

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16407

研究課題名(和文) RRN3を標的とした肝胆膵癌の革新的治療開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Research on the innovative therapy for hepatobiliary and pancreatic cancers targeting RRN3

研究代表者

石井 範洋 (Ishii, Norihiro)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00711508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：M2BPGiの癌促進効果の解析から同定されたRRN3蛋白の膵癌における悪性化の意義について研究を行った。In vitroにおける解析では膵癌細胞株のRRN3蛋白の発現を特異的siRNAで抑制すると増殖能、浸潤能が抑制され、抗癌剤感受性が亢進することが明らかとなった。膵癌切除症例の臨床検体を用いた解析でも、RRN3高発現症例は予後不良であり、Ki-67発現と相関関係を認め悪性度の関連が示唆された。NOD-SCIDマウスを用いたIn vivo皮下腫瘍モデルにおいてもRRN3抑制により腫瘍の増大が抑制された。RRN3が膵癌の悪性度に関与することが占められ、治療標的として有望である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝胆膵癌は難治性固形癌の代表であり、治療成績はまだ十分とは言えない。癌の悪性度に関わる分子の解析が進むことで、治療成績の向上に結び付く可能性がある。RRN3蛋白が膵癌の悪性度(増殖能や浸潤能、抗癌剤抵抗性)に関与することが示されたため、RRN3を軸とした治療戦略は、膵癌の治療抵抗性を克服する新たな治療法の一つとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is an extremely poor prognosis. The RNA-polymerase I mediated transcription is essential initial step for ribosome biogenesis and are related with cancer cell malignancy. RRN3 is RNA polymerase I specific transcription initiation factor. We found that high level of RRN3 expression was associated with Ki-67 expression and shorter overall survival compared with RRN3 low expression. In addition, proliferation and invasion ability were decreased when RRN3 was silenced with siRNA compared to control siRNA transfected cells. Chemosensitivity analysis showed that inhibition of RRN3 enhanced sensitivity of anticancer drug. Furthermore, RRN3 siRNA-transfected PANC-1 tumors showed significantly reduced tumor volumes compared to the control tumors in a mouse xenograft model. High RRN3 expression associated with poor prognosis and cancer malignancy in pancreatic cancer. RRN3 targeting may be a promising therapeutic strategy to overcome refractory pancreatic cancer.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：肝胆膵 膵癌 治療抵抗性 悪性 RRN3 抗癌剤感受性 リボソーム 転写

1. 研究開始当初の背景

肝胆膵領域癌は予後不良で、手術や抗癌剤、放射線治療を組み合わせた集学的治療が行われているが、その治療成績は未だ十分ではない。予後改善のためには、悪性化機序の解明やそれらを標的とした新たな治療戦略が求められている。我々は癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast: CAF) の研究から肝細胞癌と膵癌の CAF が M2BPGi を産生していることを見出した。M2BPGi は肝線維化マーカーとして同定され、我々が肝星細胞で産生されていることを報告して以来 (Bekki Y, Shirabe K, et al. J Gastroenterol Hepatol. 2017; 32: 1387-93)、着目している糖蛋白である。M2BPGi 高値の肝細胞癌患者・膵癌患者の予後が不良であることが報告され、我々の先行研究でも M2BPGi 投与にて膵癌細胞株の浸潤能と増殖能の亢進がみられた。M2BPGi 投与を行った肝癌・膵癌細胞株の mRNA を網羅的に解析したところ、RRN3 の上昇が認められた。RRN3 は RNA polymerase I と結合し、ribosome RNA (rRNA) の転写を促進する因子として知られ、リボソームの生成からタンパク合成を促進させることが報告されている (Rui Jin, et al. Biochim Biophys Acta. 2016; 1866: 189-96.)。癌細胞においては rRNA の転写の亢進が報告されており (Grandori C, et al. Nat Cell Biol. 2005; 7: 311-8.) その機序に RRN3 が関与し、RRN3 が肝胆膵癌の悪性化や増殖進展を促進する可能性があり RRN3 を標的とした治療戦略は予後不良の肝胆膵癌の有望な治療となる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

CAF より産生される M2BPGi の癌促進効果の解析から新たに同定された RRN3 の肝胆膵癌の悪性化における意義について解明し、RRN3 を軸とした新たな治療戦略を構築することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

臨床検体を用いて RRN3 の肝胆膵癌における臨床病理学的意義を明らかにし、さらに *In vitro* において RRN3 の変化による肝胆膵癌細胞株の悪性度に与える影響を明らかにし、その分子機序を解明する。分子機序の解析から治療標的としての可能性を見出し、マウス皮下腫瘍モデルを用いて検証を行う。

1. 肝胆膵癌細胞における RRN3 の機能解析 (*In vitro*)

