

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590469

研究課題名(和文)細胞外に放出されたmiRNAの膵癌間質相互作用における役割

研究課題名(英文)Role of miRNA on tumor-stromal interaction in the pancreas

研究代表者

深町 勝巳(Fukamachi, Katsumi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90381798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵管癌は固形癌の中でも突出して間質の多い予後不良な難治癌である。ヒト膵癌のモデル動物である活性型KRASコンディショナルトランスジェニックラットを用いて膵癌間質形成に関わる可能性のあるmiRNAの探索を行った。膵癌組織と血清中では発現様式が異なっていたことから、miRNAが膵癌で産生され何らかの選別を受け細胞外に放出されていると考えられた。同定した膵癌より放出されたと考えられるmiRNAが間質形成に關与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma is an extremely stroma-rich and highly aggressive solid tumor. We established an animal model for human pancreatic ductal adenocarcinoma using transgenic rats in which expression of a human KRAS oncogene is regulated by the Cre/loxP system. Using this model, we searched for candidate extracellular miRNAs for participating in the stroma formation in pancreatic cancer. Many miRNAs showed different expression patterns between tumor tissue and serum of rats bearing pancreatic ductal adenocarcinoma. It is suggested that the some kind of sorted miRNAs were secreted to extracellular. These miRNA might be involved in the stroma formation.

研究分野：発癌

キーワード：膵癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌は固形癌の中でも突出して間質の多い予後不良な難治がんである。腫瘍形成には腫瘍を形成する上皮細胞の存在と同時に癌細胞の微小環境を規定する間質細胞が極めて重要な意義を有している。正常間質と癌間質ではその性格が変化していることが知られてきており、癌間質は癌細胞から何らかの影響を受け、癌の生育し易い環境を作りだしていると考えられる。TGF、PDGFをはじめとする多くの因子が関与していることが知られているが、その調節機構の詳細は不明である。

我々が確立した Cre/loxP システムを用いたヒト活性型 KRAS コンディショナルトランスジェニックラットの膵臓に Cre recombinase を発現させることにより膵管癌を発生させることが可能である。発生する膵管癌はヒトと同様に間質が豊富でありヒトに極めて類似した組織像を示す。

miRNA は 18~25 塩基からなる小分子 RNA であり、標的となる複数の遺伝子を制御している。miRNA が腫瘍細胞で発現変化し、腫瘍形成に重要な役割を持っていることが多く報告されている。細胞外へと分泌された miRNA が他の細胞に取り込まれて作用することが報告されている。したがって、本研究においては腫瘍と間質との相互作用にも広範囲に複数の遺伝子を制御し得る miRNA の関与を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、膵癌における癌上皮細胞とその周囲の間質細胞の相互作用に関わる因子、特に miRNA の検索を我々が確立したラット膵癌モデルを用いて行う。

3. 研究の方法

ラット膵癌の発生

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを HEK293 細胞に感染させて、アデノウイルスを増幅し精製した。精製したアデノウイルス (4×10^9 ifu/ml) を KRAS トランスジェニックラットの膵管内に注入することによって膵管癌を発生させた。

病理解析

採取した組織は、ホルマリンまたはパラホルムアルデヒドで固定しパラフィン包埋した。薄切した組織切片は HE 染色を行った。導入遺伝子の発現は免疫染色により確認した。

RNA 抽出

ISOGEN (日本ジーン) を用いて膵組織より total RNA を抽出した。miRvana PARIS キット (Applied Biosystems) を用いて血清より total RNA を抽出した。qRT-PCR 用のトータル RNA は、血清に内部標準として miR-3 (dme-miR-3) を添加した後に抽出した。

マイクロアレイ解析

膵組織および血清から抽出した total RNA を用いて、ラット miRNA マイクロアレイキット (Agilent Technologies) を使用して解析を行った。

定量的 PCR 解析

膵組織および血清から抽出した total RNA は、miRNA プローブ、TaqMan microRNA アッセイキットおよび 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて miRNA の定量的 RT-PCR 解析を行った。

4. 研究成果

活性型 KRAS トランスジェニックラットの膵臓に Cre recombinase 発現アデノウイルスを注入し、膵癌を発生させた。発生した間質の豊富な膵腫瘍において活性型 KRAS の発現は、腫瘍性病変のみにみられ、間質にはみられなかった。したがって、活性型 KRAS を発現する膵管細胞が miRNA を含む何らかの因子により間質細胞を誘導していることが推測された。本膵癌モデルラットにおいては、ヒト膵癌患者において既に発現増加が報告されている miRNA も同様に発現増加していることを明らかにしており、ヒトの病態を病理学・生物学的によく再現しており miRNA を探索する上で良いモデルであると考えられた。細胞外に分泌される miRNA は血中にも移行すると考えられることから、血液中に存在する miRNA について検索した。

