

平成 30 年 4 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09038

研究課題名(和文) 膵多段階発癌におけるmicroRNAの発現動態とその診断治療への応用

研究課題名(英文) microRNA expression during the multiple steps of pancreatic carcinogenesis

研究代表者

山本 夏代 (YAMAMOTO, Natsuyo)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：40599578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：正常マウスの膵組織と、膵特異的K-ras変異マウス内で誘導されるPanIN組織と、通常型浸潤性膵癌組織との三者でのmiRNA発現状況を比較した。その結果、miR-125bが正常膵組織から段階的に発現量が増えるmicroRNAとして同定できた。さらに、3次元培養ではmicroRNA125bが核内に移行することを見いだした。microRNA125bと結合する蛋白を質量分析にて同定したところ、Galectin 3というシャトリング蛋白が同定され、miR-125bの核移行への関与が示唆された。さらに、核内のmiR-125bは配列特異的にmRNAのスプライシングに関与していた。

研究成果の概要(英文)：We determined the microRNA expression profiles in normal pancreas tissues, PanIN tissues, and pancreatic carcinoma tissues. We found that miR125b is increasing proportionally to the pancreatic carcinogenetic steps. In addition, miR125b translocated into the nucleus when culturing the cells in three dimension and we found Galectin 3 binds to the miR125b, which may be involved in the translocation of this microRNA. Furthermore, miR125b in the nucleus was involved in the splicing of mRNAs depending on the sequences. These findings may be related with the pancreatic carcinogenesis by a novel pathway.

研究分野：膵がんの病態生理と発癌機構の解明

キーワード：膵発癌 microRNA スプライシング

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者はこれまで長年にわたり、膵癌患者に対する抗癌剤治療の最適化や内視鏡的な減黄術について臨床的検討を続けてきた。しかしながら、Gemcitabine や TS-1・FOLFILINOX といった抗癌剤の進歩と metallic stent をはじめとする内視鏡的な減黄術の改善によって膵癌患者の予後は以前に比べて確実に伸びてはいるものの、まだその成績は満足のものとは言えない。このような現状の膵癌患者の臨床を鑑みると、既存の方法を最適化することによる患者の予後延長には限界があると日々感じるようになり、既存の方法の改変ではなく、より本質的に、膵癌の発癌過程を明らかにすることによって、従来にない予防法・治療法を確立したいと考えるに至った。

いっぽう、本研究の研究分担者(伊地知)は、遺伝子改変マウスを用いてヒト膵癌に類似する組織像を呈するマウス膵癌モデルの作製に成功した。すなわち膵組織特異的に constitutively active Ras の発現と TGF-beta receptor typeII のノックアウトの遺伝子改変を施すことにより、生後3カ月ほどでヒト膵癌と同様の形態を示す膵癌自然発生モデルが樹立できた(Ijichi et al. *Genes Dev.* 2006;20:3147)。このマウスで大切な点は、TGF-beta receptor の knockout を除いて constitutively active Ras だけを膵組織で発現すると、膵癌の前癌病変である PanIN (Pancreatic intraepithelial neoplasia) を呈することである。このマウスは一年以上の経過で PanIN から通常型膵癌を発生するため、前癌組織 PanIN から進行膵癌 PDAC(Pancreatic duct adenocarcinoma)に convert していく過程を観察できるメリットがある。

もう一人の研究分担者(大塚)は、microRNA をはじめとする non-coding RNA の研究に以前から従事しており、特に最近では肝における microRNA122 の発現低下と肝癌悪性度との関連について in vivo, in vitro で解析し報告した(Kojima, Otsuka et al. *Nat Commun.* 2011)。その他にも多数の non-coding RNA について研究報告を行っており、今回の申請研究を遂行するために必要な RNA 研究の手法に精通しているため分担を依頼した。

