

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08626

研究課題名(和文) 膵臓癌の転移能および治療抵抗性獲得のメカニズム解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of metastatic ability and therapeutic resistance and development of novel therapeutic methods

研究代表者

蔵原 弘 (KURAHARA, HIROSHI)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：70464469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は膵癌組織を用いた網羅的microRNAスクリーニングにより、複数の癌抑制性microRNA(miR-148a, miR-124-3p, miR-130-5p, miR-204-5p, miR-30c-5p)とそのターゲット遺伝子を同定した。RNAネットワーク解析により複雑にコントロールされた膵癌進展および治療抵抗性獲得のメカニズムの一端を明らかにした。

治療前の血清CA19-9価や膵癌の転移や治療抵抗性に関与する分子(GLU-1, p53, PDGFR-)の発現を治療前の超音波内視鏡下生検検体を用いて評価し、膵癌に対する至適治療方針選択の一助になる可能性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行速度が速く、治療抵抗性が高い膵癌の治療成績を向上させるためには新規治療法および集学的な治療戦略の開発が急務である。我々は膵癌組織を用いた網羅的microRNAスクリーニングにより、複数の癌抑制性microRNAとそのターゲット遺伝子を同定した。それらを用いたネットワーク解析により、複雑にコントロールされた膵癌の進展や治療抵抗性獲得の一端を明らかにしたことで、膵癌に対する新規治療法の開発につながると思われる。治療前の生検検体を用いて各種治療法(化学療法や放射線治療)に対する抵抗性や転移能を評価することにより最適な治療戦略の構築が可能になるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the RNA sequence-based microRNA (miRNA) signature of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and identified multiple tumor-suppressive miRNA (miR-148a, miR-124-3p, miR-130-5p, miR-204-5p, and miR-30c-5p) and their target genes (PHLA2, ITGA2, ITGB1, EPS8, RACGAP1, and TOP2A). Through network analysis of the RNA, we revealed a part of mechanism of tumor progression and acquisition of resistance to treatment which are intricately controlled. We evaluated the levels of serum CA 19-9 and expression of several molecules (GLU-1, p53 and PDGFR-) in protein level, which are related to metastasis and resistance to treatment, using pretreatment specimens obtained by EUS-FNA. We demonstrated that these factors may be useful to select optimal therapeutic strategy for PDAC.

研究分野：消化器外科

キーワード：網羅的スクリーニング 癌遺伝子 microRNA EUS-FNA 術前治療 化学放射線療法 再発

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は多くの遺伝子変異を蓄積しつつ高い転移能や治療抵抗性を獲得し、その予後は極めて不良である。根治切除が長期生存を得られる唯一の手段であるが、根治切除術後であっても多くの症例が術後遠隔転移再発を来す。遠隔転移のメカニズム解明とその制御は膵臓癌の治療戦略における重要課題である。われわれはこれまで膵臓癌の転移形成における血管・リンパ管新生因子、上皮間葉移行 (EMT)、腫瘍関連マクロファージ (TAM) の意義に関して報告してきた。また、われわれの教室では膵臓癌の根治切除率向上および予後改善を目的として術前化学放射線療法 (NACRT) を積極的に行ってきた。効果的な NACRT を施行するためには治療抵抗性のメカニズム解明が重要である。われわれは NACRT の効果と炎症性因子との関連について報告してきた。しかし、複雑に制御される膵臓癌の転移能および治療抵抗性獲得のメカニズム解明と新規治療法開発のために、は更なる研究の発展が必要である。

2. 研究の目的

膵臓癌に対する shRNA ライブラリーを用いた *in vivo* での網羅的 shRNA スクリーニングによる新規転移遺伝子の検索はこれまで報告がなく、次世代シーケンサーを用いた網羅的 microRNA スクリーニングによる膵臓癌の microRNA プロファイリング作成も報告は非常に少ない。学術的独自性と独創性の高い研究であり、膵臓癌における転移能と治療抵抗性獲得のメカニズム解析と新規治療へつなげると考えられる。更に上述の転移抑制遺伝子や癌関連 microRNA を EUS-FNA 検体を用いて治療前に評価し、術前治療適応や治療内容に反映させる試みも独自性と独創性が高く効果的な膵臓癌治療戦略の構築を可能にすると期待される。膵臓癌の治療において、転移能や治療抵抗性獲得のメカニズムの解明と制御は重要課題である。本研究の主たる目的は以下の3点である。

