

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590803

研究課題名（和文）マイクロ RNA による膵星細胞活性化制御機構の解明とその治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of the micro-RNA-mediated regulation of pancreatic stellate cell activation and its therapeutic applications.

研究代表者

正宗 淳 (MASAMUNE ATSUSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：90312579

研究成果の概要（和文）：

膵星細胞は慢性膵炎や膵癌の際にみられる膵線維化の形成に中心的役割を果たす。膵星細胞の活性化に関わるマイクロ RNA の同定を行った。ラット膵星細胞では、培養による活性化に伴い miR-100、miR-128、miR-143 の発現が上昇する一方、miR-126、miR-200 の発現手低下が認められた。現在、これらの活性化に関わる意義につき、強制発現系ならびに抑制系を用いて解析を進めるとともに、ヒト膵星細胞の活性化における関与についても、検討を進めている。

研究成果の概要（英文）：

There is accumulating evidence that pancreatic stellate cells (PSCs) play a pivotal role in pancreatic fibrosis associated with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. We compared microRNA expression profiles between freshly-isolated (quiescent) rat PSCs and culture-activated PSCs. We found that the expression of miR-100, miR-128, miR-143 was increased whereas that of miR-126 and miR-200 was decreased upon activation by culture in serum-containing medium. The functional consequences of these alternations are currently under investigation.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 2,100,000 | 630,000   | 2,730,000 |
| 2009 年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 2010 年度 | 600,000   | 180,000   | 780,000   |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：膵炎、膵癌、線維化、マイクロ RNA、上皮間葉転換、放射線治療、膵星細胞、interleukin-33

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓における線維化は慢性膵炎や膵癌の際にみられる特徴的病理所見である。膵線維化の分子機序は長い間不明であったが、活性化した膵星細胞がその形成に中心的役割を果たすことが明らかになってきている。膵星細胞は、主に膵腺房細胞周囲に存在し、肝線

維化に中心的役割を果たす肝星細胞と形態学的にも機能的にも類似している。膵星細胞は細胞質にビタミン A を含む多くの脂肪滴が存在する細胞として、普段は静止状態にある。膵に炎症や傷害が加わると、膵星細胞は脂肪滴を失い、活発に増殖し、I 型コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスを豊富に

産生するようになる。この際に腓星細胞では  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の発現が高度となり、筋線維芽細胞様の形態を呈するようになる。この過程を腓星細胞の活性化と称する。活性化に伴い、転写因子やシグナル伝達系関連遺伝子を含めた広範な遺伝子発現変化が起こる。実際、我々は p38 MAP kinase や Rho-ROCK 系、c-Jun N-terminal kinase 系が、腓星細胞の活性化に関与することを明らかにしてきた。しかしながら、単一の分子やシグナル系を抑制するのみでは、腓星細胞の活性化に伴う、広範な遺伝子発現変化をコントロールすることは困難であった。換言すれば、腓星細胞の活性化をコントロールするためには、効率よく複数の経路を同時に制御することが必要であり、そのためにはシグナル系の最上流にある少数の分子をターゲットとすべきである。しかし腓星細胞の活性化に関わる、そのような分子は明らかではない。

さて近年、その存在が明らかとなったマイクロ RNA (miRNA) 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る。その作用機序は、miRNA と一部 (部分的に) 相補的な messenger RNA 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。そのため単一の miRNA が、タンパク質をコードする複数の messenger RNA の翻訳を制御するという、今までに類のない、まったく新しい遺伝子発現制御に関わる重要な機能性 RNA 分子といえる。つまり、1 つの miRNA の機能を阻止、あるいは増強させることによって、複数の messenger RNA とその産生蛋白下流のシグナルが抑制あるいは増強される。したがって、あるシグナル経路の最も上流を支配するものが、miRNA という可能性も十分にある。この点に着目すると、腓星細胞の活性化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が想定される。そのような miRNA をターゲットとすることにより、効率よく腓星細胞活性化に伴う、広範な分子やシグナル系をコントロールしようと考え、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

