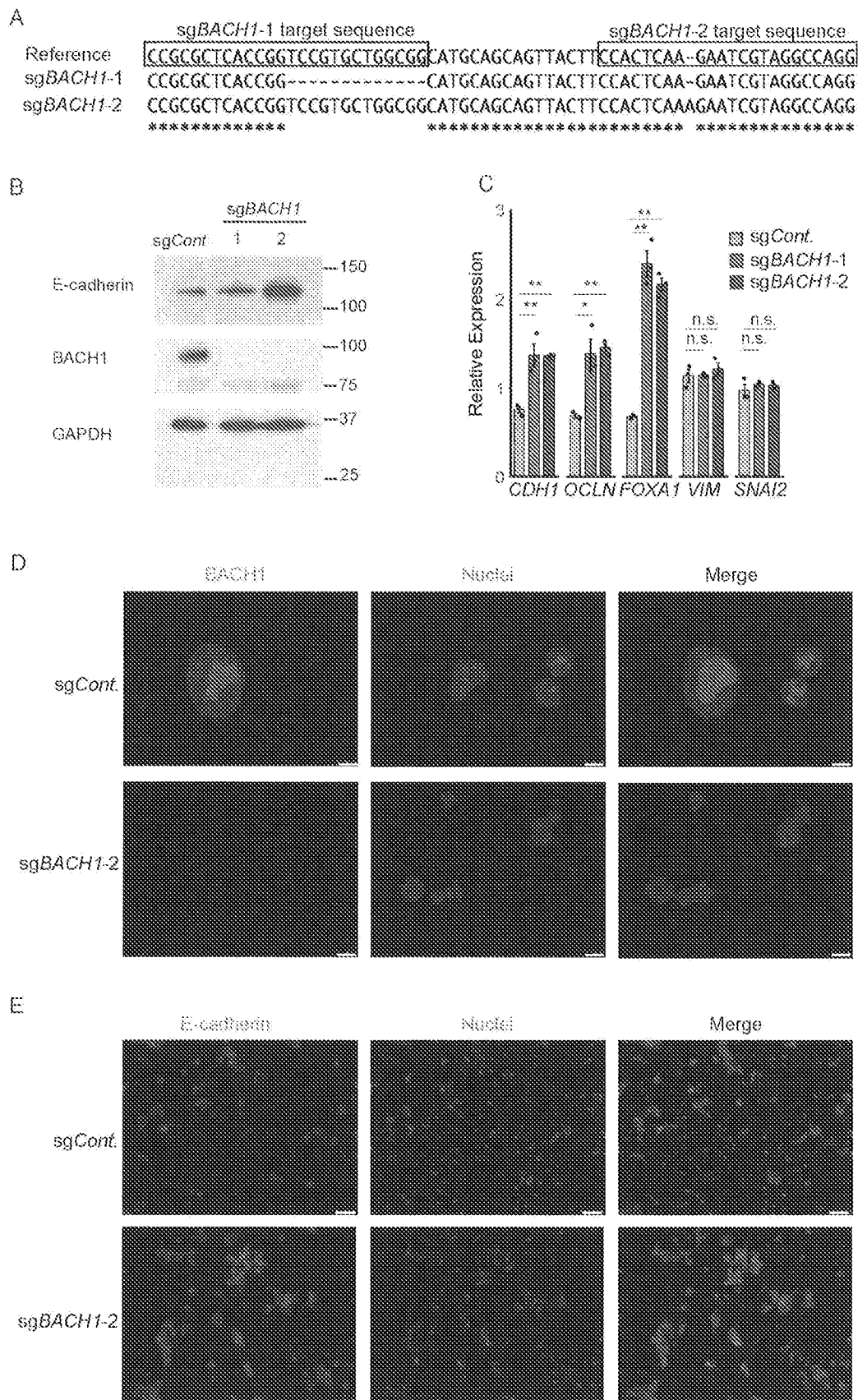
[図3]