RRN3 の蛋白発現を siRNA を用いて Knock down し、肝胆膵癌細胞株の悪性度 (増殖や浸潤など) に与える影響について検証する。また RRN3 の蛋白発現を変化させたときに動く Signal 経路を RNA sequence を用いて網羅的に解析し、治療標的の探索を行う。

2. ヒト肝胆膵癌切除標本における RRN3 発現の臨床病理学的意義

臨床検体を用いて RRN3 蛋白の免疫染色を行い、局在や発現の有無を検討する。癌部における RRN3 発現の有無と臨床病理学的因子、予後について比較検討を行う。

3. マウス皮下腫瘍モデルにおける検証

肝胆膵癌細胞株を NOD-SCID マウスの皮下に摂取し、皮下腫瘍モデルを作成する。皮下腫瘍に対して Electroporation 法にて RRN3 の siRNA を導入し、RRN3 発現の抑制で腫瘍の増大に差があるかを検証する。

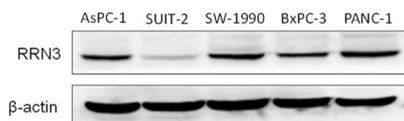
4. 研究成果

今回の研究期間は主に膵癌に対する研究を行った。

1. 膵癌細胞における RRN3 の機能解析 (*In vitro*)

膵癌細胞株 5 種にて RRN3 発現の有無を Western blot 法で評価した (図 1)。

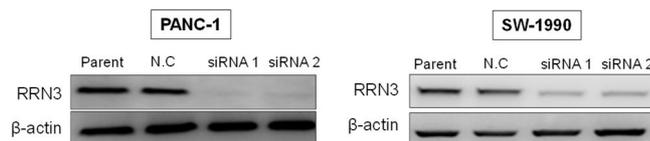
図 1



SUIT-2 の発現は弱いものの、その他 AsPC-1、SW-1990、BxPC-3、PANC-1 細胞株は RRN3 蛋白の発現を認め、以降の実験には PANC-1 および SW-1990 細胞株を用いて行った。

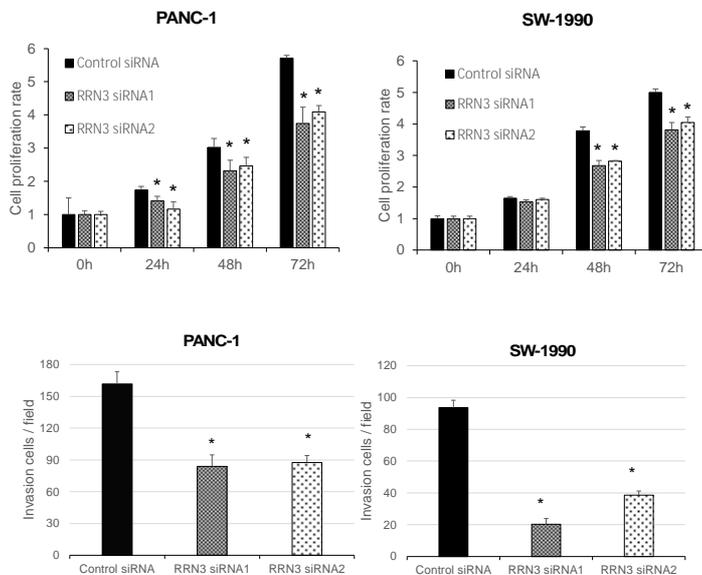
RRN3-特異的 siRNA を用いて PANC-1 および SW-1990 の RRN3 発現を抑制した (図 2)

図 2



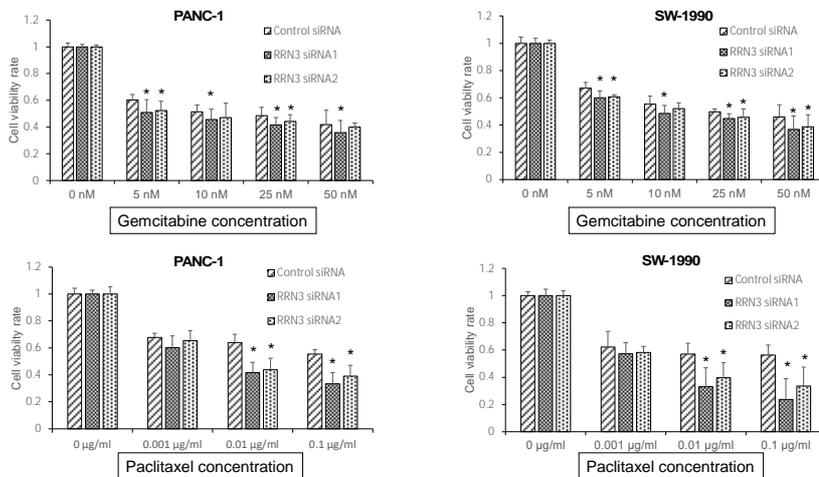
- RRN-3 発現を抑制した細胞株で増殖能および浸潤能の変化を評価した (図 3)
- RRN3 抑制細胞株では増殖能と浸潤能の抑制を認めた。

