

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16322

研究課題名(和文)膵臓癌・機能性RNA発現解析に基づく、局所浸潤・遠隔転移に関わる分子経路の探索

研究課題名(英文) Research on molecular pathways of local invasion and distant metastasis based on pancreatic cancer - functional RNA expression analysis

研究代表者

伊地知 徹也 (Idichi, Tetsuya)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：70791531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌におけるマイクロRNA発現プロファイルを用い、miR-204、miR-130b、miR-30a、miR-30cが膵臓抑制型マイクロRNAとしての機能を示し、特に膵臓の転移・浸潤に関わることを証明した。新たなターゲット遺伝子としてRACGAP1、EPS8、ITGA2/B1、TOP2Aを見出し、膵臓遺伝子であることを機能解析した。更に、これら遺伝子が膵臓予後に関連し、膵臓の機能性分子ネットワークに関して重要な役割を担っていることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓癌における明確な有効性を持った治療標的分子は未だ同定できておらず、本研究における「癌抑制型マイクロRNA」を介した機能性RNAネットワークの探索は、今後の膵臓分子標的治療における重要な情報提供を期待できる。有効な治療法の少ない膵臓癌において、新規の膵臓転移・浸潤抑制型マイクロRNAを解析することで、膵臓予後に関連するターゲット遺伝子を発見し、未だ報告のない新規分子やそれらの制御する機能性RNAネットワークの探求を行うことが可能だった。

研究成果の概要(英文)：Using the microRNA expression profile in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), it was demonstrated that miR-204, miR-130b, miR-30a, and miR-30c function as PDAC-suppressing microRNA, and are particularly involved in the metastasis and invasion of PDAC. RACGAP1, EPS8, ITGA2 / B1 and TOP2A were found as new target genes, and their functional analysis was performed as pancreatic cancer genes. Furthermore, we demonstrated that these genes are associated with PDAC prognosis and play an important role in the functional molecular network of PDAC.

研究分野：消化器外科

キーワード：マイクロRNA 膵臓 機能性RNAネットワーク Oncogene tumor-suppressor

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は早期発見が難しく、診断時には、局所浸潤や遠隔転移をきたしている症例が少なくない。膵癌症例全体で5年生存率は7%程度であり、現代の集学的治療を施しても、最も予後の悪い癌の一つである。近年開発が相次いでいる分子標的薬の効果も乏しく、進行症例に対する新規治療法の開発は急務である。申請者は、これまでに、次世代シーケンサーを用いた、膵癌・マイクロRNA発現プロファイルを作成し、膵癌細胞において発現異常(発現が亢進または抑制)しているマイクロRNAを複数同定している。

本研究では、これらマイクロRNAが制御する機能性RNAネットワークの探索を行う事により、膵癌の局所浸潤や遠隔転移に関わり、活性化している分子経路を探索する。この分子経路を遮断する戦略の探索は、有効な治療法が乏しい本疾患に対する、革新的な新規治療法の開発に繋がると考える。

### 2. 研究の目的

膵癌の生存率は全ての悪性腫瘍の中で最下位を占めている。現代のがん治療において、膵癌患者の予後改善は重要な命題である。膵癌の予後を期待できる治療法は根治切除であるが、膵癌は診断時に局所浸潤、遠隔転移を来している症例が多く、切除可能症例は10-20%に限られている。更に膵癌は切除後再発も高率に来すため治療に特に難渋する「がん」である。現在の膵癌化学療法の効果は限局的に留まっており、有害事象が強いことも問題となっている。局所治療と全身療法とのバランスがとれた新規治療法を見出すことが膵癌治療の鍵であり、膵癌の局所浸潤、遠隔転移に関わる分子メカニズムの解明によって、新たな治療標的となる分子経路を発見する可能性があり、革新的な治療戦略に繋がれると考えている。non-coding RNA(ncRNA)であるマイクロRNAは、細胞内での極めて複雑な分子ネットワークを形成しており、マイクロRNAの発現異常(亢進または抑制)が細胞内の機能性RNA分子ネットワークの破綻を引き起こし、癌を含んだヒト疾患の発症・進展に関わっている。マイクロRNAを含んだ機能性RNAを包括的に解析し、細胞内の複雑な機能性RNAネットワークを探索することで、治療標的の可能性のある分子経路を発見する事が可能である。

