

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592032

研究課題名(和文)エクソソームを介した細胞外miRNA分泌に注目した癌間質相互作用研究の新展開

研究課題名(英文) New development in the study of tumor-stromal interaction focused on extracellular miRNA via exosome.

研究代表者

当間 宏樹 (TOMA, Hiroki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：80437780

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)：膵癌細胞株における転移に関わるmiRNAの解析を行うこととした。まず他癌腫で転移に関わると報告されているmiR-373に関して検討を行ったところ、miR-373の導入により膵癌細胞株SUIT2およびKP2はMETを起すことが示された。次に肝転移能の高い膵癌細胞株(肝高転移株)と肝転移能の低い膵癌細胞株を用いて、両者におけるmiRNAの網羅的発現解析を行った。その結果、MiR-16・miR-27b・miR-192・miR-125bは膵癌の転移に関わることが報告されており、本研究で明らかにしたmiRNAが癌間質相互作用、とくに転移を促進する方向へ作用している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We planned to identify key-miRNAs that correlate with metastasis. First, we checked the effect of miR-373 reported to correlate with metastasis of breast cancer and investigated that transfection of miR-373 induced MET progression in SUIT2 and KP2 cell lines. Next, we analyzed comprehensive miRNA expression of highly metastatic pancreas cancer cell line and normal pancreas cancer cell line. We identified several miRNAs highly expressed in one side. For example, miR-125b-5p, miR-614, miR-3178, miR-4324 and miR-4706 were up-regulated and miR-16-5p, miR-27b-3p, miR-192-5p and miR-194-5p were down-regulated in metastatic cell line. These miRNAs may affect cancer metastasis, because MiR-16, miR-27b, miR-192 and miR-125b were already reported to correlate with metastasis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 miRNA 癌間質相互作用

1. 研究開始当初の背景

MicroRNA(miRNA)は20数個の塩基から構成される non-coding RNA であり、mRNA に結合して翻訳を抑制し、アポトーシス、分化、代謝など様々な細胞機能を制御している。miRNA の発現が癌の浸潤や転移にも関与していることが判明し (Tavasoie, Nature, 2008)、癌組織や、癌細胞における miRNA の機能的解析が多くなされてきた。最近、細胞が分泌するエンドソーム由来の小胞顆粒であるエクソソーム中に miRNA が発見され (Valadi, Nature Cell Biol, 2007)、細胞間のメッセンジャーとして機能することが示された (Kosaka, J Biol Chem, 2010)。この細胞間コミュニケーションの常識を大きく覆す発見により、古くから見つかった生命現象であるエクソソームに再び注目が集まっている。しかし、miRNA がこういった機構でエクソソームに内包されるかや、受け手となるレシピエント細胞のエクソソーム取り込み機構など解明すべき点は山積していた。

2. 研究の目的

膵癌は固形癌の中でもとりわけ豊富な間質構造を有し、癌間質相互作用が膵癌の高い浸潤能、転移能、治療抵抗性に強く影響を与えている (Bhowmick, Nature, 2004)。近年、膵間質に存在する膵星細胞 (Pancreatic Stellate cells; PSCs) が同定され、種々の液性因子の分泌を介し膵線維化に関与することが明らかになった (Omary, J Clin Invest, 2007)。マウス共移植モデルで PSCs は膵癌細胞の増殖、浸潤、転移を促進することが示されており (Vonlaufen, Cancer Res, 2008)、PSCs の活性型である myofibroblast が膵癌の悪性形質を誘導する責任細胞として注目されている。また、癌組織中にある特定の微量細胞集団だけが腫瘍形成能を持つとする癌幹細胞の概念 (Passegue, Nature, 2006) に伴い、癌幹細胞を周囲微小環境で支持する間質細胞 (ニッチ) の存在も推測され、その相互作用が今後の新たな治療標的になると大きく期待されている (Kaplan, Nature, 2005)。癌間質相互作用のメディエーターとして、サイトカインやケモカイン、接着分子などについては多くの研究がなされているものの、エクソソーム中核酸分子による遺伝的修飾が及ぼす影響については全くわかっていない。本研究は、癌間質相互作用におけるエクソソーム内 miRNA の働きを解明し、膵癌進展のメカニズムを解明する事を目的とした。

