

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390202

研究課題名(和文)

マイクロRNAによる浸潤性膵癌特異的な高効率アポトーシス誘導治療の開発

研究課題名(英文)

Invasive pancreatic cancer specific apoptosis induction therapy by microRNA.

研究代表者

下瀬川 徹 (TORU SHIMOSEGAWA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90226275

研究成果の概要(和文)：

本研究においては浸潤性膵癌を標的とした新規治療の開発のため、膵癌の浸潤傾向を規定する microRNA の同定とその標的遺伝子の解析を行った。浸潤性膵癌においては miR-126 の発現が低下していることを見出し、細胞遊走能と浸潤能を抑制していることを確認した。miR-126 の標的遺伝子として ADAM9 を新規に同定し、miR-126 の下流で細胞遊走能・浸潤能を制御することを確認した。miR-126/ADAM9 を介する経路は浸潤性膵癌特異的な治療標的となりうるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：

We performed the comprehensive analysis of microRNA expression profile to identify novel microRNAs which regulate invasiveness of pancreatic cancer. The cluster analysis identified miR-126 as a significantly down-regulated microRNA in invasive pancreatic cancer, which attenuates migration and invasion of pancreatic cancer cells. Furthermore, ADAM9 was newly identified as a target gene of miR-126, of which knockdown resulted in the decreased migration and invasion of pancreatic cancer cells. The miR-126/ADAM9 pathway could be a novel therapeutic target of invasive pancreatic cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵癌、EMT、microRNA

1. 研究開始当初の背景

本邦での膵癌の死亡数は2万人を超えており(2004年)、診断、治療技術の進歩にもかかわらず増加を続けているのが現状である。¹⁾ Stage I の切除膵癌例の5年生存率は52.5%と良好であることから、早期発見が膵癌患者の生命予後向上のための最良の方策

であることがわかる。しかし、Stage I で発見される例が全体のわずか2%以下であることはいかに膵癌の早期発見が困難で進行が早いのかを物語っている²⁾。膵癌の大多数例が含まれる根治不能例に対する治療に関しては Gemcitabine の登場によって、それ以前とは比較にならない程予後延長がもたらさ

れている感はあるものの、実際には以前に比べ数ヶ月の予後改善しか成しえていない。このように、早期発見が困難で、著しく予後の悪い膵癌の死亡数を減少させるためには、進行癌の進展を抑制する事が必須となる。

膵癌の進展に際しては上皮-間葉形質転換:epithelial to mesenchymal transition (EMT)と呼ばれる細胞形態の変化が重要である。EMTは上皮細胞が間葉系の性質を持ち移動能力を獲得する現象であり、癌の浸潤・転移機構のfirst stepと考えられている。我々はbone morphogenetic protein (BMP)シグナルが膵癌細胞のEMTを誘導し、その機構にhomeobox遺伝子であるMSX2が重要な役割を演じていることを見出した³⁾。また、MSX2遺伝子それ自身を膵癌細胞に導入するとTwist1の発現が亢進してEMTが誘導され、ヌードマウスの膵臓に同所移植すると肝転移が有意に増加することも確認した⁴⁾。癌細胞におけるEMTを抑制することは癌の浸潤・転移を抑制する新規治療となりうる事が期待されるが、EMTを誘導する各種のシグナルやその下流に位置するMSX2などの転写因子を直接の治療標的とすることは、正常組織への影響や適切なデリバリーシステムの構築といった面で技術的に困難であった。

このような課題を解決するため、本計画において我々が注目したのがmicroRNAである。近年その存在が明らかとなったmicroRNAは、タンパク質をコードしない小さなRNA分子であり、発生・分化・増殖など様々な生命現象に関わっていると考えられている^{5,6)}。このmicroRNAをコードする遺伝子は、ゲノム上に少なくとも数百存在し、大部分は既知の遺伝子とは関連しない領域に存在している。mature-microRNA二量体は、RNA干渉(RNAi)に関連しているRNA-induced silencing complex (RISC)と共に複合体を形成し機能すると考えられている。その作用機序は、microRNAと一部(部分的に)相補的なmRNAとの部分的(不完全な)ハイブリダイゼーションと、それに伴う転写および翻訳の抑制作用であると考えられている。