本研究では、研究代表者の臨床的背景を踏まえた視点とこれらの研究分担者の得意分野を融合させることによって、治療や予防につながる膵発癌の病態解明を強力に推進することを目標にする。そのためには、膵の発癌過程における分子生物学的変化をさらに詳細に明らかにして、発癌過程における癌のドライバー変化を見出すことが必要と考える。

その一助として、本申請者らは上述の膵癌マウスモデルの発癌過程における組織を用いて microRNA 量の段階的な変化を検討し

た。すなわち正常膵コントロール、PanIN 組織、膵癌組織の三者での microRNA 発現量を比較したところ、例えば膵癌組織では正常膵に比較して microRNA-192 が 70 倍、microRNA-21 が 47 倍、microRNA-150 が 42 倍、microRNA-214 が 40 倍、microRNA-335 が 39 倍、もの発現量の増加を認めた。一方で、microRNA-216 は 0.01 倍、microRNA-217 は 0.02 倍、microRNA-802 は 0.2 倍、と強い発現量の抑制も認めた。さらに特筆すべきはこれらの microRNA は癌組織もしくは正常膵組織での発現絶対量が多いものであり、“発現量の少ないレベルでの測定値のブレ”ではない有意な発現量変化であることを確認している。さらに興味深いことに、これらの microRNA のほとんどは PanIN の段階から発現量変化があるものが多く、PanIN から通常型膵癌への癌化過程において段階的に変動しているものが多い点である。これらは前癌病変から通常癌への癌化過程において何らかの生物学的意義を持っている可能性が強く示唆される。いっぽう、段階的に変動している microRNA は全てではなく、逆に言えば PanIN では変化なく膵癌組織でのみ発現量変化があるもの、あるいは PanIN だけで発現量変化があり膵癌組織では変化が乏しいものもある。それらは、表現型の原因となっているのか表現型の結果なのかは不明ではあるものの、少なくともそれぞれの表現型に特異な microRNA とも考えられる。そこで本研究では、microRNA 発現量変化の膵癌発生過程での生物学的意義を解明することを背景とした。

2. 研究の目的

上記の背景に基づいて、

- 1) 膵癌発癌過程における段階的な microRNA の発現量変化の検定。
- 2) 膵発癌過程で発現量に変化のある microRNA の強制発現・ノックアウト系による表現型の解析 (in vitro)。
- 3) 発現量変動のある microRNA への介入による発癌抑止あるいは治療効果の検証を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膵多段階発癌の過程における microRNA 発現量変化

マウス膵がんモデル由来組織の経時的な変化として、特に PanIN と通常型進行膵癌の組織内での microRNA の発現量変化を miRNA microarray を用いて網羅的に検定する。正常コントロールマウスの膵組織と、膵特異的 constitutively active K-ras 変異マウス内で誘導される PanIN 組織と、膵特異的 constitutively active K-ras と TGF-β Receptor Type-II のノックアウトマウスによって誘導される通常型浸潤性膵癌組織との三者での miRNA 発現状況を比較し、継時的

な発癌過程の変化とした。

(2) 膵発癌過程で発現量に変化のある microRNA の強制発現・ノックダウン細胞

1) で抽出された、「PanIN の段階から発現量が変化している miRNA」は腫瘍発生前癌病態の形成から継続的に関与する microRNA の可能性があり、その生物学的機能を invitro で検討する。特に「発現量変化」はあくまでも表現型との相関でのみ見られるものであり、その表現型の「原因か結果か」は不明なため、その因果関係を明らかにすることを念頭に置いて解析を進める。そのためにヒト膵管細胞由来の正常細胞を hTERT によって不死化した hTERT-HPNE 細胞(ATCC より入手)に、各 miRNA あるいはノックダウン用アンチセンス核酸をレンチウイルスにて導入し、その表現型を“Hall marks of cancer”の各指標(増殖・細胞死抵抗性・浸潤性・血管新生性)に基づいて観察する。これらの microRNA あるいはそのアンチセンス核酸の発現系についてはすでに私たちが十分習熟している手法であり、迅速に進められると考えた。これらの観察の中から、発癌に寄与しそうな表現型をもつものについては colony formation assay や xenograft model による腫瘍形成能まで評価する(miR-21 他についてはすでに他の研究で oncogenic property を有することが報告されているので、おそらく腫瘍原生を持つものと想定している)。

