

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15498

研究課題名(和文)新規人工ウイルスによるDDSとmicroRNA制御による膵癌治療の新展開

研究課題名(英文)A novel treatment of pancreatic cancer through microRNA management using a drug delivery system by artificial virus.

研究代表者

永井 英司(NAGAI, Eishi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30264021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌肝高転移株を作製し、網羅的解析から肝転移に関わるmicroRNAとしてmiR-5100を同定し、さらにその標的分子としてpodocalyxin(PODXL)を特定した。PODXLの強制発現実験、膵癌組織の免疫組織化学染色から、PODXLが膵癌の治療標的となりうる可能性を示した。また、膵癌細胞に特異的な表面抗原としてCD110を同定し、人工ウイルスを腫瘍細胞特異的に輸送する際の表面マーカーとして利用可能である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We established a highly metastatic pancreatic cancer cell line, and identified miR-5100 as a microRNA related to metastatic characteristics of pancreatic cancer. Additional experiments revealed that miR-5100 directly regulates podocalyxin (PODXL) expression, and this pathway correlates with the aggressiveness of pancreatic cancer. Immunohistochemical analysis showed high PODXL expression of tumor correlates with distant metastasis of pancreatic cancer including liver metastasis. High expression of CD110 was observed in primary tumor and liver metastatic lesion of pancreatic cancer, but not in normal pancreatic ductal epithelium. Our data suggest that CD110 may be available as a cell surface marker of pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Pancreatic cancer microRNA miR-5100 podcalyxin (PODXL) CD110

1. 研究開始当初の背景

予後不良な消化器癌のひとつである膵癌に対して新規治療の開発が急務である。microRNA は1つの分子が複数のタンパク発現に関与しており、より効率的に腫瘍制御を行える可能性がある。しかし、microRNA の発現を修飾する分子を癌細胞に選択的に到達させる DDS(drug delivery system)は未だ確立されていない。そこで、古細菌の作る small heat shock protein (Mj285)を用いた、細胞内プロテアーゼによる脱殻機能を備えた標的細胞選択性の高い人工ウイルス粒子を、microRNA 発現修飾分子の DDS として用いることを着想した。

2. 研究の目的

予後不良消化器癌である膵癌において、microRNA が増殖能・浸潤能・化学療法抵抗性などに関与しているが、これを治療に応用するためには microRNA の発現を調節する分子を癌細胞に到達させるドラッグデリバリーシステム(DDS)が必要である。そこで、ナノカプセルを改変した新規人工ウイルスを用いて、腫瘍細胞特異的に輸送する DDS を構築し、microRNA をターゲットとした腫瘍制御と融合させ、新たな膵癌治療を開発することを目的とした。

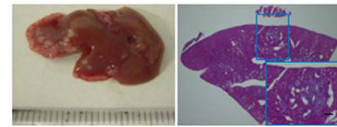
3. 研究の方法

(1)膵癌組織と正常膵組織・非浸潤膵腫瘍組織から選択的に RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行って、癌に特異的に発現変化のみられる microRNA を同定する。これまでの報告なども参考にし、細胞の生存、増殖、浸潤能、化学療法感受性などに関する microRNA を治療標的の候補として、膵癌細胞株を用いて、Anti-miR による抑制、または precursor の導入にて、増殖能、浸潤能、化学療法感受性の変化を検討する。
 (2) 決定した標的 microRNA の修飾分子 (precursor/Anti-miR) を内包した大きさ 20nm の人工ウイルス粒子を作成し、膵癌細胞株を用いて導入実験を行い、続いて手術切除標本から採取した膵癌細胞と膵星細胞をマウスの同所に移植したヒト膵癌にきわめて類似したマウスモデルを用いて導入実験を行う。

