

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790626

研究課題名（和文） 膵癌幹細胞抑制性 microRNA の同定と治療応用

研究課題名（英文） Identification and clinical application of cancer stem cell inhibitory microRNA

研究代表者

濱田 晋 (Hamada Shin)

東北大学・病院・医員

研究者番号：20451560

研究成果の概要（和文）：

本研究においては膵癌幹細胞を抑制する microRNA を同定し、治療へ応用するための基礎検討を行った。高い浸潤能を有する癌幹細胞を多く含む浸潤性膵癌と IPMN の microRNA 発現プロファイルを比較し、浸潤癌で特異的に抑制されている microRNA、miR-126 を同定した。正常膵では miR-126 の発現が保たれていたが膵癌ではその発現が消失しており、miR-126 の標的遺伝子である ADAM9 の発現は膵癌でのみ上昇していた。癌幹細胞機能の一つである浸潤能は miR-126/ADAM9 により制御されており、膵癌幹細胞特異的な治療標的となり得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Current study focused on cancer stem cell inhibitory microRNA. The microRNA expression profiles in invasive ductal adenocarcinoma (IDA) and IPMN were assessed by microarray and miR-126 was identified as a down-regulated microRNA in IDA. Normal pancreas tissue retained miR-126 expression while its expression was lost in IDA. ADAM9, a putative target of miR-126 was highly expressed in IDA, suggesting mutually exclusive pattern. The miR-126/ADAM9 axis could be a novel therapeutic target against pancreatic cancer stem cell.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

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：miR-126、ADAM9、EMT

1. 研究開始当初の背景

膵癌は診断および治療技術の進歩にもかかわらず、いまだに予後不良な消化器癌である。多くの症例では診断時点で周囲臓器・大血管への浸潤や遠隔転移のために根治切除不能であり、ゲムシタビンをはじめとした化

学療法剤の効果も palliative に留まる。根治切除が可能であった症例においても術後の再発率は高く、新規治療の開発が課題となっている。膵癌の浸潤・転移や術後再発、化学療法剤への抵抗性の獲得機序には腫瘍内のごく一部分を占める少数の細胞集団、いわ

ゆる癌幹細胞が重要な役割を果たすことが注目されている。癌幹細胞は高い腫瘍形成能を有し、化学療法剤への耐性や細胞遊走・浸潤能が高いことが報告されている。CD133 や CD24/CD44/ESA などの表面マーカーを用いた膵癌幹細胞分画の分離が行われており、その性質についての検討が進められているものの、癌幹細胞機能の完全な解明には至っていないのが現状である。

癌幹細胞としての形質は従来の化学療法剤を用いた治療によって増強されることが報告されており、増殖の盛んな細胞を標的とする戦略では癌幹細胞を排除できない。幹細胞性を喪失させることで癌幹細胞を枯渇させることが試みられているが、これまで知られているシグナル伝達経路の阻害などでは効果は限定的である。近年、蛋白質をコードしない non-coding RNA が生体内において大量に存在しており、種々の細胞機能をダイナミックに制御していることが判明している。その機能は多岐にわたり、発生段階での組織構築の制御や低酸素状態などの環境への適応への寄与が報告されている。中でも microRNA と呼ばれる 21-23bp からなる小 RNA 分子については詳細な解析が進められており、マイクロアレイ技術を用いた網羅的な解析が可能となっている。microRNA は多数の標的遺伝子を有し、細胞機能を網羅的に制御できる可能性が示唆されており、サイトカインやシグナル伝達経路に代わる新しい治療標的として有望である。膵癌においても薬剤耐性や患者の予後と関連する microRNA が報告されており、診断・治療への応用が期待されているところである。