また、PanIN から通常型膵癌のあいだでのみ発現変動のある miRNA については、前癌病変から通常型癌への進展に関わるか、あるいは進行癌になった結果 発現量が変化する miRNA とも考えられる。そこで、私たちがマウス PanIN 組織から単離し株化した細胞株(Ras の恒常的活性体を持つ膵管細胞)にこれらの miRNA もしくはアンチセンスの発現によって、その生物学的表現型が変化するかを観察する。

これらの検討で表現型が明らかなものについて、さらにその分子機構を解析する。そのためには、in silico からの miRNA の標的遺伝子の解明・cDNA array を用いた遺伝子発現解析・候補下流経路への介入によるリバーシ実験をとおして、生物学的機能変化を惹起しうる miRNA 異常発現から下流の分子経路について、解明・同定する。

4. 研究成果

(1) 膵多段階発癌の過程における microRNA 発現量変化

正常コントロールマウスの膵組織と、膵特異的 constitutively active K-ras 変異マウス内で誘導される PanIN 組織と、膵特異的な constitutively active K-ras と TGF- β Receptor Type-II のノックアウトマウスによって誘導される通常型浸潤性膵癌組織との三者での miRNA 発現状況を比較し、継時的な発癌過程の変化とした。その結果検討した 2000 種以上の miRNA の中で、miR-21, miR-192,

miR-194, miR-31, miR-142-5p, miR-125b などが正常膵組織と比較して通常型膵癌で強度に発現が増えていた。いっぽう、miR-802, miR-675, miR-187 など強く発現が減少していた。それらのうち、miR-21, miR-192, miR-194, miR-31, miR-125b は、PanIN の段階でもすでに正常膵組織と比較して発現が増えていたが、例えば miR142-5p は PanIN の段階では増加しておらず、PanIN から通常型膵癌に進展する過程で初めて発現量が変化する miRNA として抽出された。いっぽう減少している miRNA のなかでは、miR-802, miR-675 は PanIN の段階で既に発現が減少していたが、miR-187 は PanIN の段階では変化が無く、こちらも PanIN から通常型膵癌への進展に相関してはじめて発現量が減少する miRNA であることが示唆されている。

(2) 膵発癌過程で発現量に変化のある microRNA の強制発現・ノックダウン細胞

正常膵組織、PanIN 組織、膵癌組織と段階的に発現量が増える microRNA として microRNA125b に着目した。強制発現系を樹立したところ、3 次元培養で microRNA125b が核内に移行するという予想外の知見を見いだした。そこで もともと細胞質での機能がどのように変化するか、核内に移行することによって新たに得られる機能があるのか、を検討する方針とした。特に不死化したヒト正常膵管細胞を 3 次元培養すると核内に移行することから、核内に移行する機序についても検討を始めた。実際に microRNA125b を bait として、細胞内タンパクを RNA immunoprecipitation assay にて沈降し、そこから得られた検体で microRNA125b と結合する蛋白を質量分析にて同定したところ、Galectin 3 と呼ばれるシャトリング蛋白が同定された。これらの結果は細胞内での microRNA の細胞質から核への局在変化という発見に伴って、癌化過程における何らかの新規機能の同定につながる可能性がある。さらに、microRNA125b が核内に移行することで、RNA sequencing と bioinformatics を駆使することで、それがさらにある遺伝子のスプライシングに関与していることを見いだした。核内 microRNA が遺伝子のスプライシングに関与している報告は多くないが、これこそが膵癌の癌化過程におけるキーとなっている可能性が無いか、引き続き検討を続けている。