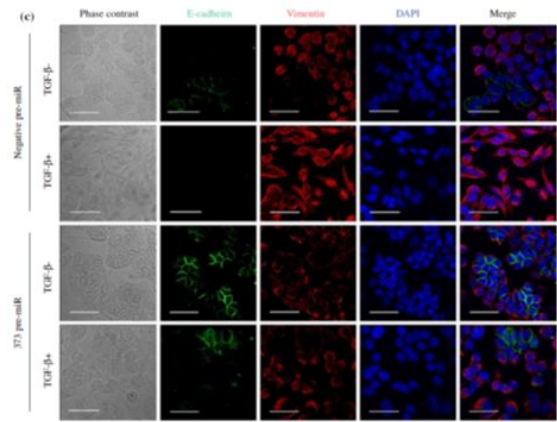
3. 研究の方法

まず、ヒト癌関連 PSCs が発現する miRNA の網羅的解析を行い、癌関連 PSCs に特異的な miRNA や癌間質相互作用、膵癌の浸潤・転移・予後と関連を示す key miRNA を同定する。続いて、癌細胞、癌関連 PSCs の分泌するエクソソームを同定・解析し、この分泌顆粒中に含まれる miRNA を同定した key

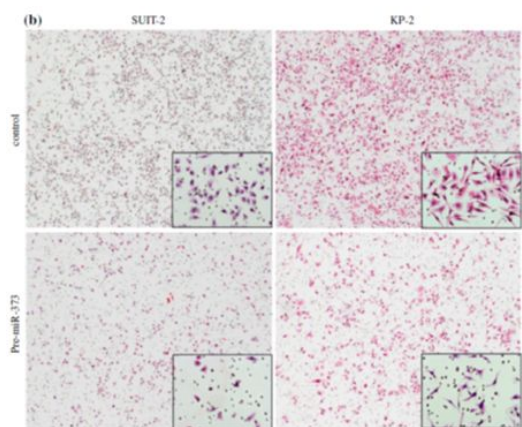
miRNA を参考にしながら発現解析を行う。続いて、分泌されたエクソソーム内在 miRNA が受け手の細胞に取り込まれ、細胞内で target mRNA の抑制を行うか、in vitro transduction 実験、in vivo マウス膵同所移植モデルなどを駆使して解明する。また、バイオマーカーとしての分泌型 miRNA の意義についても検討する。最後に、癌間質相互作用に関与するエクソソーム内在 miRNA を利用した新規膵癌治療の可能性を模索する。

4. 研究成果

まず我々が膵癌切除組織から樹立した膵星細胞の培養上清中に放出されたエクソソームを回収し解析を行ったところ、miRNA の純度が保てずに正確な発現解析を行うことは困難であった。このため、過去に我々が報告した miR-21, miR-31, miR-34a, miR-200c, miR-204 に続いて、膵癌細胞株における転移に関わる miRNA の解析を行った。他癌腫で転移に関わると報告されている miR-373 に関して検討を行ったところ、miR-373 の導入により膵癌細胞株 SUIT2 および KP2 は MET を起こすことが示された。



また miR-373 の導入により浸潤能が低下し、in vivo でも転移が抑制されることが示された。



次に肝転移能の高い膵癌細胞株 (高肝転移株) と肝転移能の低い膵癌細胞株を用いて、両者における miRNA の網羅的発現解析を行った。その結果、miR-125b-5p・miR-614・miR-3178・miR-4324・miR-4706 などが高

転移株で高発現しており、miR-16-5p・miR-27b-3p・miR-192-5p・miR-194-5pなどが低発現していることを見出した。miR-16はBcl2を介してマウスの活性型膵星細胞のアポトーシスを誘導するとされ、miR-192についても smad-interacting protein 1 (SIP1)を介して膵癌の増殖能や遊走能を上昇させることが報告されている。また、miR-125bの抑制はBBC3・NEU1を介して Gemcitabine 投与下の膵癌の増殖能や遊走能を低下させることが報告されている。このことから、本研究で明らかにしたこれらの miRNA が癌間質相互作用、とくに転移を促進する方向へ作用している可能性が示唆された。

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 11 件)

