

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17034

研究課題名(和文)長期生存膵癌における特異的microRNAと標的分子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of specific microRNA in long-term surviving pancreatic cancer

研究代表者

森町 将司(MORIMACHI, MASASHI)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：70838010

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):術後5年以上生存した膵癌症例と術後1年未満に死亡した膵癌症例のmicroRNAの発現を網羅的に比較することで、長期生存例において有意に発現が低下しているmicroRNAを複数発見した。膵癌細胞株を用いたcell proliferation assayを施行することで、それらmicroRNAが膵癌細胞の増殖に関連することを明らかにした。さらに、これらmicroRNAに関連する蛋白を各種データベース、文献をあたりいくつ候補に挙げ、免疫染色を行うことでDDX5という蛋白が低発現の膵癌は極めて予後が悪いことが分かり報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は極めて予後不良な悪性疾患の1つであり、生存期間中央値はわずか14.7ヶ月である。膵癌の予後を改善させるためには早期発見が重要であるが、早期膵癌に特徴的な身体症状や血液検査所見は乏しく、早期診断は極めて困難である。microRNAはリキットバイオプシーの開発項目の1つであり、悪性腫瘍を始めとする各種疾患の早期診断や治療標的として近年注目されている。本研究はこれまで報告されていなかったmicroRNAと蛋白の膵癌予後との関連を明らかにした。本研究成果は膵癌の新しい治療ストラテジーの開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文):By comprehensively comparing the expression of microRNAs in pancreatic cancer patients who survived more than 5 years after surgery and those who died less than 1 year after surgery, we found several microRNAs whose expression was significantly downregulated in long-term survivors.

Next, we performed a cell proliferation assay using a pancreatic cancer cell line and found that these microRNAs are associated with the proliferation of pancreatic cancer cells.

Furthermore, we selected proteins associated with these microRNAs from various databases and literature, and performed immunostaining. The results showed that pancreatic cancers with low expression of DDX5 had a very poor prognosis.

研究分野：消化器癌

キーワード：膵癌 microRNA バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国における膵癌による死亡数は2013年に初めて3万人を超え、なお年々増加傾向にある。膵癌は極めて予後不良で、切除症例、非切除症例を合わせた生存期間中央値はわずか14.7ヶ月である(日本膵臓学会 癌登録集計 2012)。しかし、1割ほど膵癌と診断されながらも5年以上生存する例がある(全がん協加盟施設の生存率共同調査 2016)。膵癌の長期予後には早期発見が必須であるが、早期膵癌に特徴的な身体症状や血液検査所見はなく早期診断が困難である。そこで我々は、細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、代謝といった広範な生物学的プロセスに重要な役割を担うことが報告されている microRNA(miRNA)に注目した。miRNA は近年、癌の発現や増殖のプロセスにも関与することが報告されており新たなバイオマーカーとして期待されているが、膵癌においては特異的な早期診断や治療に有用な miRNA の発見に至っていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は長期生存膵癌に特異的な miRNA の発現と機能を明らかにすることである。また、発見した miRNA が膵癌の悪性化にどのように関与するかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

東海大学医学部付属病院で切除された膵癌検体を評価し、パラフィン包埋切片(FFPE)より laser capture microdissection にて膵癌細胞を選択的に回収し miRNA を抽出する。診断から5年以上生存した症例(長期生存群)と、1年以内に死亡した症例(短期生存群)を数例ずつ選択し、マイクロアレイによる網羅的検索を施行する。両群の miRNA の発現パターンを比較することで膵癌の進行や予後に関連する miRNA を絞り込む。

絞り込んだ miRNA が膵癌の悪性化にどのように関与するか、膵癌細胞株を用いた *in vitro* 実験(cell proliferation assay、invasion assay、migration assay)を行うことで、候補の miRNA が膵癌細胞の悪性化(増殖、浸潤、遊走)にどのように関わるかを明らかにする。

これまでに明らかにすることのできた長期生存膵癌に特異的な miRNA の標的となりそうな分子を miR Search、human protein atlas、target scan などの web site や諸文献で検索する。miRNA mimic、miRNA inhibitor を導入した膵癌細胞を用い western blotting、RT-PCR を行うことで候補の分子が miRNA の標的となっているか確認する。さらに、候補の分子を用いて、膵癌切除検体の免疫染色を行うことで、候補に挙がった分子が実際に長期予後やリンパ節転移などの悪性化因子とどのように関連するか明らかにする。

4. 研究成果

2001年1月から2013年12月の間に東海大学医学部付属病院で行われた膵癌切除症例の検討を行ったところ、予後追跡できなかったもの、病理組織診断にて膵管腺癌と判定できなかったものを除くと全てで230例であった。当院の治療成績は一般的な治療成績と同等であった。長期生存群、短期生存群より stage B(UICC 8th)で、腫瘍径、リンパ節転移数が近い症例を5例ずつ

ピックアップし、miRNA を抽出し網羅的解析を行った(図 1)。その結果、長期生存例において有意に発現が低下している miRNA が 2 つ見つかった(研究途中のためここでは miR-X, miR-Y とする)。miR-Y についてはいくつかの癌種で予後や腫瘍の進展と関連することが報告されていた。そこで私達は miR-X に注目し、miR-X mimic/inhibitor を膵癌細胞株に Transfection し、48 時間、72 時間、96 時間後の膵癌細胞数を測定した(図 2)。その結果、miR-X mimic を Transfection した群は有意に癌細胞数が増殖していた。