MicroRNA 発現プロファイルと薬剤への耐性や患者の予後が関連するという報告は、microRNA が薬剤耐性や浸潤・転移能といった膵癌癌幹細胞の機能の維持に関与している可能性を示唆するものと考えられる。これらの知見に基づき、浸潤性増殖を呈して癌幹細胞成分を多く含むと予想される浸潤性膵癌と、上皮内に長期間留まる IPMN とで microRNA 発現プロファイルを比較することは膵癌幹細胞機能のひとつである細胞遊走・浸潤能の制御に関わる microRNA の同定につながると考えられる。浸潤性膵癌特異的に発現変動がみられる microRNA は膵癌幹細胞機能の制御に関与している可能性があり、膵癌幹細胞機能を抑制し得る治療標的となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では浸潤性膵癌と IPMN の microRNA 発現プロファイルを比較することで、癌幹細胞機能の一つである遊走・浸潤能を規定する microRNA を同定し、治療へ応用するための基礎検討を行った。期間内に以下の項目について検討を行った。

(1) 浸潤性膵癌特異的に発現変動がみられる microRNA 同定のため、IPMN と発現プロファイルを比較する。

(2) 同定された microRNA の標的遺伝子の同定を行い、癌幹細胞機能との関連を検討する。

(3) 上記にて同定された microRNA、標的となる分子の発現を膵癌組織中で確認する。

3. 研究の方法

(1) 浸潤性膵癌と IPMN 組織を用いたマイクロアレイによる microRNA 発現プロファイルの比較

当院にて手術を施行された IPMA6 例、IPMC6 例、浸潤性膵癌 5 例の手術標本を OCT compound に包埋し、凍結切片を作成した。LASER-captured microdissection にて腫瘍腺管のみを抽出し、total RNA を抽出。Agilent Human microRNA microarray v2.0 (Agilent Technologies) を用いて microRNA 発現プロファイルを解析した。有意な発現変動を認める microRNA を抽出するため、各検体の raw data を robust multichip average method にて正規化し、線形モデルへの当てはめを行って比較した。得られたデータを使用したクラスター解析により発現変動レベルの順位付けを行った。

(2) 細胞培養

ヒト膵癌細胞株 ASPC1 および BxPC3 派生細胞株 (B3EV, B7, B21) は 10% FBS 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で、5% CO₂ incubator 中で 37°C にて培養した。

(3) 膵癌細胞株および膵組織中 microRNA の定量的 RT-PCR による発現解析

有意な発現変動を認めた microRNA の各種細胞株、膵正常組織及び膵癌組織での発現レベルを検討するため、TaqMan® MicroRNA Assays (Life Technologies Japan) および StepOnePlus™ real-time PCR system (Life Technologies Japan) を用いた定量的リアルタイム RT-PCR を行った。

(4) *in situ* hybridization による膵組織中での microRNA 局在の確認

正常膵組織及び膵癌組織中での microRNA 発現の局在を評価するため、パラフィン包埋切片を用いて *in situ* hybridization を行った。microRNA 検出用プローブとして DIG-labeled detection probe (EXIQON) を使い、プローブの hybridization には miRCURY LNA™ miRNA ISH Optimization Kit (FFPE) (EXIQON) を使用した。組織上に hybridize したプローブは anti-DIG-AP (Roche Applied Science) および NBT/BCIP ready-to-use tablets (Roche Applied Science) を用いて検出した。

(5) データベースによる microRNA 標的遺伝子予測と microRNA/mRNA 相互作用の確認

microRNA 標的遺伝子の予測は TargetScan website (<http://www.targetscan.org/>) にて行った。microRNA 標的遺伝子の mRNA 3' UTR

において特異的に microRNA と相互作用し得る配列について、pmirGLO vector (Promega) にサブクローニングして microRNA による翻訳抑制効果を確認した。同配列の変異導入により抑制効果が解除されるかについても検討した。

(6) microRNA 標的遺伝子の膵組織中での発現レベルの評価

microRNA 標的遺伝子の正常膵組織及び膵癌組織での発現と局在は免疫組織化学で確認した。発色は DAB とヒストファイブキット (ニチレイ) を用いて行った。

(7) 膵癌細胞株を用いた microRNA の強制発現培養細胞における microRNA の強制発現は Pre-miRNATM miRNA Precursor (Life Technologies Japan) を用いて行った。培養細胞への transfection は 200nM の濃度で Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて行った。コントロールには Pre-miRNATM miRNA Precursor Molecules Negative Control (Life Technologies Japan) を使用した。細胞遊走能・浸潤能は 8 μ m pore 24-well BD FALCONTM Cell Culture Insert および BD BioCoatTM MatrigelTM Invasion Chamber (BD Biosciences) を用いた two-chamber assay にて確認し、上皮マーカーである E-cadherin の発現変動と間葉系マーカーである N-cadherin の発現変動を Western blot にて確認した。