(1) 網羅的 shRNA スクリーニングにより同定した新規膵臓癌転移抑制遺伝子による転移抑制のメカニズム解析および治療への応用。

(2) 網羅的 microRNA スクリーニングにより同定した癌抑制的および癌促進的 microRNA による転移能および治療抵抗性獲得のメカニズム解明と治療への応用。

(3) 超音波内視鏡下生検 (EUS-FNA) 検体を用いた転移能および治療抵抗性の予測。

3. 研究の方法

(1) 網羅的 shRNA スクリーニングにより同定した新規膵臓癌転移抑制遺伝子である HMP19 と ITIH5 に関して膵臓癌細胞株および動物実験にて機能解析を行った。更に手術により切除した膵臓癌組織における蛋白レベルでの発現と遠隔転移や予後との関連を検討した。

(2) 膵臓癌切除標本の癌部と非癌部を用いて網羅的 microRNA スクリーニングを施行し、癌抑制性および癌促進性の microRNA を同定した。複数の膵臓癌細胞株を用いて、同定した癌抑制性 microRNA の機能解析を行い、それぞれの microRNA のターゲット遺伝子の同定や予後との関連を検討した。

(3) 膵臓癌治療前の超音波内視鏡下生検 (EUS-FNA) 検体と膵臓癌切除標本を用いて、これまで同定した膵臓癌転移抑制遺伝子、転移関連分子、膵臓癌治療抵抗性に関連する分子の発現と治療効果および予後との関連を検討した。

4. 研究成果

本研究期間において以下のことを明らかにして報告した。

(1) 細胞ではグルコースからエネルギーを産生するが、癌細胞ではより多くのエネルギーを産生するために正常細胞で行われるミトコンドリアの酸化リン酸化よりも解糖系でエネルギーを産生する。Glucose transporter type 1 (GLUT-1) は解糖系の調節因子である。膵臓癌切除標本における GLUT-1 の発現は化学放射線治療の効果と相関していた。更に、膵臓癌治療前の EUS-FNA 検体を用いた評価で膵臓癌組織における GLUT-1 低発現症例では NACRT の奏効度が高く、引き続いて行われる外科切除により高い根治切除率と良好な予後と相関していた。ただし、EUS-FNA 検体を用いた評価では十分量の膵臓癌組織が採取されている必要があり、評価困難な症例も存在した。一方、GLUT-1 発現が PET 検査の SUVmax 値と相関しており、SUVmax 値が低い症例では NACRT の奏効度が高く、根治切除率が高く、予後も良好であった。ただし、血糖コントロールが不良の症例では PET 検査は偽陰性となる。EUS-FNA 検体を用いた評価と PET 検査による SUVmax 値による評価は相補的な関係であった。治療前の EUS-FNA 検体を用いた GLUT-1 発現評価もしくは PET 検査による SUVmax 値の評価は NACRT の奏効度の有用な予測因子であり、膵臓癌に対する治療法選択の一助になる可能性を示した。

(2) 術前画像診断にて切除可能と診断された膵臓癌においても多くの症例が術後早期に遠隔転移再発を来す。術前の血清 CA19-9 値と EUS-FNA 検体を用いた膵臓癌組織の p53 の発現が術後早期再発予測に有用であることを明らかにした。治療前の血清 CA19-9 > 85U/mL で p53 高発現である膵臓癌症例は画像上切除可能と判断されても術後早期遠隔転移再発の危険群であり、手術先行では予後不良である。術後早期再発危険群に対しては、術前治療を加えること

で再発率の低下と予後改善に寄与する可能性があることを示した。

(3) 膵癌切除標本における癌転移抑止遺伝子 HMP19 および ITIH5 の発現を評価し、HMP19 および ITIH5 が低発現である症例は高率に術後遠隔転移再発を来すことを明らかにした。

(4) 膵癌切除標本を用いた網羅的 microRNA スクリーニングにより多くの癌抑制性または癌促進性 microRNA を同定した。

膵癌組織において発現が抑制されている miR-148a の機能解析を行い、膵癌細胞において miR-148a を強制発現させると膵癌細胞の浸潤能が減弱することを示した。miR-148a は癌抑制性の microRNA であり、そのターゲット遺伝子である PHLDA2 が高発現している膵癌症例は有意に予後不良であることを示した。