腓星細胞の活性化に関わる miRNA を明らかにすること。あわせて腓星細胞の腓疾患の病態・進展における役割をさらに明らかにすること。

## 3. 研究の方法

Wistar 系雄性ラットから分離した腓星細胞の miRNA プロファイル、Agilent 社製の miRNA microarray を用いて、分離翌日の未だ静止期にある細胞と、血清存在下で 2 週間培養することにより活性化した細胞間で比

較した。

一方、腓星細胞の腓疾患における意義についてさらに明らかにするために、1) 新しい IL-1 ファミリーである IL-33 の腓星細胞における発現と細胞機能調節、2) 腓癌細胞の浸潤、転移に深く関わりとされる epithelial-mesenchymal transition (EMT, 上皮間葉転換) を腓星細胞が誘導するか、3) 腓星細胞と腓癌細胞を *in vitro* ならびに *in vivo* で共培養し、放射線感受性に影響を与えるか、について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 腓星細胞の活性化に伴う miRNA プロファイルの検討

Wistar 系雄性ラットから分離した腓星細胞では、活性化に伴い miR-100、miR-128、miR-143 の発現が上昇する一方、miR-126、miR-200 の発現手低下が認められた。現在、これらの活性化に関わる意義につき、強制発現系ならびに抑制系を用いて解析を進めるとともに、ヒト腓星細胞の活性化においても同様に関与するか、検討を進めている。

### (2) 腓星細胞における IL-33 発現の検討

腓星細胞において IL-33 の発現は、主に核に認められた。その発現は、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PDGF-BB、IFN- $\gamma$ にて増強したが、TGF- $\beta$ では影響されなかった。IL-1 による IL-33 発現誘導は、主に NF- $\kappa$ B ならびに ERK 経路の活性化により、PDGF による IL-33 発現誘導は主に ERK 経路により制御されていた。ヒト組み換え IL-33 は増殖やサイトカイン産生、コラーゲン産生などの腓星細胞機能に影響しなかったが、siRNA 導入により IL-33 発現を抑制すると、PDGF による細胞増殖誘導が減弱したことから、IL-33 が PDGF による細胞増殖誘導に関与している可能性が示唆された。

### (3) 腓星細胞による腓癌細胞 EMT 誘導

Culture insert を用いた間接的共培養系による検討で、腓星細胞が Panc-1 および SUIIT-2 腓癌細胞における間葉系マーカーである vimentin 発現を増強する一方、上皮系マーカーである E-cadherin および cytokeratin19 発現を減弱することが示された。この変化は、TGF- $\beta$ に対する中和抗体投与では抑制されず、TGF- $\beta$ 以外の機序が想定された。

### (4) 腓星細胞による腓癌細胞放射線感受性への影響

腓星細胞と直接共培養した場合、単独培養に比べて放射線による腓癌細胞コロニー生成減少は有意に抑制された。マウスに放射線を単回あるいは分割投与して場合のいずれにおいても、腓星細胞を同時接種した場合、放射線による腫瘍径増大抑制効果は減弱し

た。In vitro における膵星細胞による放射線抵抗性誘導はβ1-integrin 中和抗体、β1-integrin siRNA および FAK siRNA により抑制された。すなわち、膵星細胞は膵癌細胞の放射線治療抵抗性を誘導することと、その分子機序としてβ1-integrin-FAK シグナル系の関与が示唆された。本知見は、放射線感受性の減弱は、膵星細胞が膵癌に対する放射線治療の効果低下をおこし、治療抵抗性につながる可能性を内外に先駆けて初めて明らかにしたもので、臨床上も大きな意義を持つと考えられる。