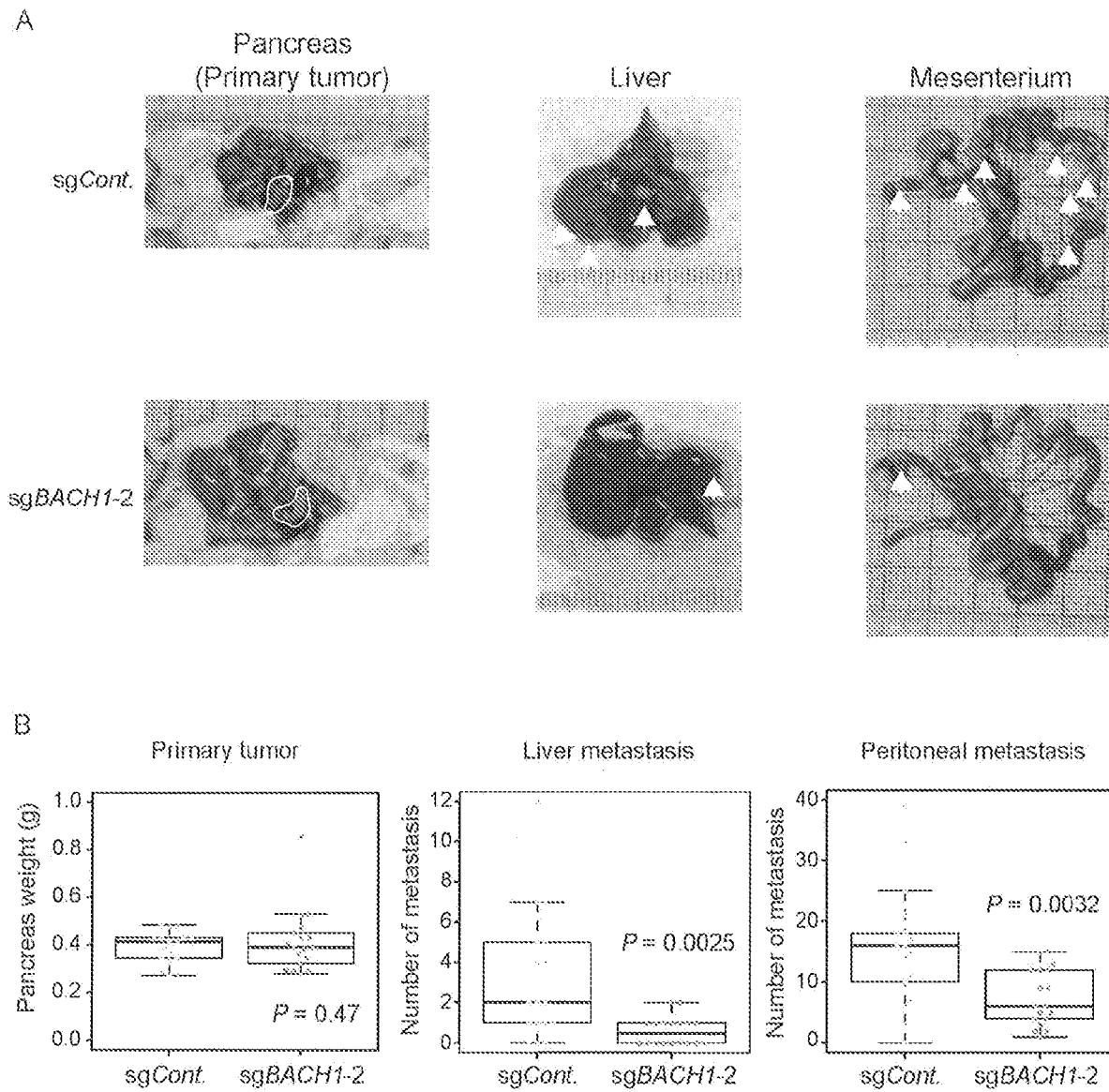
[図4]



[5]