4. 研究成果

(1) 有意な発現変動を認めた microRNA のマイクロアレイによる同定
浸潤性膵癌および IPMA、IPMC における microRNA 発現プロファイルを比較した MA plot を図 1 に示す。

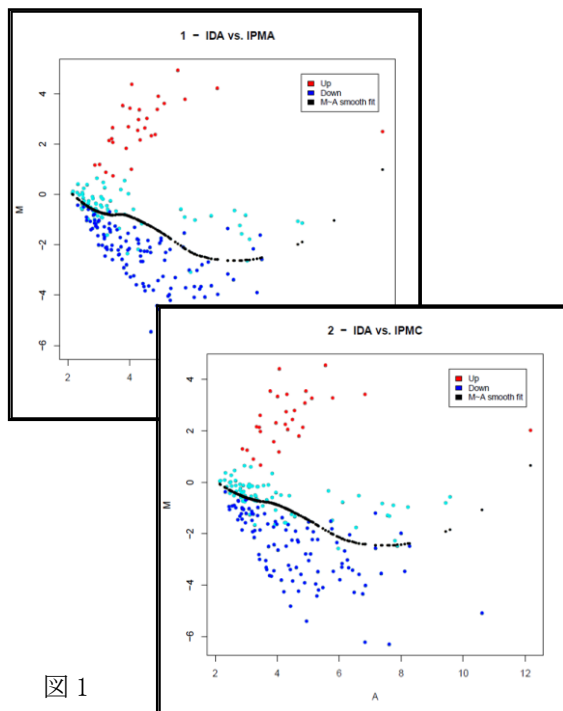


図 1

IPMA、IPMC との比較で共通して発現が低下しているものは 98 種、増加しているものは 29 種であった。発現低下 microRNA 中で腫瘍抑制効果が報告されている miR-126 につきその後の検討を行った。

(2) ヒト膵癌細胞株、正常膵組織及び膵癌組織中での miR-126 発現レベルの検討

我々はこれまで、癌幹細胞マーカーの一つである *ABCG2* の発現がホメオボックス遺伝子 *MSX2* の発現増加により誘導されることを報告してきた。(Hamada S et al. J Cell Physiol. 2011) *MSX2* 強制発現細胞株である B7、B21 ではコントロール細胞株である B3EV に対して miR-126 発現レベルが低下していた。(図 2)

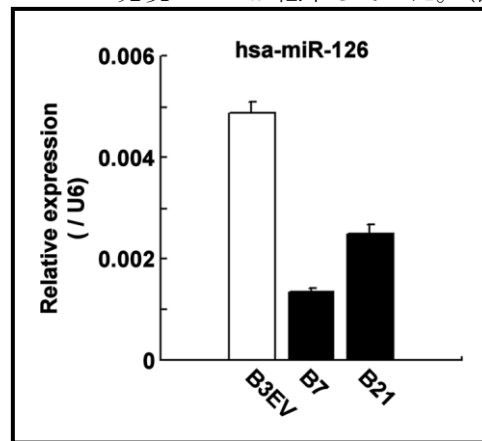


図 2

また、正常膵組織から抽出した RNA と膵癌組織から抽出した RNA を用いて miR-126 発現レベルを比較したところ、膵癌組織において有意に miR-126 発現レベルの低下を認めた。

(図 3、**, $P < 0.01$, Mann-Whitney U test)