#### 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 19 件)

1. Mantoni TS, Lunardi S, Al-Assar O, Masamune A, Brunner TB. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through β1-integrin signaling. *Cancer Res.* 2011, in press (査読有)
2. Ito H, Satoh K, Hamada S, Hirota M, Kanno A, Ishida K, Unno J, Masamune A, Katayose Y, Unno M, Shimosegawa T. The evaluation of MSX2 mRNA expression level in biliary brush cytological specimens. *Anticancer Res.* 2011;31:1011-1017. (査読有)
3. 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, in press (査読有)
4. Masamune A, Ariga H, Kume K, Kakuta Y, Satoh K, Satoh A, Shimosegawa T. Genetic background is different between sentinel and recurrent acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011, in press (査読有)
5. 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;102:150-156. (査読有)
6. 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;102:157-161. (査読有)
7. Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, Satoh K, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;403:380-384. (査読有)
8. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh K, Kanno A, Shimosegawa T. Nuclear expression of interleukin-33 in pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299:G821-832. (査読有)
9. Masamune A, Kume K, Kikuta K, Watanabe T, Hirota M, Satoh K, Kanno A, Suzuki N, Kakuta Y, Shimosegawa T. -651C/T promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with severity of acute pancreatitis in Japan. *J Gastroenterol.* 2010;45:225-233. (査読有)
10. Masamune A, Satoh A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh M, Suzuki N, Satoh K, Shimosegawa T. Effects of ethanol and its metabolites on human pancreatic stellate cells. *Dig Dis Sci.* 2010;55:204-211. (査読有)
11. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Shimosegawa T. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7:S48-54. (査読有)
12. Watanabe T, Masamune A, Kikuta K, Hirota M, Kume K, Satoh K, Shimosegawa T. Bone marrow contributes to the population of pancreatic stellate cells in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297:G1138-1146. (査読有)
13. Unno J, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Hamada S, Ito H, Masamune A, Tsukamoto N, Motoi F, Egawa S, Unno M, Horii A, Shimosegawa T. LIV-1 enhances the aggressive phenotype through the induction of epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2009;35:813-821. (査読有)
14. Masamune A, Shimosegawa T. Signal

- transduction in pancreatic stellate cells. *J Gastroenterol.* 2009;44:249-260. (査読有)
15. Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Hamada S, Shimosegawa T. Fibrinogen induces cytokine and collagen production in pancreatic stellate cells. *Gut* 2009;58:550-559. (査読有)
  16. Kume K, Masamune A, Takagi Y, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Satoh A, Hirota M, Hamada S, Shimosegawa T. A loss-of-function p.G191R variant in the anionic trypsinogen (PRSS2) gene in Japanese patients with pancreatic disorders. *Gut* 2009;58:820-824. (査読有)
  17. Suzuki N, Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Shimosegawa T. Ellagic acid inhibits pancreatic fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. *Dig Dis Sci.* 2009;54:802-810. (査読有)
  18. Manton TS, Schendel RR, Rödel F, Niedobitek G, Al-Assar O, Masamune A, Brunner TB. Stromal SPARC expression and patient survival after chemoradiation for non-resectable pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2008;7:1806-1815. (査読有)
  19. Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Shimosegawa T. Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295:G709-717. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Shimosegawa T. Hedgehog signaling pathway mediates activation of pancreatic stellate cells. United European Gastroenterology Week. 26 October 2010, Barcelona, Spain.
2. 菊田和宏、正宗 淳、渡辺 崇、下瀬川徹. Advanced glycation end-products は膵星細胞の増殖を促進する. 第 40 回日本消化器病学会総会. 2009 年 7 月 31 日. 東京.
3. Masamune A, Shimosegawa T. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic fibrosis and inflammation. AGA-JSGE Joint Meeting. 7 May 2009, Sapporo.

4. 菊田和宏、正宗 淳、下瀬川徹. Advanced glycation end-products は膵星細胞の増殖と MCP-1 産生を誘導する. 第 95 回日本消化器病学会総会. 2009 年 5 月 7 日. 札幌.
5. 正宗 淳. 膵線維化の分子機序-最新の知見-. 第 4 回新都心消化器カンファレンス. 2009 年 4 月 7 日. 東京.
6. 正宗 淳. 膵星細胞からみた膵線維化の分子機序. DDW-Japan 2008. 2008 年 10 月 1 日. 東京.
7. 正宗 淳、菊田和宏、渡辺 崇、佐藤賢二、下瀬川徹. フィブリノゲンはヒト膵星細胞におけるサイトカインとコラーゲン産生を誘導する. DDW-Japan 2008. 2008 年 10 月 1 日. 東京.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

正宗 淳 (MASAMUNE ATSUSHI)  
 東北大学・病院・助教  
 研究者番号：90312579

##### (2) 研究分担者

佐藤 賢一 (SATO KENNICHI)  
 東北大学・病院・講師  
 研究者番号：10282055

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：