4. 研究成果

(1)治療標的となりうる microRNA-5100 の同定
 膵癌の肝転移に関わる microRNA の同定を行うために、ヒト膵癌細胞株をヌードマウスに同所移植し、形成された肝転移巣から樹立した癌細胞を別のヌードマウスに同所移植する操作を繰り返すことで、膵癌高肝転移株を樹立した(図 1)。ヒト膵癌細胞株 SUIT-2 を親株とする高肝転移株 (MS:metastatic SUIT-2) では、形態学的に親株と比べて紡錘形の形態を強くっており、遊走能及び浸潤

能が増強、接着能は低下していた。また、Panc-1 を親株とする高肝転移株 (MP:metastatic Panc-1) でも同様に遊走能が増強していたが、浸潤能は低下し、接着能については有意な変化を認めなかった。それぞれの癌細胞株において



	autopsy after injection	numbers of metastasis
SUIT-2	5-7W	1/10
MS	5-7W	7/10

図 1. 膵癌高転移株の作製

microRNA の網羅的解析を行ったところ、MS と MP において miR-4454 と miR-5100 が共通して発現低下していることがわかった。さらに RT-PCR でも共通して発現低下の見られた miR-5100 に着目した。この miR-5100 につ

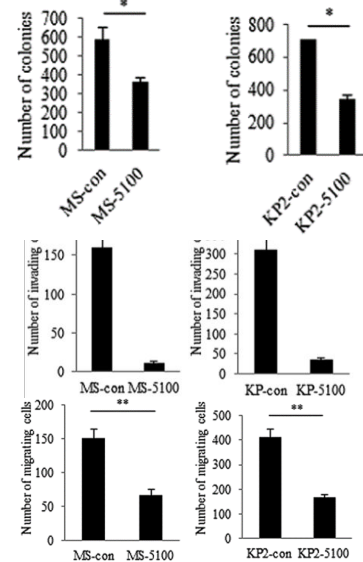


図 2. miR-5100 強制導入と増殖能(上)、遊走能(中)、浸潤能(下)

いて、RT-PCR にて当研究室で保有している 13 種の膵癌細胞株と膵管上皮細胞 HPDE の mRNA の発現を比較したところ、ほとんどの癌細胞において、HPDE に比べて miR-5100 の発現が低いことが分かった。特に発現の低かった MS と KP2 に miR-5100 を強制導入したところ形態学的には著明な変化は見られなかったが、癌細胞の増殖能・遊走能・浸潤能は有意に低下した(図 2)。接着能については MS で低下したが、KP2 では有意な変化は見られなかった。これらの結果から miR-5100 の発現増加は膵癌細胞の悪性度を低下させ、治療標的となりうることを示した。

(2)miR-5100 の標的分子として PODXL の同定
 miR-5100 の標的となる分子を同定するために mRNA の網羅的発現解析をおこない、Target Miner, Target Scan, Mir Database などの複数の予測プログラムから

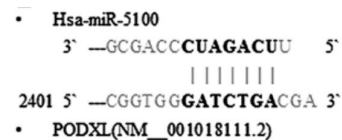


図 3. miRNA-5100 と PODXL の Binding site

miR-5100 に相補的な配列を持つ mRNA を絞り込み、候補の中から乳がんや卵巣がん、大腸がんなどの様々なや癌腫において予後マ

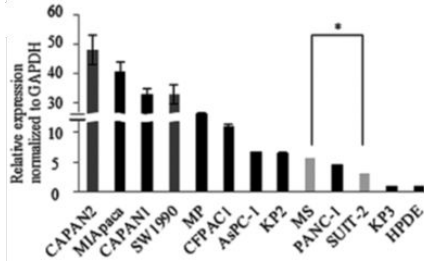


図 4. 各種癌細胞株の PODXL 発現

ーカーとして報告されている podocalyxin(PODXL)に注目した(図 3)。各種膵癌細胞株と HPDE について PODXL の発現を RT-PCR にて解析すると、各種膵癌細胞株では HPDE に比べて発現が高く、さらに MS においても SUIT-2 に比べて有意に発現が増加していることが分かった(図 4)。