MicroRNAは複数のmRNAを同時に制御することが報告されており、癌化、EMTおよびapoptosisに関与する複数の遺伝子群が、少数のmiRNAによってコントロールされていることも推定されている。近年開発されたmicroRNA arrayを使用することにより網羅的な解析が可能となり、膵癌、慢性膵炎、正常膵組織を材料にmicroRNA arrayを行った報告ではその発現プロファイルの相異により、これらの疾患を鑑別可能であることが示された⁷⁾。しかしながら、膵癌の浸潤傾向を規定するmicroRNAの発現プロファイルに関しては未だ明確な知見が得られていない。膵癌細胞のEMTに関与するmicroRNAを同定し、

その機能を制御することで浸潤・転移過程を抑制しうる事が期待される。

引用文献 1) 人口動統計態統計によるがん死亡データ(1958年~2005年) 2) 膵癌登録報告 膵臓 2007. 3) Hamada S, et al. J Cell Physiol, 2007. 4) Satoh K, et al. Am J Pathol. 2008 5). Reinhart BJ, et al. Nature, 2000. 6) Brennecke J, et al. Cell, 2003. 7) Bloomston M, et al. JAMA, 2007.

2. 研究の目的

本研究では、microRNAの1つの分子が複数の蛋白発現を制御し、その結果として様々なシグナル経路を活性化あるいは抑制しているという事実に着目し、期間内に以下のことを計画する。

(1) 培養細胞および手術検体を用いて、膵癌細胞のEMTの詳細とその過程に関与するmicroRNAを同定する。

(2) EMTが生じている、つまり浸潤・転移機構の最初の段階にある癌細胞に対して特異的にEMTの抑制やapoptosisを誘導するmicroRNAの標的遺伝子を同定し、治療応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 手術検体を用いたmicrodissection
当院にて手術を施行したintraductal papillary mucinous adenoma (IPMA) 6例、intraductal papillary mucinous carcinoma (IPMC) 6例、浸潤性膵癌5例の切除組織をOCTコンパウンド(Sakura Finetek Japan)に包埋し、-80℃で凍結したのちクライオスタット(Leica, Nussloch, Germany)を用いて8μmに薄切した。各検体からの腫瘍腺管のmicrodissectionはLeica CIR MIC system (Leica microsystems, Wetzkar, Germany)を用いて行った。検体の採取、保管、使用については本学倫理委員会にて承認のうえ、患者の同意のもとに行った。

(2) 細胞培養

ASPC-1、BxPC3、Panc-1、MiaPaCa2、KLM-1は10% FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA)を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)で、5% CO₂ incubator中で37℃にて培養した。

(3) 培養細胞および手術検体からのRNA抽出
培養細胞およびmicrodissectionにて分離した腫瘍腺管からのRNA抽出はmirVana™ miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて行った。

(4) microRNA arrayによる手術検体および膵癌培養細胞株のmicroRNA発現プロファイルの比較

各検体より得られた100ngのtotal RNAを使用し、miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用いてcyanine 3-cytidine

bisphosphate による標識を行った。標識された RNA を Agilent Human microRNA microarray v2.0 (Agilent Technologies) とハイブリダイズし、スライドのスキャンを Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies) にて行った。各スポットの蛍光強度は Agilent Feature Extraction v.9.1.3.1 (Agilent Technologies) ソフトウェアにて行った。

各検体の raw data を robust multichip average method にて正規化し、線形モデルに当てはめて Bayesian t-test によるランク付けを行った。有意な発現変動を認める microRNA は δ (false discovery rate) = 0.01 の基準にて抽出した。

(5) microRNA 標的の同定

miR-126 の標的遺伝子の同定は TargetScan website (<http://www.targetscan.org/>) を利用して行った。

(6) 培養細胞における microRNA 強制発現
培養細胞における miR-126 の強制発現は Pre-miRTM miRNA Precursor (Applied Biosystems) を用いて行った。培養細胞への transfection は終濃度 200nM とし、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて行った。コントロールには Pre-miRTM miRNA Precursor Molecules Negative Control (Applied Biosystems) を使用した。

(7) 培養細胞における ADAM9 ノックダウン
培養細胞における ADAM9 ノックダウンは ON-TARGET plus SMARTpool siRNA against human ADAM9 (Dharmacon, Chicago, IL) を用いて行った。培養細胞への transfection は終濃度 100nM とし、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて行った。コントロールには ON-TARGET plus Non-targeting pool siRNA (Dharmacon) を使用した。