Cre recombinase 発現アデノウイルスにより膵癌を発生させた膵癌ラットおよび空ベクターを投与したコントロールラットの血清より RNA を抽出し miRNA マイクロアレイ解析を行った。得られた miRNA 発現量の全データを用いたクラスタリング解析では、膵癌ラットとコントロールラットは異なった発現様式を示していることが明らかとなった。さらに、有意に増加した miRNA (miR-30b-5p、miR-24-2*、miR-20b-5p、miR-874、miR-125b-3p、miR-125b*、miR-29a、miR-365、miR-370 および miR-878) と有意に低下した miRNA (let-7c、let-7b、miR-125a-5p、miR-375 および miR-466b) の計 15 個の miRNA を用いたクラスタリング解析では膵癌ラットとコントロールラットとのクラスターは明確に分かれた。したがって、膵癌に特有の miRNA が存在することが示唆された。膵癌ラットとコントロールラットとの間に発現量の有意差が認められた 15 個の血清 miRNA のうち、ヒトでの発現が不明あるいは臓器障害などの炎症により発現変動するものは除外し、10 個の血清 miRNA (miR-30b-5p、miR-24-2*、miR-20b-5p、miR-874、miR-125b-3p、miR-125b*、let-7c、let-7b、miR-125a-5p および miR-375) について、定量的 RT-PCR により解析した。コントロールラットと比較して膵癌ラットの miR-375 の発現は有意に低かった。他の

miRNA は、miRNA マイクロアレイ解析では発現変化がみられたにもかかわらず定量的 RT-PCR 解析では発現変化が認められなかった。

次に、膵癌ラットおよびコントロールラットの膵組織より RNA を抽出し miRNA マイクロアレイ解析を行った。miR-541、miR-369-5p、miR-376a、miR-203 等を含む多くの miRNA が膵組織で発現変化していた。膵組織の miRNA マイクロアレイ解析において膵癌と正常膵との間で有意な発現差が認められた miRNA のうちヒトでも発現がみられる 18 個の miRNA について選択し、血清中 miRNA 量を定量的 RT-PCR にて定量した。発現増加した 14 個の miRNA のうち、膵癌ラット血清では miR-369-5p、miR-376a、miR-203、miR-541、miR-31 および miR-18a の発現が増加しており、そのうち miR-369-5p、miR-376a および miR-203 の発現は有意に増加していた。膵癌組織で発現低下がみられた miRNA は膵癌ラット血清においては発現変化がみられなかった。膵癌組織で有意差がみられた miRNA の約 15%のみが血清中で有意に変化していた。したがって、マイクロアレイにより膵癌組織で発現変化すると同定された miRNA の多くは血清中では変化していなかった。

以上より、膵癌から放出された血清 miRNA が存在することが示された。また、膵癌組織と血清中では異なった発現様式を示したことから、これら miRNA が膵癌で産生され何らかの選別を受け細胞外に放出されていると考えられた。これら細胞外に放出された miRNA の間質形成への関与が示唆された。

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 5 件)

Fukamachi K, Iigo M, Hagiwara Y, Shibata K, Futakuchi M, Alexander DB, Hino O, Suzui M, Tsuda H. Rat N-ERC/mesothelin as a marker for in vivo screening of drugs against pancreas cancer. *Plos one*. 9: e111481, 2014.
doi:10.1371/journal.pone.0111481 査読有

Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Fukuda T, Sumida K, Deguchi Y, Mikata K, Nishioka K, Kawamura S, Uwagawa S, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Metabolomic and transcriptomic profiling of human K-ras oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*. 34: 1251-1259, 2013.
doi:10.1093/carcin/bgt053 査読有

Yabushita S, Fukamachi K, Kikuchi F, Ozaki M, Miyata K, Sukata T, Deguchi Y, Tanaka H, Kakehashi A, Kawamura S, Uwagawa S, Wanibuchi H, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. *Pancreas*. 42: 1034-1039, 2013.
doi:10.1097/MPA.0b013e3182883624 査読有

Fukamachi K, Tanaka H, Sakai Y, Alexander DB, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M. A novel reporter rat strain that expresses LacZ upon Cre-mediated recombination. *Genesis*. 51: 268-274, 2013. doi:10.1002/dvg.22371 査読有

Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Sumida K, Deguchi Y, Sukata T, Kawamura S, Uwagawa S, Suzui M, Tsuda H. Circulating microRNAs in serum of human K-ras oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Pancreas*. 41: 1013-1018, 2012.
doi:10.1097/MPA.0b013e31824ac3a5 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Katsumi Fukamachi, Setsuko Yabushita, Mitsuru Futakuchi, Hiroyuki Tsuda, Masumi Suzui, Identification of serum tumor marker of pancreas cancer by omics analysis, 第 29 回発癌病理研究会 平成 26 年 9 月 3 日 スパリゾートハワイアンズ(福島県いわき市)

深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄、Ras トランスジェニックラットを用いた発がん研究、平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 平成 24 年 1 月 18 日 琵琶湖ホテル(滋賀県大津市)

深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄、活性型 ras コンディショナルトランスジェニックラットを用いた膵がんモデル、第 26 回発癌病理研究会 平成 23 年 8 月 31 日 ルネッサンスサッポロホテル(札幌市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

深町 勝巳 (FUKAMACHI, Katsumi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 9 0 3 8 1 7 9 8

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

津田 洋幸 (TSUDA, Hiroyuki)

名古屋市立大学・その他部局・教授

研究者番号：10163809