1. Elevated Expression Level of MicroRNA-196a Is Predictive of Intestinal-Type Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. Aso T, Ohtsuka T, Tamura K, Ideno N, Kono H, Nagayoshi Y, Ohuchida K, Ueda J, Takahata S, Shindo K, Aishima S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M. *Pancreas*(2014) 43(3):361-366、査読有
DOI: 10.1097/MPA.0000000000000042
2. CD166/ALCAM expression is characteristic of tumorigenicity and invasive and migratory activities of pancreatic cancer cells. Fujiwara K, Ohuchida K, Sada S, Horioka K, Ulrich CD 3rd, Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M. *PLoS One*(2014) 9(9):e107247、査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0107247
3. Micro RNA-373 is Down-regulated in Pancreatic Cancer and Inhibits Cancer Cell Invasion. Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Aishima S, Oda Y, Nagai E, Tanaka M. *Annals of Surgical Oncology* (2014) 2014(21):S564-S574、査読有
DOI: 10.1245/s10434-014-3676-8
4. Hypoxia enhances the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells via increased secretion of connective tissue growth factor. Eguchi D, Ikenaga N, Ohuchida K, Kozono S, Cui L, Fujiwara K, Fujino M, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M. *J Surg Res* (2013) 181(2):225-233、査読有
DOI: 10.1016/j.jss.2012.06.051
5. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells. Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, Ikenaga N, Fujiwara K, Cui L, Mizumoto K, Tanaka M. *Cancer Res.*(2013)73(7):2345-2356、査読有
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3180
6. Migratory Activity of CD105+ Pancreatic Cancer Cells Is Strongly Enhanced by Pancreatic Stellate Cells. Fujiwara K, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Shindo K, Ikenaga N, Cui L, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. *Pancreas*(2013) 42(8):1283-1290、査読有
DOI: 10.1097/MPA.0b013e318293e7bd
7. MAL2 expression predicts distant metastasis and short survival in pancreatic cancer. Eguchi D, Ohuchida K, Kozono S, Ikenaga N, Shindo K, Cui L, Fujiwara K, Akagawa S, Ohtsuka T, Takahata S, Tokunaga S, Mizumoto K, Tanaka M. *Surgery*(2013) 154(3):573-582、査読有
DOI: 10.1016/j.surg.2013.03.010
8. Pancreatic cancer cells enhance the ability of collagen internalization during epithelial-mesenchymal transithin. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Akagawa S, Fujiwara K, Eguchi D, Kozono S, Ohtsuka T, Takahata S, Tanaka M. *PLoS One*(2012) 7(7):e40434、査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0040434
9. MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the HOXA1 gene. Ohuchida K, Mizumoto K, Lin C, Yamaguchi H, Ohtsuka T, Sato N, Toma H, Nakamura M, Nagai E, Hashizume M, Tanaka M. *Ann Surg Oncol*(2012) 19(7):2394-2402、査読有
DOI: 10.1245/s10434-012-2252-3
10. CD271 Subpopulation of Pancreatic Stellate Cells Correlates with Prognosis of Pancreatic Cancer and Is Regulated by Interaction with Cancer

Cells. Fujiwara K, Ohuchida K, Mizumoto K, Eguchi D, Kozono S, Ikenaga N, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. PLoS One(2012) 7(12):e52682、査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0052682

11. 膵癌の間質と星細胞. 池永直樹、大内田研宙、小藺真吾、水元一博、田中雅夫. 肝胆膵(2012) 65(2):351-357、査読無
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ao1ktsud/2012/006502/019&name=0351-0357j&UserID=133.5.55.10>

〔学会発表〕(計 31 件)

1. 膵癌細胞からの作用により膵星細胞中の NPAS1 が増加する. 藤原謙次、大内田研宙、赤川進、大塚隆夫、高畑俊一、水元一博、田中雅夫. 第 45 回日本膵臓学会大会, 2014/7/11-12, 福岡県北九州市
2. 膵癌関連繊維芽細胞における CD146 発現と膵がんの進展抑制. 鄭彪、大内田研宙、崔林、水内祐介、藤原謙次、赤川進、堀岡宏平、田中友晴、佐田政史、仲田興平、前山良、大塚隆生、小田義直、水元一博、田中雅夫. 第 45 回日本膵臓学会大会, 2014/7/11-12, 福岡県北九州市
3. トラニラストによる膵星細胞の抑制についての検討. 田中友晴、大内田研宙、水元一博、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、佐田政史、堀岡宏平、鄭彪、赤川進、藤原謙次、仲田興平、宮坂義浩、前山良、大塚隆生、田中雅夫. 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014/4/3-5, 京都市
4. 膵癌の肝転移における follistatin-like1 の役割. 堀岡宏平、大内田研宙、江口大樹、佐田政史、田中友晴、赤川進、藤原謙次、鄭彪、仲田興平、宮坂義浩、前山良、大塚隆生、水元一博、田中雅夫. 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014/4/3-5, 京都府京都市
5. 膵癌における TM4SF1 発現の意義. 鄭彪、崔林、大内田研宙、進藤幸治、藤原謙次、赤川進、堀岡宏平、田中友晴、佐田政史、吉田真樹、千々岩芳朗、奥村隆志、仲田興平、大塚隆生、小田義直、水元一博、田中雅夫. 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014/4/3-5, 京都府京都市
6. 膵癌間質の線維配列が癌細胞の形態と浸潤方向に与える影響. 佐田政史、大内田研宙、堀岡宏平、田中友晴、鄭彪、Cases AI、赤川進、藤原謙次、仲田興平、宮坂

義浩、前山良、大塚隆生、高畑俊一、水元一博、田中雅夫. 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014/4/3-5, 京都市