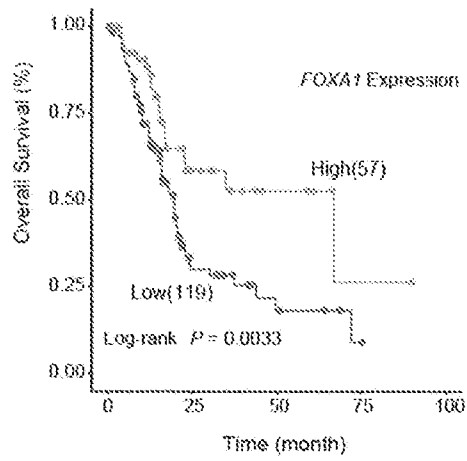


[図6]

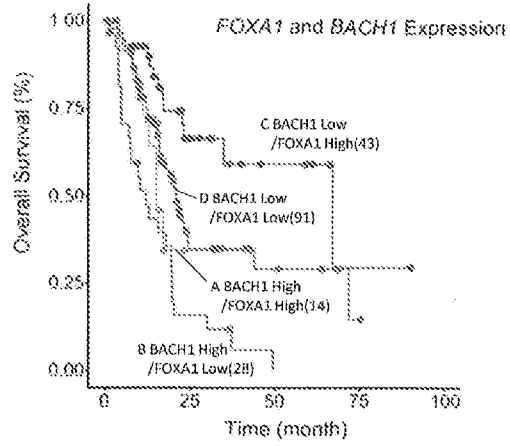


[図7]

A



B



interaction	P
A-B	0.2416
A-C	0.0316
A-D	0.4266
B-C	<0.0001
B-D	0.0003
C-D	0.00114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/006886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12Q1/6897(2018.01) i, C12N15/12(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. C12Q1/6897, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019

Registered utility model specifications of Japan 1996-2019

Published registered utility model applications of Japan 1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUANG, Xudong. et al., Functional role of BTB and CNC homology 1 gene in pancreatic cancer and its association with survival in patients treated with gemcitabine, Theranostics, 2018, vol. 8, pp. 3366-3379, pp. 3371, 3372, discussion	1-10
Y	藤岡秀一他, 膵管状腺癌における p53 蛋白発現と腫瘍血管新生に関する臨床病理学的検討, 日消外会誌, 2001, vol. 34, pp. 83-90, Introduction, Discussion (FUJIOKA, Shuichi et al. Clinicopathological Investigation of Tumor Angiogenesis and p53 Protein Expression in Tubular Adenocarcinoma of the Pancreas. Jpn J Gastroenterol Surg.)	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13.05.2019Date of mailing of the international search report
21.05.2019Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/006886

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BERNARDO, Gina M. et al., FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer, Biosci. Rep., 2012, vol. 32, pp. 113-130, p. 118	1-10
Y	JP 2015-167521 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 28 September 2015, claims (Family: none)	1-10
Y	JP 2006-304716 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) 09 November 2006, claims (Family: none)	1-10
A	LIANG, Yajun. et al., Transcriptional network analysis identifies BACH1 as a master regulator of breast cancer bone metastasis, Journal of biological chemistry, 2012, vol. 287, pp. 33533-33544	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12Q1/6897(2018.01)i, C12N15/12(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12Q1/6897, C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	HUANG Xudong.et al., Functional role of BTB and CNC homology 1 gene in pancreatic cancer and its association with survival in patients treated with gemcitabine, Theranostics, 2018, Vol.8, p.3366-3379, p.3371-3372, discussion	1-10
Y	藤岡秀一他, 膵管状腺癌における p53 蛋白発現と腫瘍血管新生に関する臨床病理学的検討, 日消外会誌, 2001, Vol. 34, p. 83-90, はじめに, 考察	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.05.2019

国際調査報告の発送日

21.05.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

松原 寛子

4 N

4154

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	BERNARDO Gina M. et al., FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer, Biosci. Rep., 2012, Vol. 32, p. 113-130, p. 118	1-10
Y	JP 2015-167521 A (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 2015.09.28, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2006-304716 A (国立大学法人名古屋大学) 2006.11.09, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-10
A	LIANG Yajun. et al., Transcriptional network analysis identifies BACH1 as a master regulator of breast cancer bone metastasis, Journal of biological chemistry, 2012, Vol. 287, p. 33533-33544	1-10