(8) Two-chamber アッセイ

Panc-1 および ASPC-1 における ADAM9 ノックダウンあるいは miR-126 強制発現による細胞遊走能・浸潤能の評価は 8 μ m pore 24-well BD FALCONTM Cell Culture Insert および BD BioCoatTM MatrigelTM Invasion Chamber (BD Biosciences, Bedford, MA) にて行った。Panc-1 では 10000 cells/well、ASPC-1 では 50000 cells/well の細胞を plating して評価した。

(9) ウェスタンブロッティング

細胞を cell lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% Sodium Deoxycholate) で処理し、タンパクを抽出した。タンパク濃度を Bradford assay kit (Dojin, Kumamoto, Japan) で測定後、5x

sample buffer (1M Tris-HCl, pH 6.8, SDS, glycerol, bromophenolblue) に溶解し、5 分間煮沸の後、12.5% SDS-PAGE Gel 上で電気泳動した。Blocking buffer (10 mmol Tris-HCl, pH 7.5, 100mmol NaCl, 0.1 % Tween 20, 5% dry milk) にて blocking 後、1 次抗体反応液中で、4 $^{\circ}$ C で約 18 時間反応を行った。2 次抗体を含む反応液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mmol NaCl, 0.1 % Tween 20) で室温、1 時間反応後、ECL plus chemiluminescence reagent (GE Healthcare, Piscataway, NJ) で可視化した。一次抗体は以下のものを使用した。 α -tubulin (T5168, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), E-cadherin (610181, BD), ADAM9 (2099 Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA)

(10) microRNA 標的遺伝子の 3' UTR アッセイ
miR-126 が ADAM9 を直接の標的としているかについて、pmirGLO vector (Promega, Madison, WI) を用いて評価した。ADAM9 mRNA の 3' UTR に存在する miR-126 結合配列を pmirGLO vector に組み込み、pMG-A9 vector を作成。同様に、miR-126 結合配列を変異させた pMG-A9M vector を作成した。これらの vector と miR-126 の co-transfection を行い、luciferase 活性を Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega) にて評価した。

4. 研究成果

(1) IPMA、IPMC、浸潤性膵癌およびヒト膵癌細胞株の microRNA 発現プロファイルの検討
図 1 に示す如く、IPMA、IPMC、浸潤性膵癌手術検体の凍結切片から microdissection にて腫瘍腺管を抽出した。

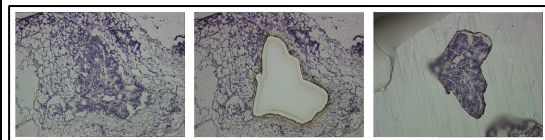


図 1

microRNA array による各サンプルでの microRNA 発現プロファイルを使用し、図 2 に示す如くクラスター解析を行った。その結果、IPMA と IPMC では microRNA の発現プロファイルに大きな差異は認められず、IPMA または IPMC と浸潤癌・膵癌細胞株との間で有意な発現変動がみられる microRNA が抽出された。