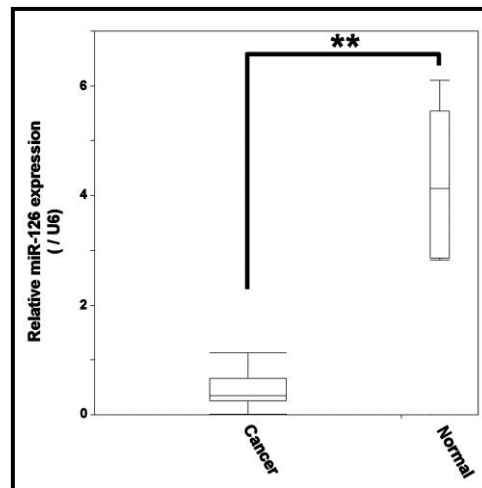


図 3

(3) 膵組織中での miR-126 局在の確認

正常膵組織及び膵癌組織中での miR-126 の局在を *in situ* hybridization にて確認した。図 4 に示すように、正常膵では導管細胞・腺房細胞に局在を認めたが、膵癌組織での発現

は確認されなかった。

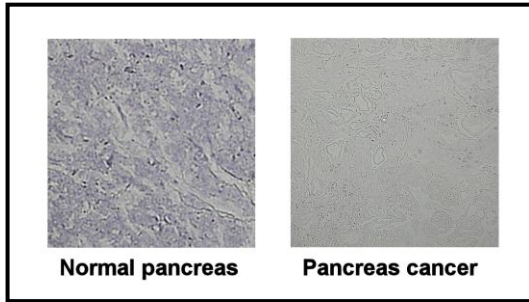


図 4

(4)miR-126 標的遺伝子の同定

TargetScan website にて miR-126 標的遺伝子の候補を検索したところ、25 種の遺伝子が候補として選出された。これらの遺伝子のうち、既報にて膵癌での高発現が報告されている ADAM metalloproteinase domain 9 (ADAM9) についてさらなる検討を行った。ADAM9 mRNA の 3' UTR に存在する seed 配列は種によって保存されていた。(図 5)

| ADAM9 3'UTR | |
|-------------|--|
| | 5' 3' |
| Human | UAAGCUUUAAGGUACGAAGUAU |
| Cow | UAAACUUUAAGGUACGAAGUAU |
| Rat | CACACUGUAUGGUACGAGGCGU |
| Mouse | CACACUCUAUGGUACGAGGUGU |

図 5

本配列をルシフェラーゼの 3' UTR に組み込んだレポーターベクター (pMG-A9) とともに miR-126 precursor をトランスフェクションすることで、ASPC1 においてレポーター活性の低下が確認された。(図 6) この効果は同配列を変異させることで消失し (pMG-A9M)、miR-126 と ADAM9 3' UTR の直接作用が証明された。 (**, $P < 0.01$, ANOVA)

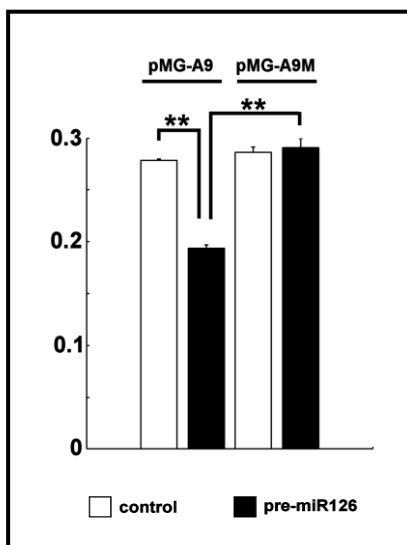


図 6

(5)miR-126 標的遺伝子 ADAM9 の膵組織中での局在の確認

図 7 に示す如く、正常膵組織では miR-126 の発現が認められたが ADAM9 の発現は見られなかった。対照的に膵癌組織では miR-126 発現が消失しており、ADAM9 発現が亢進していた。このことから、miR-126 発現と ADAM9 発現は相互排他的であると考えられた。