我々は、当教室で切除した膵癌臨床検体からRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて、膵癌部と正常膵部との遺伝子発現差による「膵癌・マイクロRNA発現プロファイル」を作成した。このプロファイルにおいて癌組織で発現抑制されているマイクロRNAは「癌抑制型マイクロRNA」の可能性が示唆され、一方、癌組織で発現上昇されているマイクロRNAは「癌促進型マイクロRNA」であることが示唆された。

これまでの概念では、マイクロRNAの生合成において、pre-miRNAから2本鎖のmiRNA duplexが形成される。そして、guide strand(主鎖)がRISCタンパクに取り込まれ標的遺伝子の制御を行う。これに対して、反対鎖のpassenger strand(副鎖)は、分解され機能を有しないとされ、解析対象から外されてきた。我々は、プロファイル中に、多数のpassenger strandが存在している事に着目した。passenger strandとされながら、転移・浸潤抑制型マイクロRNAとして機能している事を見出し、新たな解析対象とすることで、未だ報告のない新規分子の探求が可能だった。

### 3. 研究の方法

本研究は、次世代シーケンサーを用いて作成した、「膵癌・マイクロRNA発現プロファイル」に基づき、膵癌組織で発現変化しているマイクロRNAを指標にして、膵癌の生物学的悪性度や局所浸潤・遠隔転移に関与する分子経路を解明した。

(1)「膵癌・マイクロRNA発現プロファイル」に基づき、passenger strandも含めて膵癌組織で発現が抑制されているマイクロRNAに対して機能解析を施行し、「癌抑制型マイクロRNA」を探索する。同様に膵癌組織で発現が上昇しているマイクロRNAに対して機能解析を施行し、「癌促進型マイクロRNA」を探索する。

(2) 「癌抑制型マイクロ RNA」が標的とする膵癌の浸潤・転移に関与する分子経路を見出す。

(3) 活性化している分子経路を遮断する戦略を考案し、in vitro における検証を行う。

具体的な研究手法として、(1)は、膵癌組織で発現が有意に変化しているマイクロ RNA に着目し、膵癌由来の細胞株に、2本鎖 RNA であるマイクロ RNA-mimic やマイクロ RNA-inhibitor を核酸導入し、細胞増殖能、アポトーシス誘導能、細胞遊走能、細胞浸潤能を指標にして、「癌抑制型マイクロ RNA」「癌促進型マイクロ RNA」に機能分類する。(2)は、「癌抑制型マイクロ RNA」を核酸導入した細胞株より RNA を抽出し、網羅的な遺伝子発現解析を施行する。発現解析及びデータベース上の解析より、癌細胞内で発現変化の見られる標的遺伝子を選定し、siRNA を用いて膵癌での機能解析を行う。また、標的遺伝子をノックダウンした細胞株を用いて、更に下流で影響を受ける分子経路を見出す。これら分子経路が浸潤・転移において活性化しているか臨床病理学的因子を含めて解析する。(3)は、(1)(2)で見出した膵癌浸潤・転移に関与する分子経路に対して、経路の遮断、制御できるか検証する。方法として幾つか存在するが(分子標的薬、抗体、アンチセンス RNA など) 現実の治療を考慮すると、既存の治療薬の適応拡大が現実的である。まずは、活性化経路を遮断する既存の治療薬を探索し、その有効性を in vitro で実証する。更に膵癌の遺伝子発現と予後情報を組み合わせた公共のデータベース (TCGA database, <https://cancergenome.nih.gov/>) マイクロ RNA を核酸導入した細胞株を用いた網羅的な遺伝子発現解析 (GEO database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) luciferase reporter 解析を組み合わせることで、マイクロ RNA を起点とした機能性 RNA ネットワークの探索方法を独自に考案した。これまで報告が無いマイクロ RNA の機能解析と、これらマイクロ RNA の標的となる分子経路に基づく機能性 RNA ネットワーク探索を行うことで新規治療法を探求する。