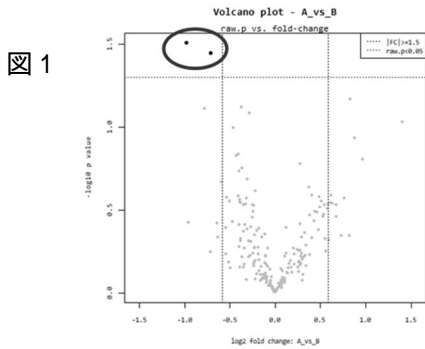


図 1

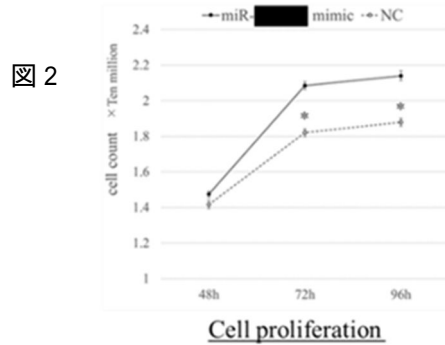


図 2

次に、miR-X の標的となる候補の分子をいくつか選択し、miR-X mimic を Transfection した膵癌細胞株を用いて PCR、Western Blotting することで変化量を測定した。その結果、miR-X が DDX5 というタンパクの発現を有意に抑制していることが示された(図 3)。

DDX5 と膵癌の関連を明らかにするために、膵管腺癌切除 230 症例に対して DDX5 の免疫染色を行ったところ、その強度、分布は多様であった。全癌細胞のうち 50%以上染色されたものを高発現群、それ未満を低発現群としたところ、148 例が高発現群で 82 例が低発現群であった。これらに対して臨床病理学的因子を比較検討した結果、DDX5 低発現群では有意に腫瘍径、遠隔転移、TNM stage が進行していた。また、DDX5 低発現群は有意に全生存期間が短かった(図 4)。

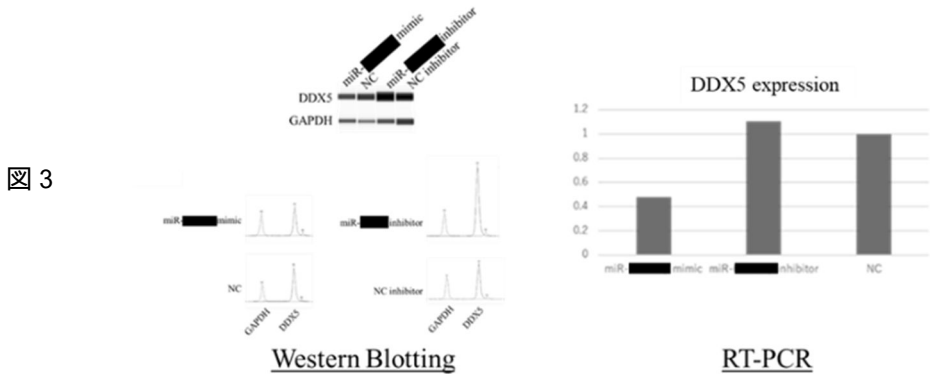


図 3

図 4

臨床病理学的因子	単変量解析			多変量解析		
	HR	95% CI	P値	HR	95% CI	P値
傍神経侵襲(あり vs. なし)	5.015	1.243 to 20.233	0.023*	n.e.		
リンパ管侵襲(あり vs. なし)	5.465	1.744 to 17.131	0.004*	n.e.		
静脈侵襲(あり vs. なし)	3.488	1.629 to 7.468	0.001*	n.e.		
pT: 腫瘍径 (> 20 mm vs. ≤ 20 mm)	3.508	1.895 to 6.492	<0.001*	2.520	1.317 to 4.821	0.005*
pN: リンパ節転移(あり vs. なし)	1.841	1.316 to 2.573	<0.001*	n.e.		
pM: 遠隔転移(あり vs. なし)	4.232	2.040 to 8.783	<0.001*	3.526	1.693 to 7.341	0.001*
pTNM stage (IIB, III, IV vs. I, IIA)	2.183	1.512 to 3.151	<0.001*	1.561	1.057 to 2.307	0.025*
組織学的悪性度 (G3 vs. G1, 2)	1.430	0.840 to 2.435	0.188	-		
DDX5 発現 (low vs. high)	0.587	0.418 to 0.825	0.002*	0.679	0.482 to 0.958	0.028*

DDX5 の発現は様々な腫瘍で報告されているが、膵癌と DDX5 の関連について研究し報告したのは我々が初である (M. Morimachi, et al. Low expression of DDX5 is associated with poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, Journal of clinical pathology, 2020)。DDX5 には様々な機能が報告されており、p53 のコアクチベーターというだけでなく、miRNA に制御される一方で Drosha 複合体を介することで様々な miRNA の発現に関与しているという報告がなされている。

今回の研究で、我々は長期生存膵癌で有意に発現の低い miRNA の発見と、そのうちの 1 つである miR-X が DDX5 の発現を抑制することで膵癌の進展に寄与している可能性があることを示した。しかし、実際にどのように制御し、どのような役割をしているのかを明らかにすることは今後の課題である。

本研究のように、今までにない切り口で膵癌の予後に関連する特異的な miRNA やその標的分子を解明することは、膵癌の早期診断や新規治療方法の開拓に貢献できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

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

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 2020 Oct 23
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 2020-207002
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Morimachi Masashi
2. 発表標題 Clinicopathological significance of DDX5 immunostaining of pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 2021 the Japanese Society of Medical Oncology Annual Meeting JSM02021 Virtual Congress (国際学会)
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
---------	---------