本研究過程で、RNA sequencing から得られる大量のデータから、Exon-intron の junction 付近のシークエンスを抽出したうえで、microRNA125b 配列との類似性で標的としての配列を抽出したところ、ADAMTSL5 というタンパクが同定された。この蛋白は PDL1 の発現・細胞膜表出に関わる因子であり、これのスプライシング変化を microRNA125b の発現および細胞内局在の変化がもたらすことによって、膵癌癌化過程における免疫チェックポイントからの逃避機構のひとつになってい

ることが推定された。したがって、この経路に介入することでこれまでにない新規の発癌予防方法が開発できることが想定される。今後は これらの知見を統合して、膵癌の発癌機序にせまり、予防法の開発につなげていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Ishigaki K, Nakai Y, Isayama H, Saito K, Hamada T, Takahara N, Mizuno S, Mohri D, Kogure H, Matsubara S, Yamamoto N, Tada M, Koike K. Thromboembolisms in Advanced Pancreatic Cancer: A Retrospective Analysis of 475 Patients. *Pancreas*. 2017 Sep;46(8):1069-1075. doi: 10.1097/MPA.0000000000000889.

Nakai Y, Isayama H, Yamamoto N, Matsubara S, Kogure H, Mizuno S, Hamada T, Takahara N, Uchino R, Akiyama D, Takagi K, Watanabe T, Umefune G, Ishigaki K, Tada M, Koike K. Indications for endoscopic ultrasonography (EUS)-guided biliary intervention: Does EUS always come after failed endoscopic retrograde cholangiopancreatography? *Dig Endosc*. 2017 Mar;29(2):218-225. doi: 10.1111/den.12752.

Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Yamamoto K, Yamamoto N, Kotani A, Koike K. Quantitation of circulating satellite RNAs in pancreatic cancer patients. *JCI Insight*. 2016 Jun 2;1(8):e86646. doi: 10.1172/jci.insight.86646

Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Ijichi H, Koike K. Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic processes via the dysfunction of YBX1. *Nat Commun*. 2016 Sep 26;7:13006. doi: 10.1038/ncomms13006.

Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Yamagami M, Ohno M, Takata A, Shibata C, Ishibashi R, Koike K. MicroRNAs and liver disease. *J Hum Genet*. 2017 Jan;62(1):75-80. doi: 10.1038/jhg.2016.53.

Nakagawa H, Suzuki N, Hirata Y, Hikiba Y, Hayakawa Y, Kinoshita H, Ihara S, Uchino K, Nishikawa Y, Ijichi H, Otsuka M, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Tateishi K, Koike K. Biliary epithelial injury-induced regenerative response by IL-33 promotes cholangiocarcinogenesis from peribiliary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017

May 9;114(19):E3806-E3815. doi: 10.1073/pnas.1619416114.

[学会発表](計3件)

大塚基之、リピート RNA の異常発現をめぐる膵がんの基礎と臨床 第9回 RNAi 研究会・第4回細胞外小胞学会 シンポジウム 2017.9.1.

大塚基之、「消化器疾患研究で広がる RNA ワールド」U45 消化器疾患イノベーションカンファレンス ~サイエンスでつながる次世代の会~ (招待講演) 2018.3.2.

Otsuka M, Pathological role and clinical usage of repetitive RNAs in pancreatic cancer. Tumor heterogeneity and Network (THEN) Research Center 2017 Annual Symposium Kyungpook National University Daegu Korea, 2017.9.11.

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ : <https://sites.google.com/site/225kenncrna/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 夏代 (YAMAMOTO, Natsuyo)
東京大学・医学部附属病院・登録研究員
研究者番号 : 40599578

(2)研究分担者

伊地知 秀明 (IJICHI, Hideaki)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 70463841

(3) 研究分担者

大塚 基之 (OTSUKA, Motoyuki)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 90518945