浸潤癌及び膵癌細胞株で共通して統計学的な有意差を持って発現が変化していた microRNA は、発現増加が 5 種、低下が 48 種であった (図 3)。

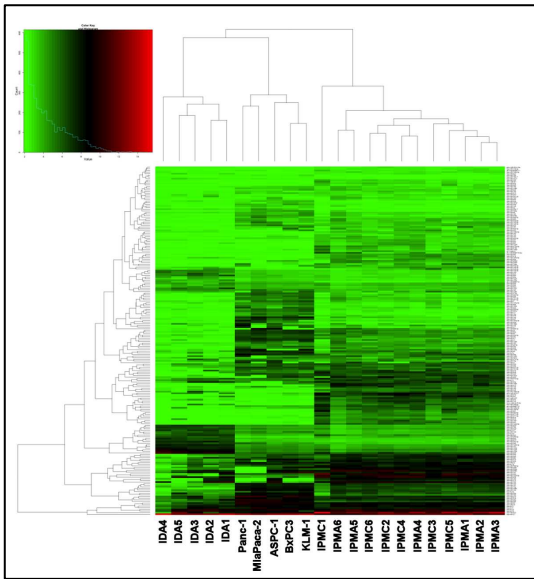


図 2

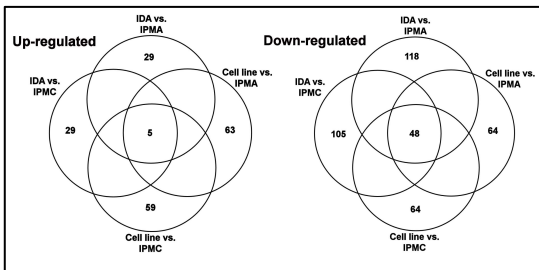


図 3

発現増加を認めた microRNA には既報にて膵癌での高発現やゲムシタピン耐性との関連が報告されている miR-21 が含まれており、¹⁾²⁾ 本手法の妥当性を示すものと考えられた。発現低下を認めた microRNA には乳癌での発現低下と浸潤能との関連が報告されている miR-145 や ³⁾、肺癌での発現低下と増殖能との関連が報告されている miR-126 が含まれていた ⁴⁾。その後の検討では膵癌での機能が明らかとされていない miR-126 について解析することとした。

(2) miR-126 強制発現の膵癌細胞への影響

ヒト膵癌細胞株 Panc-1 および ASPC-1 に miR-126 precursor を transfection し、細胞遊走能と浸潤能への影響を検討した。miR-126 の強制発現により、コントロールに比べて 50-80% の遊走能・浸潤能の低下が確認された (図 4)。

このような変化に伴い、miR-126 を強制発現させた細胞では上皮系マーカーである E-cadherin の発現が上昇していることが確認された (図 5)。

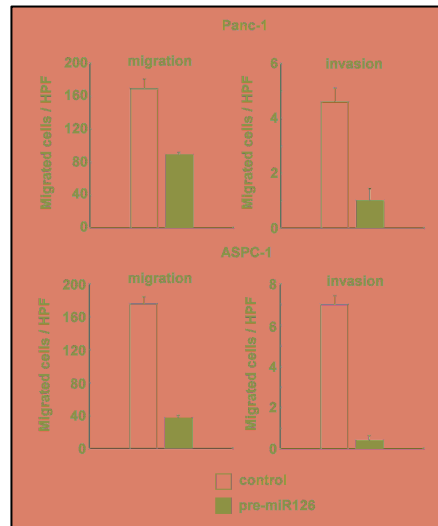


図 4

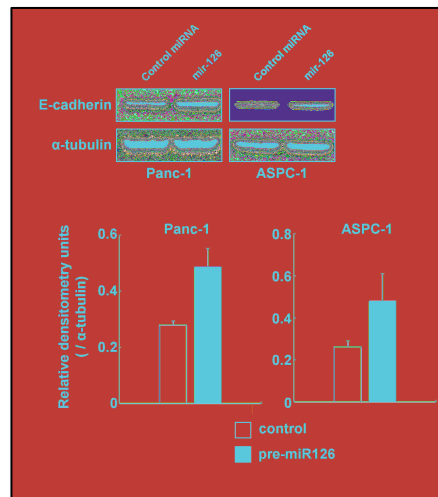


図 5

(3) miR-126 標的遺伝子の推定

TargetScan database により、種の間でも保存性の高い 3' UTR 配列を有する 17 種類の遺伝子が潜在的な miR-126 の標的遺伝子として同定された。これらの遺伝子につき、表 1 に示す。

PTPN9	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9
PLXNB2	plexin B2
KANK2	KN motif and ankyrin repeat domains 2
ADAM9	ADAM metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)
KIAA1715	KIAA1715
LRP6	low density lipoprotein receptor-related protein 6
CRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)
RNF165	ring finger protein 165
FBXO33	F-box protein 33
PCDH7	protocadherin 7
RGS3	regulator of G-protein signaling 3
PEX5	peroxisomal biogenesis factor 5
PLK2	polo-like kinase 2 (Drosophila)
SLC7A5	solute carrier family 7 member 5
DIP2C	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog C (Drosophila)
THAP6	THAP domain containing 6
TRAF7	TNF receptor-associated factor 7

表 1

これらの遺伝子のうち、癌における機能が報告されているものとしては乳腺の腫瘍形成を促進する作用を持つ CRK⁵⁾や各種臓器由来の癌における肺転移巣で高発現を示す SLC7A5⁶⁾が含まれていた。これらの標的遺伝子のうち、disintegrin と metalloprotease domain を有する ADAM9 は以前に膵癌で高率に発現していることが報告されており、予後との関連も示唆されている⁷⁾ため、miR-126 との関連につき更なる検討を行った。miR-126 と相互作用し得る ADAM9 の 3' UTR 配列と、ヒトを含む複数の種での保存性について図 6 に示す。