膵癌における癌抑制性 microRNA として miR-124-3p を同定した。膵癌細胞において miR-124-3p を強制発現させると膵癌細胞の遊走能および浸潤能が減弱することを示した。更に miR-124-3p のターゲット遺伝子である ITGA3 と ITGB1 は膵癌細胞の遊走能および浸潤能を増強させ、膵癌における予後不良因子であった。膵癌細胞における miR124-3p の強制発現は ITGA3 と ITGB1 の発現を抑制することで膵癌細胞の遊走能および浸潤能を減弱させることを明らかにした。

膵癌における癌抑制性 microRNA として miR-130-5p を同定した。膵癌細胞において miR-130-5p を強制発現させると膵癌細胞の遊走能および浸潤能が減弱することを示した。miR-130-5p のターゲット遺伝子である EPS8 は膵癌細胞の遊走能および浸潤能を増強させ、膵癌における予後不良因子であった。膵癌 RNA ネットワーク解析により EPS8 を介する膵癌進展には MET, HMGA2, FERMT1, RARRES3, PTK2, MAD2L1, FLI1 のネットワークが強く関与していることを明らかにした。

膵癌における癌抑制性 microRNA として miR-204-5p を同定した。膵癌細胞において miR-204-5p を強制発現させると膵癌細胞の遊走能および浸潤能が減弱することを示した。miR-204-5p のターゲット遺伝子である RACGAP1 は膵癌細胞の遊走能および浸潤能を増強させ、膵癌における予後不良因子であった。膵癌 RNA ネットワーク解析により RACGAP1 を介する膵癌進展には MMP28, CEP55, CDK1, ANLN, S100A14 のネットワークが強く関与していることを明らかにした。