PODXL の役割を調べるために膵癌細胞株 CAPAN-2 と MS において PODXL のノックダウンを行うと、miR-5100 を強制導入した時と同様

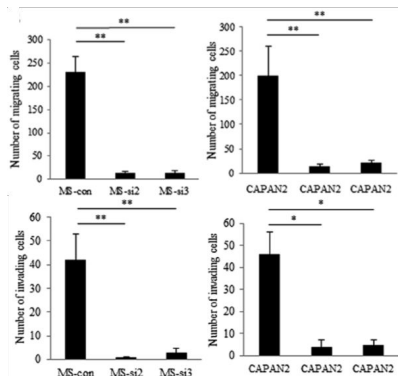


図 5. PODXL ノックダウンと遊走能(上), 浸潤能(下)

に膵癌細胞の遊走能・浸潤能が有意に低下した(図 5)。また、免疫組織化学染色を行って臨床データの解析を行ったところ、PODXL の発現と、予後や肝転移に有意な相関が見られた。以上から miR-5100 が PODXL の発現を制御することによって、膵癌の悪性度や肝転移に影響を与えていることが分かり、miR-5100 と PODXL の治療標的としての可能性を明らかにした。

(3)ヒト膵癌組織から樹立したオルガノイドを用いた Patient derived Xenograft モデルの作製

膵癌マウスモデルにおいて、miRNA-5100 の発現を抑制する人工ウイルスの効果を評価するために、ヒト膵癌組織から癌細胞を選択的に 3D 培養技術で樹立した膵癌オルガノイドをマウスに同所移植する、Patient derived Xenograft(PDX)モデルを作製した。人工ウイルスの組織移行性を評価するために、50nm の蛍光マイクロビーズをマウス尾静脈から投与し、IVIS、蛍光実体顕微鏡を用いた観察を行ったが、検出困難であり、評価法についてはさらなる検討が必要である。

(4)膵癌細胞に特異的な細胞表面マ

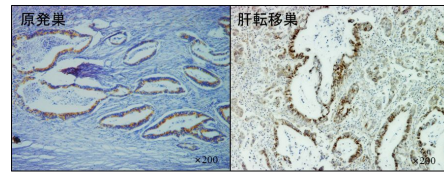


図 6. ヒト膵癌切除標本 CD110 免疫組織化学染色

ーカーの同定

癌細胞特異的な薬剤送達を実現するために必要な、膵癌細胞表面マーカーの検討において、myeloproliferative leukemia protein (MPL)や thrombopoietin receptor (TPO-R)として知られる一型膜貫通タンパクの CD110 は、正常膵組織の膵管上皮には発現せず、膵癌原発巣と肝転移巣で発現していることがわかった(図 6)。さらに RT-P

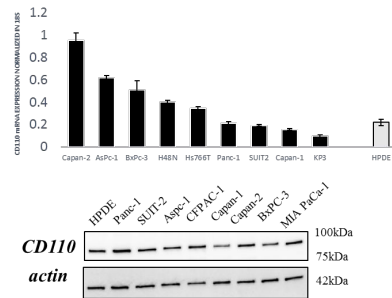


図 7. 各種癌細胞株の CD110 発現

CR、タンパク発現解析の結果から、膵癌肝高転移株では CD110 が高発現しており、CD110 発現を抑制すると、転写因子 MYC の発現が低下し、膵癌細胞の遊走能・浸潤能も有意に低下することが分かった(図 7)。免疫組織化学染色では、膵癌切除症例において、CD110 発現陽性群は陰性群よりも有意に予後不良であった。また、術後肝転移の出現についても相関性が認めら