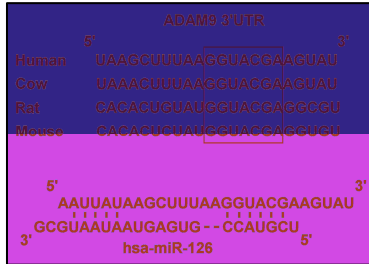


図 6

miR-126 を強制発現させた膵癌細胞株における ADAM9 の発現レベルをウエスタンブロットにて検討したところ、図 7 に示す如く発現レベルの低下が確認された。

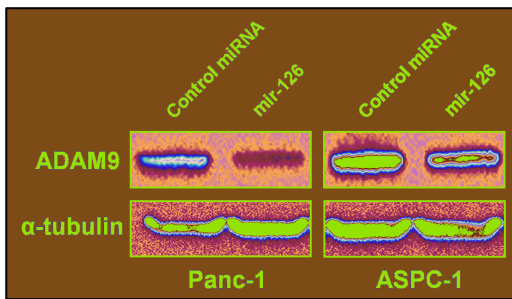


図 7

(4) ADAM9 ノックダウンの膵癌細胞への影響

ADAM9 の細胞遊走能・浸潤能への影響を確認するため、ヒト膵癌細胞株 Panc-1 および ASPC-1 に ADAM9 siRNA を transfection して細胞遊走能と浸潤能への影響を検討した。siRNA による ADAM9 のノックダウンは両細胞株において良好であった (図 8)。

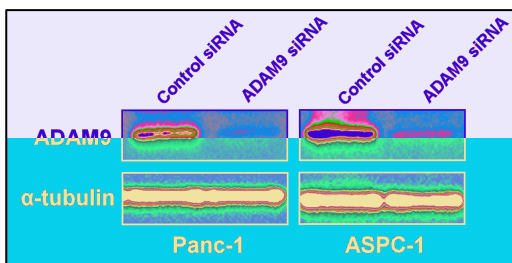


図 8

ADAM9 のノックダウンにより、miR-126 の強制発現と同様、コントロールに比べて 50-60% の遊走能・浸潤能の低下が確認された (図 9)。

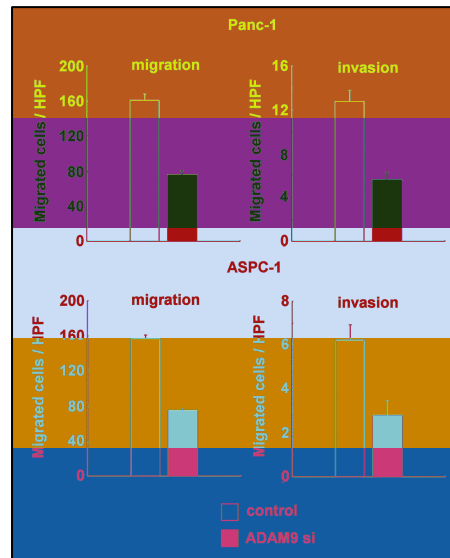


図 9

このような変化に伴い、ADAM9 をノックダウンした細胞では上皮系マーカーである E-cadherin の発現が上昇していることが確認された (図 10)。

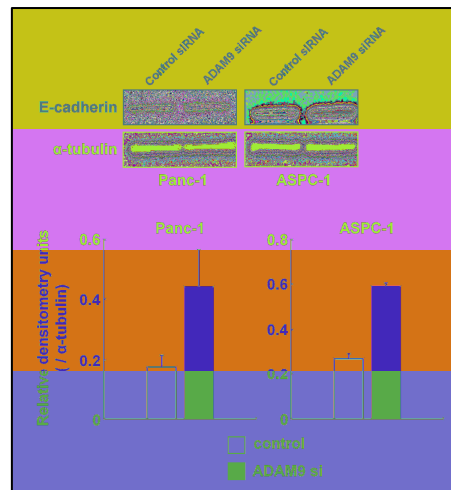


図 10

(5) ADAM9 3' UTR と miR-126 の相互作用

ADAM9 3' UTR と miR-126 の相互作用の特異性を確認するため、3' UTR アッセイを施行した。データベースにて確認された野生型 ADAM9 3' UTR 配列を有する pMG-A9 レポーターと miR-126 結合配列を図 11 の如く変異させた pMG-A9M レポーターを作成した。