図 3



- RRN3 抑制細胞株で抗癌剤感受性の変化を評価 (図 4)
- RRN3 抑制により抗癌剤 (Gemcitabine および Paclitaxel) の感受性が亢進した。

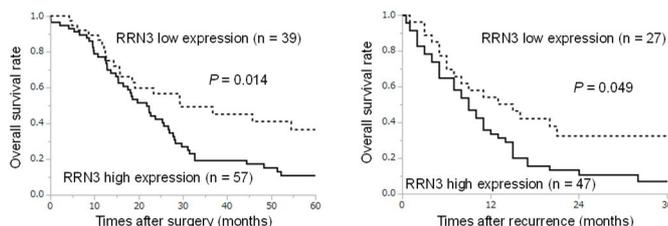
図 4



In vitro の結果からは RRN3 が膵癌の悪性度に関与しており、RRN3 の抑制が治療標的となり得る可能性が示された。

2. ヒト膵癌切除標本における RRN3 発現の臨床病理学的意義

膵癌切除検体において免疫染色を用いて RRN3 発現の臨床病理学的意義について評価した。RRN3 は核に発現しており、非腫瘍部と比較して癌部で高発現している傾向であった。癌部における核の RRN3 発現を評価し、高発現群と低発現群で予後や臨床病理学因子の検討を行った。



RRN3 高発現群は有意に予後不良であり、再発後の生存期間も不良で化学療法抵抗性の可能性が示唆された。

臨床病理学的因子との関係では Ki-67 発現と有意に相関しており、RRN3 高発現群で Ki-67 発現が高度であり、増殖能との関

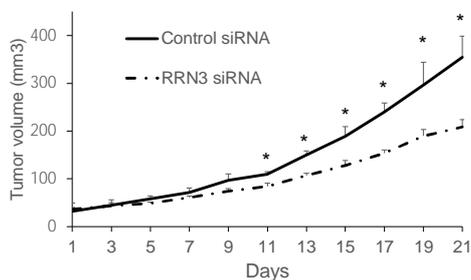
連が示唆された。単変量・多変量解析では RRN3 高発現は独立した予後不良因子として抽出された。

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95%CI	<i>p</i> -value	HR	95%CI	<i>p</i> -value
Age (<70 vs. ≥70)	1.12	0.59-2.14	0.731	-	-	-
Sex (Male vs. Female)	0.96	0.56-1.62	0.901	-	-	-
Histological type (Well vs. Moderately, Poorly)	2.27	0.92-7.54	0.076			
T factor (UICC) (T1, 2 vs. T3, 4)	1.71	0.62-7.10	0.335			
Lymph nodemetastasis (Absent vs. Present)	1.2	0.66-2.29	0.57	-	-	-
Venous invasion (v0,1 vs. v2,3)	1.63	0.98-2.76	0.059	-	-	-
Lymphatic invasion (ly0,1 vs. ly2,3)	1.42	0.84-2.37	0.191	-	-	-
Perineural invasion (ne0,1 vs. ne2,3)	1.99	1.13-3.73	0.017*	2.03	1.14-3.81	0.014*
RRN3 (Low vs. High)	1.67	1.02-2.82	0.041*	1.71	1.01-3.03	0.048*

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; UICC, Union for International Cancer Center
* *p* < 0.05

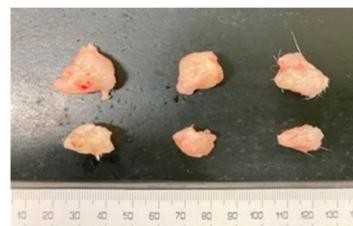
3. マウス皮下腫瘍モデルにおける検証 (In vivo)

NOD-SCID マウスに PANC-1 を用いて皮下腫瘍を作成した。その後 Electroporation 法を用いて RRN3 特異的 siRNA を皮下腫瘍に導入し、腫瘍径の変化を評価した。RRN3 抑制群では腫瘍径の増殖抑制が認められた。



Control siRNA

RRN3 siRNA



これらの結果から RRN3 発現は膵癌の悪性度に関与し、治療標的として有望である可能性が示された。今後は RRN3 の蛋白発現を変化させたときに動く Signal 経路を RNA sequence を用いて網羅的に解析し、RRN3 を軸とした治療標的の探索を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Chingunjav Batbayar
2. 発表標題 RRN3 expression is associated with poor prognosis and cancer progression in pancreatic cancer.
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会
4. 発表年 2021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
---------	---------