

機関番号：17102
研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20591629
研究課題名 (和文) 膵癌治療抵抗性関連 microRNA の同定とその制御による治療感受性増強
研究課題名 (英文) Identification of microRNA which is related to chemoresistance of pancreatic cancer, and intensification of the sensitivity by controlling the microRNA.
研究代表者
当間 宏樹 (TOMA HIROKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：80437780

研究成果の概要 (和文)：

2 種の Gemcitabine 耐性膵癌細胞株を樹立し網羅的発現解析を行い、標的となりうる 24 の miRNA を選別した。miR142-5p, miR204 が治療抵抗性に関与しており、miR17-5p, miR200c, miR203 が予後と相関し、miR21 および miR155 が膵液を用いた癌の biomarker となる可能性を明らかにした。また、miR21 の抑制実験で膵癌の遊走、浸潤、増殖のすべてを抑制し、Gemcitabine 耐性を減弱する効果を認めた。

研究成果の概要 (英文)：

We established two Gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell lines, and global miRNA expression analyses was performed. 24 miRNA were candidates that were related to chemoresistance of pancreatic cancer. MiR142-5p and miR204 show most highest expression in two Gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell lines. MiR17-5p, miR200c and miR203 were poor prognosis factors. MiR21 and miR155 in pancreatic juice have the potential of becoming new biomarkers for diagnosing pancreatic cancer. MiR21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓外科学、膵癌、microRNA、治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

他の消化器癌などでの飛躍的な治療法の改善とは対照的に、膵癌はここ30年以上ほとんど生存率の改善が見られない取り残された癌腫である。その主要な原因の一つとして抗がん剤や放射線に対する治療抵抗性が挙げられる。難治癌である膵癌の治療成績向上のためには、早期診断法の確立と、治療効果予測に基づく的確な個別化治

療が重要である。近年、癌の進展に関与する miRNA が急速に同定されており、マイクロアレイにより膵癌の網羅的 miRNA 解析が可能となり注目されている。

2. 研究の目的

膵癌治療抵抗性に関わる miRNA の同定と治療への応用および予後予測、診断補助因子となりうるかを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

1) 治療抵抗性膵癌細胞株の樹立とその miRNA の網羅的発現解析

Gemcitabine 耐性株の miRNA を対象とした Bioarray(Ambion 社)を用いて網羅的発現解析を行う。

2) ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルにおける miRNA 定量解析

治療効果が判明している膵癌切除組織パラフィン包埋 (FFPE) サンプルから RNA を抽出し、リアルタイム PCR によって上記 array による網羅的解析により絞り込まれた miRNA の定量解析を行う。

3) マイクロダイセクションサンプルにおける癌関連 miRNA 定量解析

マイクロダイセクションで標的細胞のみ収集して治療抵抗性に関与する miRNA 定量解析を行う。

4) miRNA 解析による治療効果や予後予測、治療感受性制御治療標的としての可能性

miRNA を対象に、その inhibitor や precursor を用いて抑制実験や発現増強実験を行い、その機能や抗癌剤や放射線治療に対する併用効果を検討する。また術前診断に有用な膵液中 miRNA の検索を行う。

4. 研究成果

1) 治療抵抗性膵癌細胞株の樹立とその miRNA の網羅的発現解析

Gemcitabine の濃度が 100nM から連続培養をつづけ、600nM にも耐える耐性株を 2 種樹立した。耐性株の miRNA を対象とした Bioarray(Ambion 社)を用いて網羅的発現解析を行い、24 の miRNA が耐性に関与していることが分かった。miRNA142-5p および miRNA204 が Gemcitabine 耐性にもっとも関与していることを突き止めた。(Ohuchida et al, Ann Surg Oncol, 2011)

2) ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルおよびマイクロダイセクションサンプルにおける癌関連 miRNA 定量解析

治療効果が判明している膵癌切除組織パラフィン包埋 (FFPE) サンプルとマイクロダイセクションサンプル得られた RNA をリアルタイム PCR によって上記 array による網羅的解析により絞り込まれた 24 の miRNA の定量解析を行った。その結果、Gemcitabine を投与した群では miRNA142-5p および miRNA204 の発現が高いと生命予後の延長がみられた。(下記 Table 参照、Ohuchida et al, Ann Surg Oncol, 2011) Gemcitabine を投与していない群では差はみられなかった。あるいはその他の臨床病理学的因子に対して有