図 11

ヒト膵癌細胞株 Panc-1 および ASPC-1 に上述のレポーターを transfection したのち、miR-126 precursor を transfection してレポーター活性を検討した。図 12 に示す如く、pMG-A9 レポーターの活性は miR-126 の存在下でコントロール処理より低下しており、この効果は ADAM9 3' UTR 配列を変異させることにより消失することが確認された。この結果から、miR-126 は ADAM9 の 3' UTR に直接作用し、その発現を制御することが確認された。

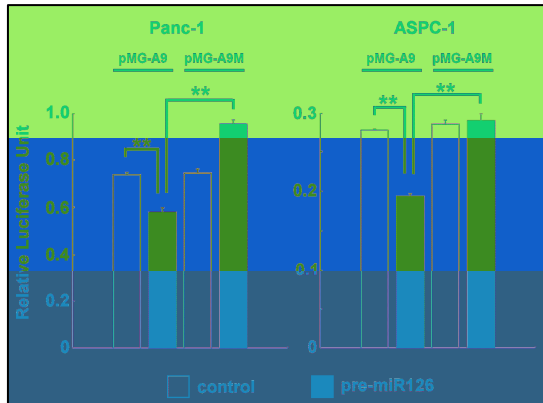


図 12

(**; $p < 0.01$, ANOVA)

引用文献 1) Giovannetti E et al. Cancer Res, 2010. 2) Ali S et al. Cancer Res, 2010. 3) Götte M et al. Oncogene, 2010. 4) Sun Y et al. Biochem Biophys Res Commun, 2010. 5) Fathers KE et al. Am J Pathol, 2010. 6) Kaira K et al. Cancer Sci, 2008.

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 13 件)

1. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Umino J, Ito H, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Shimosegawa T.

The homeobox gene MSX2 determines chemosensitivity of pancreatic cancer cells via the regulation of transporter gene ABCG2.

J Cell Physiol. 2011 Apr 4. doi: 10.1002/jcp.22781. [Epub ahead of print] 査読有

2. Hamada S, Shimosegawa T.

Biomarkers of pancreatic cancer.

Pancreatol. 2011;11 Suppl 2:14-19. 査読有

3. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Ishida K, Umino J, Ito H, Kikuta K, Kume K, Masamune A, Katayose Y, Unno M, Shimosegawa T.

Calcium-binding protein S100P is a novel

diagnostic marker of cholangiocarcinoma. Cancer Sci. 2011 Jan;102(1):150-156. 査読有

4. Satoh K, Hamada S, Kanno A, Ishida K, Ito H, Hirota M, Masamune A, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T.

Evaluation of MSX2 mRNA in brush cytology specimens distinguished pancreatic carcinoma from chronic pancreatitis.

Cancer Sci. 2011 Jan;102(1):157-161. 査読有

5. Kanno A, Satoh K, Hirota M, Hamada S, Umino J, Itoh H, Masamune A, Asakura T, Shimosegawa T.

Prediction of invasive carcinoma in branch type intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.

J Gastroenterol. 2010 Sep;45(9):952-959. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Unno J, Shimosegawa T.

THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF CANCER STEM CELL-RELATED GENE ABCG2 BY THE HOMEBOX GENE MSX2.

International Association of Pancreatology & Indian Pancreas Club 2011, Cochin, India, Feb 13 2011

2. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Ito H, Shimosegawa T.

The regulation of stem cell related genes by the homeobox gene MSX2 in pancreatic cancer cells.

DDW 2010 New Orleans, USA, May 2 2010

3. 濱田晋 佐藤賢一 下瀬川徹

ヒト膵癌における stem cell-like phenotype と microRNA 発現プロファイル

2010 年 4 月 23 日 第 96 回 消化器病学会総会 新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下瀬川 徹 (TORU SHIMOSEGAWA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90226275

(2) 研究分担者

佐藤 賢一 (KENNICH I SATOH)

東北大学・病院・講師

研究者番号: 10282055

濱田 晋 (SHIN HAMADA)

東北大学・病院・医員

研究者番号: 20451560

(3) 連携研究者

()

研究者番号: