

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2022
課題番号：19K07470
研究課題名(和文) microRNAを標的とした膵神経内分泌腫瘍の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutics for pancreatic neuroendocrine tumor targeting microRNA

研究代表者
平林 健一 (Hirabayashi, Kenichi)
富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：60514388
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)：本研究では、膵神経内分泌腫瘍(PanNET)における抗腫瘍薬の効果を制御するmiRNAを明らかにすることを目的とした。PanNET組織ではAKT1とmiR-185-5pの発現に負の相関傾向があり、PanNET細胞株においてmiR-185-5pはAKT1の発現を抑制することを明らかにした。miR-185-5p導入PanNET細胞ではコントロール細胞に比較し細胞増殖能が高かったが、mTOR阻害剤添加時では逆に細胞増殖抑制効果が増強した。この結果からは、miR-185-5pはAKT1の発現抑制と細胞増殖能亢進に関与する一方、mTOR阻害剤添加時にはその抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、PanNETにおける抗腫瘍薬の効果を制御するmiRNAを明らかにすることを目的とした。本研究の成果として、PanNET細胞においてmiR-185-5pがAKT1の発現を抑制し、さらにmTOR阻害剤の細胞増殖抑制効果を増強することを明らかにした。本研究の結果とその発展は、miRNAを用いたPanNET患者の新たな治療法の開発につながる可能性があり、学術的そして社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify miRNAs that regulate the effect of antitumor drugs in pancreatic neuroendocrine tumors (PanNETs). Results: miR-185-5p suppresses AKT1 expression in PanNET cell lines, as there is a negative correlation between AKT1 and miR-185-5p expression in PanNET tissue. Although miR-185-5p-transfected PanNET cells showed higher proliferative potential than control cells, the addition of mTOR inhibitor enhanced the inhibitory effect on cell proliferation, suggesting that miR-185-5p suppresses AKT1 expression in PanNET cell lines. These results suggest that miR-185-5p is involved in suppressing AKT1 expression and enhancing cell proliferative potential, while its antitumor effect is enhanced when an mTOR inhibitor is added.

研究分野：病理学

キーワード：膵臓 神経内分泌腫瘍 miRNA mTOR阻害剤 ソマトスタチンアナログ 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

膵神経内分泌腫瘍 (pancreatic neuroendocrine tumor: PanNET) は、膵臓の神経内分泌細胞から発生すると考えられている稀な腫瘍である。PanNET はいわゆるカルチノイドの形態をとる腫瘍で、増殖マーカーである ki67 の陽性率と核分裂数により G1, G2, G3 に亜分類される¹。PanNET は比較的低悪性度の腫瘍であるが、再発転移を繰り返す症例や予後不良な症例も少なくない。PanNET の治療の第一選択は手術による腫瘍切除であるが、切除不能例や再発転移例では薬物療法が用いられる。薬物療法として somatostatin analogue 製剤 (SA 製剤) や mTOR 阻害剤が主に使用される²。SA 製剤は腫瘍表面に発現する somatostatin receptor (SSTR) に結合することで、増殖抑制やホルモン症状抑制効果を発揮する。mTOR 阻害剤は腫瘍の分化・増殖、細胞代謝、血管新生に関わる mTOR の活性を選択的に阻害することで抗腫瘍効果を発揮する。SA 製剤や mTOR 阻害剤の治療効果は症例によって異なり、治療効果の高い症例がある一方、治療効果がみられない症例もある。

micro RNA (miRNA) は、18-25 塩基程の no-coding RNA で、mRNA に結合することにより細胞周期、代謝、老化などに関連する多くの遺伝子やタンパク質の発現を制御している。miRNA は正常組織と腫瘍組織では発現量や種類が異なることから新たなバイオマーカーとして期待されている。また、miRNA 創薬の研究も行われている³。SA 製剤や mTOR 阻害剤でも、その作用機序に関わる分子を制御する miRNA が働いていると考えられるが、これまで十分な解析は行われていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PanNET の治療に用いられる SA 製剤や mTOR 阻害剤の作用を制御する miRNA の発現と機能を明らかにすることである。本研究の推進により、miRNA に関連した PanNET の新たなバイオマーカーや革新的治療戦略の礎を築くことを目指す。

3. 研究の方法

(1) miRNA マイクロアレイによる SSTR2 関連 miRNA の解析

PanNET のホルマリン固定パラフィン包埋切片 (FFPE 切片) を対象として、SA 製剤の薬理作用に関わる SSTR2 の免疫組織化学を施行した。陽性および陰性腫瘍切片より miRNA を含む total RNA を抽出後、マイクロアレイにより miRNA の発現を網羅的に解析した。miRNA マイクロアレイにより抽出した miRNA について、PanNET 切除切片での発現を RT-qPCR により解析し、SSTR2 の発現との相関関係を検証した。

(2) PanNET 組織切片における AKT1 と miR-185-5p の発現と臨床病理学的検討

PanNET 切除検体の FFPE 切片を用い、mTOR 阻害剤の薬理作用に関わる AKT1 の発現と既知の miRNA である miR-185-5p の発現について免疫組織化学および RT-qPCR により比較検討を行った。また、臨床病理学的因子と AKT1 および miR-185-5p の発現との関連について検討を行った。

(3) PanNET 細胞株を用いた miR-185-5p による AKT1 の発現変動解析

PanNET 細胞株 QGP1 を用い、miR-185-5p の発現を miRNA mimic により過剰発現または miRNA

inhibitor により発現抑制させ、AKT1 の発現に変動があるか検討した。AKT1 の発現は、western blot および RT-qPCR により解析した。