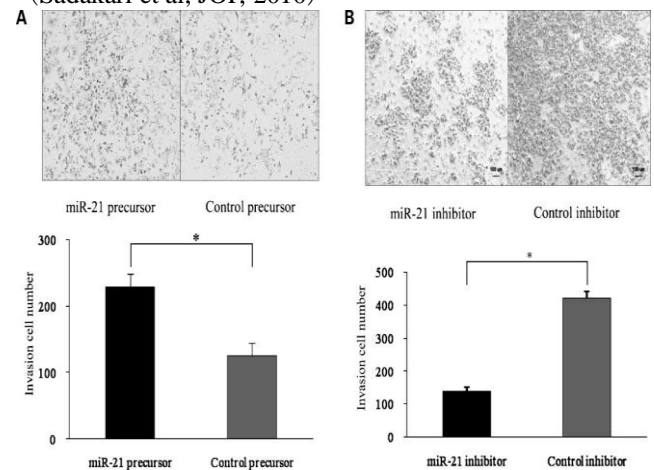
意に影響を与える miRNA17-5p (Ohuchida et al, Ann Surg Oncol, 2011) および miRNA200c (Yu et al, Mol Cancer, 2010) を同定した。また治療切除群で miRNA203 高発現群は予後が悪いことが分かった。(Ikenaga et al, Ann Surg Oncol, 2010)

TABLE 2 Correlation between median overall survival and microRNA expression in patients with resected pancreatic cancer

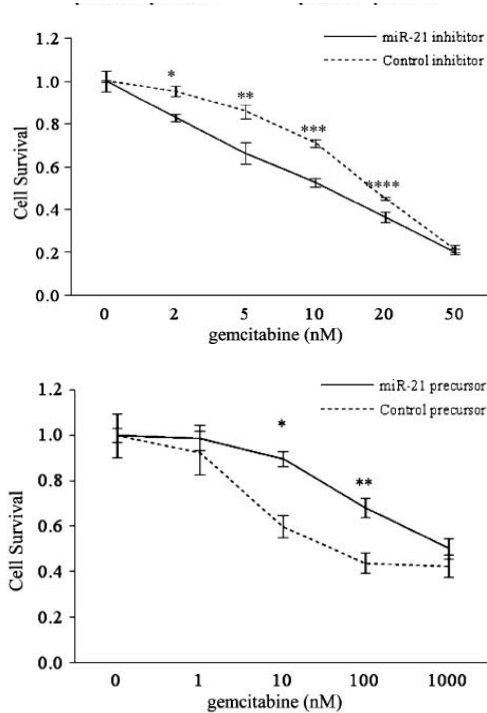
Factor	Overall survival (95% CI)		P value
	High	Low	
miR-142-5p			
Gem group	45 (23-)	16.3 (12-23)	0.0077
Non-Gem group	13.07 (4.7-43)	11 (7.7-14.7)	0.4880
miR-204			
Gem group	33 (13.27-)	16.3 (12-23)	0.0054
Non-Gem group	13.07 (8.47-26)	9 (4-14.7)	0.1527

3) miRNA 解析による治療効果や予後予測、治療感受性制御治療標的としての可能性

膵癌細胞株に miRNA21 の precursor を導入すると、膵癌細胞の遊走能、浸潤能、増殖能がすべて上昇し、また FFPE サンプルでも miRNA21 高発現群は予後が悪いことがわかった。(下記 Fig.A,B,C 参照 Moriyama et al, Mol Cancer Ther, 2009) 逆に膵癌細胞株の miRNA21 を抑制すると遊走能、浸潤能、増殖能をすべて抑制し、また、Gemcitabine 耐性を減弱させる効果があった。膵液と FFPE サンプルにおいてともに miRNA21 ないし miRNA155 が高発現している群では予後が悪く、膵液中の miRNA21 と miRNA155 は予後予測に有用であることが示された。(Sadakari et al, JOP, 2010)



C



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 6 件)

1. Ohuchida K et al., MicroRNA Expression as a Predictive Marker for Gemcitabine Response after Surgical Resection of Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol.*, 118, 405-411, 2011
2. Sadakari Y. et al., MicroRNA expression analyses in preoperative pancreatic juice samples of pancreatic ductal adenocarcinoma. *JOP*, 11(6), 587-92, 2010
3. Yu J. et al., MicroRNA miR-17-5p is overexpressed in pancreatic cancer, associated with a poor prognosis, and involved in cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Biol Ther.*, 10(8), 748-57, 2010
4. Ikenaga N. et al., MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 17(12), 3120-8, 2010
5. Yu J. et al., MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation *Mol Cancer.* 28; 9 169, 2010
6. Moriyama T. et al., MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol Cancer Ther.* 8(5) 1067-74, 2009

[学会発表] (計 3 件)

1. Ikenaga N, MicroRNA-203 Expression as a New Prognostic Marker of Pancreatic Cancer, Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010, Japan
2. Moriyama T, MicroRNA-21 Modulates Biologic Functions of Pancreatic Cancer Cells Including Their Proliferation, Invasion and Chemoresistance, International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010, Japan
3. Yu J, MicroRNA-200c is a novel independent prognostic marker for pancreatic cancer. 40th Anniversary Meeting of the American Pancreatic Association and Japan Pancreas Association 2009, United States of America

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

当間 宏樹 (TOMA HIROKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80437780

(2) 研究分担者

水元 一博 (MIZUMOTO KAZUHIRO)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：90253418

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)

九州大学・医学研究院・客員助教

(3) 連携研究者

なし