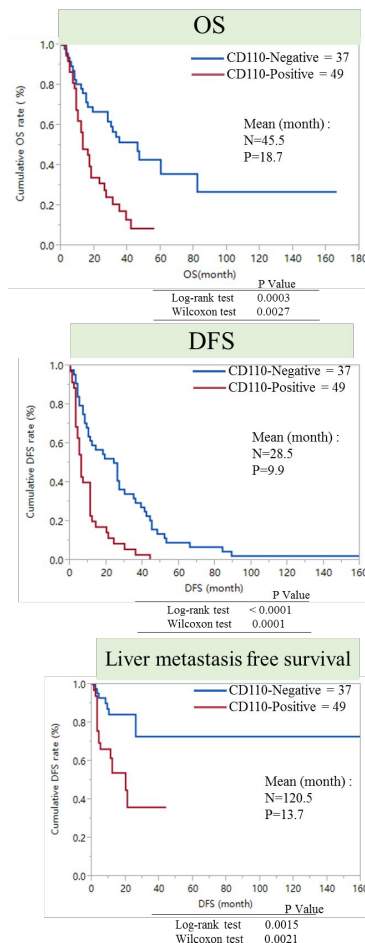


図 8. CD110 発現と OS(上), DFS(中), 肝転移(下)

れ、CD110 発現陽性群がより早く肝転移巣を形成することが分かった(図 7)。DDS の標的となる膵癌細胞特異的表面マーカーとして、また肝転移を制御する治療標的としての CD110 の可能性を明らかにした。

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 4 件)

Takashi Okumura, Kenoki Ohuchida, Masafumi Sada, Toshiya Abe, Sho Endo, Kazuhiro Koikawa, Chika Iwamoto, Daisuke Miura, Yusuke Mizuuchi, Taiki Moriyama, Kohei Nakata, Yoshihiro Miyasaka, Tatsuya Manabe, Takao Ohtsuka, Eishi Nagai, Kazuhiro Mizumoto, Yoshinao Oda, Makoto Hashizume, Masafumi Nakamura.

Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells.

Oncotarget, 8(11)18280-18295, 2017, 査読有 doi:10.18632/oncotarget.15430.

Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Mizuuchi Y, Iwamoto C, Murata M, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M. Autophagy is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice.

Gastroenterology, 152(6)1492-1506, 2017, 査読有, doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.010

Sada M, Ohuchida K, Horioka K, Okumura T, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility. Cancer Letters, 372(2):210-218, 2016, 査読有, doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.016.

Chijiwa Y, Moriyama T, Ohuchida K, Nabae T, Ohtsuka T, Miyasaka Y, Fujita H, Maeyama R, Manabe T, Abe A, Mizuuchi Y, Oda Y, Mizumoto K, Nakamura M. Overexpression of microRNA-5100 decreases the aggressive phenotype of pancreatic cancer cells by targeting PODXL. Int J Oncol. 48(4):1688-700, 2016, 査読有 doi: 10.3892/ijo.2016.3389.

[学会発表](計 3 件)

Koikawa K, Ohuchida K, Kibe S, Ando Y,

Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Okumura T, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Endo180 regulate phosphorylation of myosin light chain 2 activity and increase the ability of extracellular matrix remodeling in leading pancreatic stellate cells. 2016/10/27, Boston(USA)

Zilong Yan、大内田研宙、Zheng Biao、堀岡宏平、佐田政史、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、遠藤翔、肥川和寛、阿部俊也、中山宏道、武居晋、森山大樹、宮坂義造、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、肝癌における CD110 の臨床的意義と癌進展におけるその役割、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016/4/16、大阪国際会議場(大阪市)

吉田真樹、宮坂義造、大内田研宙、遠藤翔、阿部俊也、肥川和寛、齋子龍、千々岩芳朗、奥村隆志、佐田政史、堀岡宏平、鄭彪、森山大樹、真鍋達也、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、癌と間質を同時に標的とするカルパイン阻害薬カルペプチンの膵癌に対する治療効果の検討、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016/4/14、大阪国際会議場(大阪市)

[図書](計 1 件)

仲田興平、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史、膵癌における miRNA 発現と上皮間葉転換、胆と膵、36(10):1117-1122, 2015 医学図書出版

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 英司(NAGAI, Eishi)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号: 30264021

(2) 研究分担者

白羽根 健吾(SHIRAHANE, Kengo)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号: 10529803

仲田 興平(NAKATA, Kohei)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 30419569

(2015 年度)

宮坂 義浩 (MIYASAKA, Yoshihiro)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：40507795

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()