(4) PanNET 細胞株を用いた miR-185-5p の発現と細胞増殖および mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果との関連について

miR-185-5p mimic/inhibitor を導入した PanNET 細胞の細胞増殖能を cell proliferation assay により解析した。さらに、miR-185-5p mimic/inhibitor 導入細胞および非導入細胞に mTOR 阻害剤 (エベロリムス) を添加し cell proliferation assay を行った。

4. 研究成果

(1) miRNA マイクロアレイによる SSTR2 関連 miRNA の解析

SSTR2 陽性 PanNET と比較し SSTR2 陰性 PanNET では 3 個の miRNA が発現増強 (fold-change 2 倍以上)、11 個の miRNA が発現減弱 (fold-change マイナス 2 倍以上) していた。その内、マイクロアレイで発現増強していた 3 個の miRNA について、TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/) で検索したところ、2 個の miRNA が SSTR2 を標的とすることが予想された。そこで、miRNA マイクロアレイにより抽出した 2 個の miRNA うち 1 個について、PanNET の FFPE 包埋組織切片を用い miRNA と SSTR2 の発現について比較検討を行った。しかしながら、検索した miRNA と SSTR2 の発現に統計学的な相関関係は認められなかった。

(2) PanNET 組織切片における AKT1 と miR-185-5p の発現と臨床病理学的検討

AKT1 の発現と miR-185-5p の発現には負の相関傾向が認められた。臨床病理学的因子との関連では、miR-185-5p の高発現は、modified ENET stage II-IV の PanNET と有意に関連していた。一方、AKT1 の低発現は、非機能性 PanNET、Ki67 陽性率 3% 以上および WHO grade 2-3 の PanNET と有意に関連していた。

(3) miR-185-5p 発現と AKT1 発現との関連性について

PanNET 細胞株 QGP1 に miR-185-5p の mimic または inhibitor を導入し、AKT1 の発現の変化について検討した。その結果、ネガティブコントロール細胞と比較し mimic 導入細胞では AKT1 の発現が有意に減弱していた。

(4) miR-185-5p の発現と細胞増殖および mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果との関連について

PanNET 細胞株 QGP1 に miR-185-5p の mimic または inhibitor を導入し、細胞増殖能の変化について検討した。その結果、ネガティブコントロール細胞と比較し mimic 導入細胞では細胞増殖率が高かった。次に、mTOR 阻害剤添加時の細胞増殖能の変化について検討した。mTOR 阻害剤を添加した検討では、mimic 導入細胞ではネガティブコントロール細胞に比較し細胞増殖抑制効果が高かった。逆に、inhibitor 導入細胞ではネガティブコントロール細胞に比較し細胞増殖抑制効果が減弱した。この結果からは、miR-185-5p は AKT1 の発現抑制と細胞増殖能亢進に参与することが示唆された。一方、mTOR 阻害剤添加時にはその抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

< 引用文献 >

1. World Health Organization Classification of Tumours, Digestive System Tumours,

5th, International Agency for research on Cancer, Lyon, France, 2019.

2. Pavel, M, Öberg, K, Falconi, M, et al.:Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 31: 844-860, 2020.

3. Di Leva, G, Briskin, DCroce, CM.MicroRNA in cancer: new hopes for antineoplastic chemotherapy. *Ups J Med Sci* 117: 202-216, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirabayashi Kenichi, Miyazawa Masaki, Takanashi Yumi, Morimachi Masashi, Kawanishi Aya, Saika Tsubasa, Nakagohri Toshio, Nakamura Naoya	4. 巻 12
2. 論文標題 miR-4653-3p overexpression is associated with a poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma via HIPK2 downregulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-022-22950-2	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 Hirabayashi Kenichi, Tajiri Takuma, Bosch Dustin E., Morimachi Masashi, Miyaoka Masashi, Inomoto Chie, Nakamura Naoya, Yeh Matthew M.	4. 巻 70
2. 論文標題 Loss of nectin 3 expression as a marker of tumor aggressiveness in pancreatic neuroendocrine tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 84～91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12881	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 Morimachi Masashi, Hirabayashi Kenichi, Takanashi Yumi, Kawanishi Aya, Saika Tsubasa, Ueyama Yumiko, Nakagohri Toshio, Nakamura Naoya, Suzuki Hidekazu, Kagawa Tatehiro	4. 巻 74
2. 論文標題 Low expression of DDX5 is associated with poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 741～745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jclinpath-2020-207002	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平林健一、福村由紀、田尻琢磨、内藤嘉紀、大久保陽一郎、高梨由美、中村直哉
2. 発表標題 膵pancreatic polypeptide産生神経内分泌腫瘍の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平林健一、森町将司、高梨由美、中村直哉
2. 発表標題 膵神経内分泌腫瘍G2の転移・再発に関わる臨床病理学的因子の検討
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平林健一、高梨由美、川西彩、森町将司、中村直哉
2. 発表標題 膵神経内分泌腫瘍におけるmiR185-5pによるsomatostatin analogue作用増強効果の検討
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019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	宮沢 正樹 (Miyazawa Masaki) (10554818)	東海大学・健康学部・講師 (32644)	
研究分担者	大池 信之 (Ohike Nobuyuki) (20286777)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	
研究分担者	大久保 陽一郎 (Okubo Yoichiro) (40516267)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局等・医長 (82713)	

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	福村 由紀 (Fukumura Yuki) (90407312)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	田尻 琢磨 (Tajiri Takuma) (60327913)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	内藤 嘉紀 (Naito Yoshiki) (50465712)	久留米大学・大学病院・准教授 (37104)	

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