#### 4. 研究成果

2018年、2019年は膵癌における機能性 RNA ネットワークを解析するため、当教室におけるマイクロ RNA 発現プロファイルを用い、miR-204、miR-130b の膵癌抑制効果を機能解析した。いずれのマイクロ RNA も癌抑制型マイクロ RNA としての機能を示し、特に膵癌の転移・浸潤に関わることを証明した。更に、新たに膵癌遺伝子として RACGAP1、EPS8 を見出した。miR-204 投与によって、RACGAP1 の発現は抑制され、同様に miR-130b 投与によって EPS8 の発現は抑制された。ルシフェラーゼアッセイを行うことで miR-204、miR-130b は RACGAP1、EPS8 を遺伝子配列依存的に制御することを証明した。また、RACGAP1、EPS8 は膵癌患者によって、独立した予後規定因子となっており、高発現患者では予後不良だった。次いで、これら遺伝子が影響を与える膵癌遺伝子の分子ネットワークを解析するに至った。特に miR-204 は膵癌・乳癌における機能解析から多くの癌腫で抑制効果を示すことが予想され、悪性腫瘍全般に対して重要な癌抑制機能を持っていることが示唆された。

2020年度は今までの研究成果より、新たにマイクロ RNA-30 family にターゲットを絞って研究を進めた。マイクロ RNA-30 family では miR-30a、miR-30c が膵癌抑制型マイクロ RNA であることを遊走能、浸潤能、増殖能を用いて実証し、更に miR-30a のターゲット遺伝子としてインテグリン A2/B1 を見出した。インテグリンは以前の報告として miR-124 のターゲット遺伝子として候補に挙がっており、ラミニン-インテグリン経路の発現上昇は膵癌にとって悪性化の活性化促進であることが証明され、膵癌予後に関与することが大規模データベースで判明した。また、miR-30c のターゲット遺伝子として TOP2A を見出し、膵癌予後不良因子であることが判明した。TOP2A は膵癌における細胞周期に関わる経路を制御しており、膵癌の増殖能にとって重要な役割をもつことを証明

した。現在も膵癌マイクロ RNA 研究を継続することで、新たな治療候補遺伝子を見出し、細胞実験より証明した。現在は新たなマイクロ RNA 発現プロファイル作成に入っており、今までの癌部 vs 非癌部の遺伝子比較だけではなく、術前化学療法の有無、術前放射線療法の有無、術前化学療法効果判定を考慮した個別での遺伝子発現プロファイルを作成している。化学療法においては癌の耐性化の原因検索や、個別化が必要となっており、新たな分子標的治療発見の可能性を期待している。更に、再発形式に注目しており、膵癌術後の局所再発群、遠隔転移群に群分けし、マイクロ RNA 発現と関連がないか検討している。

## 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 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Khalid Muhammad, Idichi Tetsuya, Seki Naohiko, Wada Masumi, Yamada Yasutaka, Fukuhisa Haruhi, Toda Hiroko, Kita Yoshiaki, Kawasaki Yota, Tanoue Kiyonori, Kurahara Hiroshi, Mataki Yuko, Maemura Kosei, Natsugoe Shoji	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 327 ~ 327
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 -

1. 著者名 Fukuhisa Haruhi, Seki Naohiko, Idichi Tetsuya, Kurahara Hiroshi, Yamada Yasutaka, Toda Hiroko, Kita Yoshiaki, Kawasaki Yota, Tanoue Kiyonori, Mataki Yuko, Maemura Kosei, Natsugoe Shoji	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 -