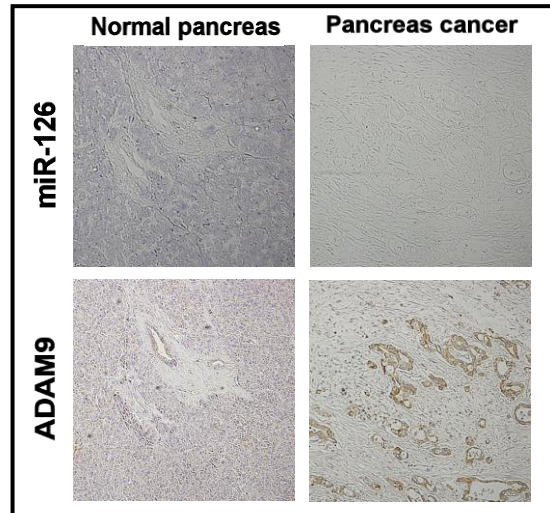


図 7

(6)miR-126 による癌幹細胞機能抑制の確認

ADAM9 は種々の癌細胞で浸潤能に寄与することが報告されており、これを標的とする miR-126 は膵癌細胞の浸潤能を抑制する可能性が考えられた。膵癌細胞株 ASPC1 を用い、miR-126 precursor の強制発現により癌幹細胞機能の一つである細胞遊走能と浸潤能に影響がみられるかについて評価した。図 8 に示すように、miR-126 の強制発現により、ASPC1 において細胞遊走能と浸潤能の抑制が認められた。

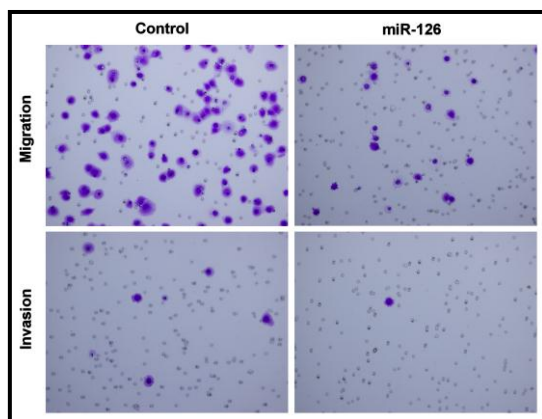


図 8

また、このような細胞機能の変化に伴い、上皮マーカーである E-cadherin の発現は増加し、間葉系マーカーである N-cadherin の発現が低下することが確認された。(図 9)

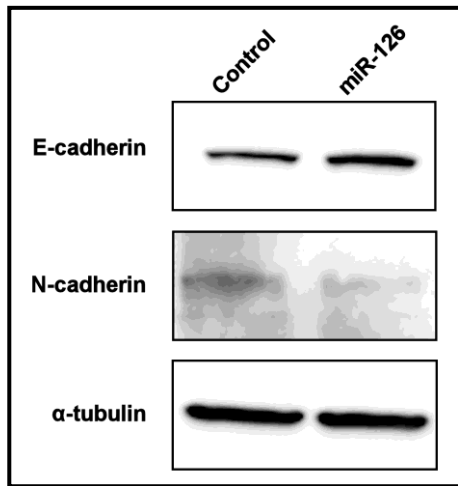


図 9

以上の結果より、miR-126 は膵癌幹細胞機能の一つである浸潤性を負に制御することが明らかとなり、miR-126/ADAM9 を介する経路は膵癌幹細胞を標的とする治療法を開発する際に有望な治療標的になりうると考えられた。

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 3 件)

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

MiR-126 acts as a tumor suppressor in pancreatic cancer cells via the regulation of ADAM9.

Mol Cancer Res. 2012;10(1):3-10.

査読有

2. 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. 2012;227(2):729-738.

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;102(1):150-156.

査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 濱田晋 佐藤賢一 下瀬川徹
膵癌特異的なマイクロ RNA 発現プロファイル
解析からの悪性化因子の同定
2011 年 10 月 23 日 JDDW2011 福岡

2. 濱田晋 佐藤賢一 廣田衛久 菅野敦
正宗淳 菊田和宏 桑潔 海野純 下瀬川
徹
膵癌細胞株における EMT 誘導因子 MSX2 の標
的 miRNA の検討
2011 年 7 月 29 日 第 42 回膵学会 弘前

3. 濱田晋 佐藤賢一 下瀬川徹
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検討
2011 年 5 月 13 日 第 97 回消化器病学会総会
東京

4. 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 晋 (Shin Hamada)
東北大学・病院・医員
研究者番号：20451560

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者