膵癌における癌抑制性 microRNA として miR-30c-5p を同定した。膵癌細胞において miR-30c-5p を強制発現させると膵癌細胞の増殖能、遊走能および浸潤能が減弱することを示した。miR-30c-5p のターゲット遺伝子である TOP2A は膵癌細胞の増殖能、遊走能および浸潤能を増強させ、膵癌における予後不良因子であった。TOP2A 高発現膵癌細胞は抗癌剤 (CDDP) 抵抗性であり、TOP2A をノックダウンすることで膵癌細胞の抗癌剤治療抵抗性が減弱することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kurahara H, Maemura K, Mataki Y, Sakoda M, Iino S, Kawasaki Y, Arigami T, Mori S, Kijima Y, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Significance of 18F-Fluorodeoxyglucose (FDG) uptake in response to chemoradiotherapy for pancreatic cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 644-651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-018-07098-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukuhisa H, Seki N, Idichi T, Kurahara H, Yamada Y, Toda H, Kita Y, Kawasaki Y, Tanoue K, Mataki Y, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 64
2. 論文標題 Gene regulation by antitumor miR-130b-5p in pancreatic ductal adenocarcinoma: the clinical significance of oncogenic EPS8	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 521-534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-019-0584-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Khalid M, Idichi T, Seki N, Wada M, Yamada Y, Fukuhisa H, Toda H, Kita Y, Kawasaki Y, Tanoue K, Kurahara H, Mataki Y, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Gene regulation by antitumor miR-204-5p in pancreatic ductal adenocarcinoma: The clinical significance of direct RACGAP1 regulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 E327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11030327.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kurahara H, Maemura K, Mataki Y, Sakoda M, Iino S, Kawasaki Y, Arigami T, Mori S, Kijima Y, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Significance of glucose transporter 1 (GLUT-1) expression in the therapeutic strategy for pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 1432-1439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-018-6357-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Idichi T, Seki N, Kurahara H, Fukuhisa H, Toda H, Shimonosono M, Okato A, Arai T, Kita Y, Mataka Y, Kijima Y, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 109
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: Impact of passenger strand of pre-miR-148a on gene regulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2013-2026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13610.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurahara H, Maemura K, Mataka Y, Sakoda M, Iino S, Kawasaki Y, Arigami T, Mori S, Kijima Y, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S.	4. 巻 47
2. 論文標題 A therapeutic strategy for resectable pancreatic cancer based on risk factors of early recurrence.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 753-758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001066.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka T, Okada R, Hozaka Y, Wada M, Moriya S, Satake S, Idichi T, Kurahara H, Ohtsuka T, Seki N	4. 巻 12
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: Impact of miR-30c-5p and miR-30-2-3p regulation on oncogenic genes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12102731.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurahara H, Maemura K, Mataka Y, Tanoue K, Iino S, Kawasaki Y, Idichi T, Arigami T, Mori S, Shinden Y, Higashi M, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Lung recurrence and its therapeutic strategy in patients with pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 89-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2019.11.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Idichi T, Seki N, Kurahara H, Fukuhisa H, Toda H, Shimonosono M, Yamada Y, Arai T, Kita Y, Kijima Y, Matakai Y, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Involvement of anti-tumor miR-124-3p and its targets in the pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: direct regulation of ITGA3 and ITGB1 by miR-124-3p	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 28849-28865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25599.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 蔵原 弘, 前村公成, 又木雄弘, 迫田雅彦, 飯野 聡, 川崎洋太, 橋口真征, 上野真一, 新地洋之, 夏越祥次
2. 発表標題 切除不能膵癌および切除境界膵癌に対する化学放射線療法
3. 学会等名 第118回日本外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Kurahara, Kosei Maemura, Yuko Matakai, Masahiko Sakoda, Satoshi Iino, Yota Kawasaki, Motoyuki Hashiguchi, Shinichi Ueno, Hiroyuki Shinchii, Shoji Natsugoe
2. 発表標題 Efficacy of neoadjuvant chemoradiotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 第30回日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蔵原 弘, 前村公成, 又木雄弘, 迫田雅彦, 飯野 聡, 川崎洋太, 橋口真征, 新地洋之, 夏越祥次
2. 発表標題 膵癌に対する術前化学放射線療法における予後を反映する効果判定
3. 学会等名 第49回日本膵臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Kurahara, Kosei Maemura, Yuko Mataka, Masahiko Sakoda, Satoshi Iino, Yota Kawasaki, Motoyuki Hashiguchi, Shinichi Ueno, Hiroyuki Shinchi, Shoji Natsugoe
2. 発表標題 Significance of neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer
3. 学会等名 IHPBA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蔵原 弘, 前村公成, 又木雄弘, 迫田雅彦, 飯野 聡, 川崎洋太, 橋口真征, 上野真一, 新地洋之, 夏越祥次
2. 発表標題 早期再発の危険因子に基づく切除可能膵癌に対する治療戦略
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蔵原 弘, 前村公成, 又木雄弘, 飯野 聡, 川崎洋太, 田上聖徳, 上野真一, 新地洋之, 夏越祥次
2. 発表標題 膵癌術後肺転移再発に対する適切な治療戦略
3. 学会等名 第119回日本外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蔵原 弘, 前村公成, 又木雄弘, 田上聖徳, 飯野 聡, 川崎洋太, 伊地知徹也, 新地洋之, 夏越祥次
2. 発表標題 Treatment strategy for stage I pancreatic cancer based on pretreatment diagnosis and recurrence
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Kurahara, Kosei Maemura, Yuko Matakai, Tetsuya Idichi, Michiko Higashi, Hiroyuki Shinchi, Shoji Natsugoe
2. 発表標題 Therapeutic strategy for recurrence in the lung after resection of pancreatic cancer
3. 学会等名 American Pancreatic Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蔵原 弘, 前村公成, 又木雄弘, 田上聖徳, 飯野 聡, 川崎洋太, 伊地知徹也, 上野真一, 新地洋之, 夏越祥次
2. 発表標題 膵癌切除症例における術前治療効果と術後補助療法
3. 学会等名 第120回日本外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蔵原 弘, 前村公成, 又木雄弘, 伊地知徹也, 飯野 聡, 川崎洋太, 保坂優斗, 上野真一, 新地洋之, 夏越祥次
2. 発表標題 Effect of neoadjuvant therapy for borderline resectable pancreatic cancer
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	又木 雄弘 (Matakai Yuko) (10444902)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任講師 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前村 公成 (Maemura Kosei) (30398292)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	新地 洋之 (Shinchi Hiroyuki) (60284874)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	夏越 祥次 (Natsugoe Shoji) (70237577)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関