1. 著者名 Toda Hiroko, Seki Naohiko, Kurozumi Sasagu, Shinden Yoshiaki, Yamada Yasutaka, Nohata Nijiro, Moriya Shogo, Idichi Tetsuya, Maemura Kosei, Fujii Takaaki, Horiguchi Jun, Kijima Yuko, Natsugoe Shoji	4. 巻 14
2. 論文標題 RNA sequence based microRNA expression signature in breast cancer: tumor suppressive miR-101-5p regulates molecular pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 426 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12602	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 Idichi T, Seki N, Kurahara H, Fukuhisa H, Toda H, Shimonosono M, Okato A, Arai T, Kita Y, Mataki Y, Kijima Y, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 109(6)
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 Science	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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, Mataka Y, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 9(48)
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 -

1. 著者名 Toda H, Kurozumi S, Kijima Y, Idichi T, Shinden Y, Yamada Y, Arai T, Maemura K, Fujii T, Horiguchi J, Natsugoe S, Seki N.	4. 巻 63(12)
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of triple-negative breast cancer based on microRNA expression signatures: antitumor miR-204-5p targets AP1S3.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 1197-1210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0510-3	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 Shimonosono M, Idichi T, Seki N, Yamada Y, Arai T, Arigami T, Sasaki K, Omoto I, Uchikado Y, Kita Y, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 54(2)
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma: Identification of the antitumor effects of miR-145-3p on gene regulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 673-688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4657	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 Fukuhisa H, Seki N, Idichi T, Kurahara H, Yamada Y, Toda H, Kita Y, Kawasaki Y, Tanoue K, Mataka Y, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 -
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 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 -
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 -

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(3)
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 (Basel)	6. 最初と最後の頁 pii: 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 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tetsuya Idichi, Hiroshi Kurahara, Kousei Maemura, Yuko Mataki, Haruhi Fukuhisa, Yota Kawasaki, Satoru Iino, Masahiko Sakoda, Tanoue kiyonori, Shinichi Ueno, Hiroyuki Shinchii, Shouji Natsugoe
2. 発表標題 The effect of microRNA-124 on the phosphorylation pathway of integrin.
3. 学会等名 第31回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊地知徹也、蔵原弘、前村公成、又木雄弘、迫田雅彦、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 インテグリンを介したmiR-124による膵癌リン酸化シグナルの制御機構
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Idichi, Hiroshi Kurahara, Kousei Maemura, Yuko Mataki, Yota Kawasaki, Satoru Iino, Masahiko Sakoda, Shinichi Ueno, Hiroyuki Shinchii, Shouji Natsugoe
2. 発表標題 Invasion effect of Integrin 3/ 1 (ITGA3/ITGB1) on pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊地知徹也、蔵原弘、前村公成、又木雄弘、飯野聡、川崎洋太、田上聖徳、下村寛貴、上野真一、新地洋之、夏越祥次
2. 発表標題 膵癌における抑制型microRNA ; passenger-strandを用いた機能性RNAネットワークの探索
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Idichi, Hiroshi Kurahara, Kousei Maemura, Yuko Mataki, Yota Kawasaki, Satoru Iino, Masahiko Sakoda, Shinichi Ueno, Hiroyuki Shinchi, Shouji Natsugoe
2. 発表標題 Exploring downstream gene signals using pancreatic cancer-suppressing microRNA
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 Tetsuya Idichi, Hiroshi Kurahara, Kosei Maemura, Yuko Mataki, Haruhi Fukuhisa, Masahiko Sakoda, Satoshi Iino, Yota Kawasaki, Hiroyuki Shinchi, Shinichi Ueno, Shoji Natsugoe
2. 発表標題 Suppressor effect of pancreatic adenocarcinoma in passenger strands of microRNA
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------