7. CD166 Expression Characterized Tumorigenicity, and Invasive and Migratory Activities of Pancreatic Cancer Cell Lines. Fujiwara K, Ohuchida K, Akagawa S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M. Ammerican Pancreatic Association 44th Annual Meeting, 2013/10/30-11/2, Miami(United States of America)
8. Comparisons of Characteristics of Peritoneal Fibroblasts in Dissemination with those of Mesothelial Cells and Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Cancer. Akagawa S, Ohuchida K, Torada N, Eguchi D, Kozono S, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M. Ammerican Pancreatic Association 44th Annual Meeting, 2013/10/30-11/2, Miami(United States of America)
9. Follistatin-like 1 Regulates Epithelial to Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer. Horioka K, Ohuchida K, Eguchi D, Fujiwara K, Akagawa S, Tanaka T, Sada M, Mizumoto K, Tanaka M. Ammerican Pancreatic Association 44th Annual Meeting, 2013/10/30-11/2, Miami(United States of America)
10. Clinical significance of stromal CD90 and alpha-SMA expression in pancreatic cancer. Sada M, Ohuchida K, Fujiwara K, Horioka K, Tanaka T, Zheng B, Cases AI, Akagawa S, Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M. Ammerican Pancreatic Association 44th Annual Meeting, 2013/10/30-11/2, Miami(United States of America)
11. Pancreatic Cancer Cells Induces Up-regulation of NPAS1 in Pancreatic Stellate Cells. Fujiwara K, Ohuchida K, Sada M, Akagawa S, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Tanaka M. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology & the Korean Pancreatobiliary Association 2013, 2013/9/4-7, Seoul(Korea)

12. The development of pancreatic cancer therapy based on regulating pancreatic cancer desmoplasia by targeting pancreatic Stellate Cells. Kozono S, Ohuchida K, Ikenaga N, Ohtsuka T, Mizumoto K, Tanaka M. International Pancreatic Research Forum 2013 , 2013/7/27 , Sendai(Japan)
13. Regulation of Pancreatic Stellate cells for Treatment of Pancreatic cancer. Ouchida K, Mizumoto K, Tanaka M. The 6th International Conference and Commemorative Lecture of Pin-Wen Lin of Pancreatic Cancer , 2013/6/15 , Tainan(Taiwan)
14. A CD166 negative subpopulation of pancreatic cancer cells has strong invasive and migratory activity. Fujiwara K, Ohuchida K, Shindo K, Akagawa S, Eguchi D, Kozono S, Cui L, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Mizumoto K, Tanaka M. DDW2013 , 2013/5/18-21 , Orlando(United States of America)
15. A CD166 negative subpopulation of pancreatic cancer cells has strong invasive and migratory activity. Fujiwara K, Ohuchida K, Shindo K, Akagawa S, Eguchi D, Kozono S, Cui L, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Mizumoto K, Tanaka M. 47th Annual Meeting of the Pancreas Club , 2013/5/17-18 , Orlando(United States of America)
16. 膵癌の遠隔転移に關与する新規遺伝子 MAL2(myelin and lymphocyte protein2)の同定. 江口大樹、大内田研宙、小園真吾、崔林、藤原謙次、趙茗、赤川進、寅田信博、Cases Ana Ines、大塚隆生、上田純二、高畑俊一、水元一博、田中雅夫. 第 113 回日本外科学会定期学術集会 , 2013/4/11-13 , 福岡県福岡市
17. C D 166 陰性膵癌細胞は強い浸潤能・遊走能を有する. 藤原謙次、大内田研宙、進藤幸治、赤川進、江口大樹、小園真吾、崔林、大塚隆生、高畑俊一、相島慎一、水元一博、田中雅夫. 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 2013/4/11-13 , 福岡県福岡市
18. The investigation of CD146 in pancreatic cancer associated fibroblast. 趙茗、大内田研宙、鄭彪、崔林、小園真吾、江口大樹、水元一博、田中雅夫. 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 2013/4/11-13 , 福岡県福岡市
19. 膵癌間質における CD90 と α -SMA 発現の意義. 佐田政史、大内田研宙、藤原謙次、赤川進、江口大樹、小園真吾、趙茗、崔林、大塚隆生、水元一博、田中雅夫. 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 2013/4/11-13 , 福岡県福岡市
20. A CD166 negative subpopulation of pancreatic cancer cells has strong invasive and migratory activity. Fujiwara K, Ohuchida K, Shindo K, Akagawa S, Eguchi D, Kozono S, Cui L, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Mizumoto K, Tanaka M. 4th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association , 2013/3/27-30 , Shanghai(China)
21. Migratory activity of CD105+ pancreatic cancer cells is strongly enhanced by pancreatic stellate cells. Fujiwara K, Ouchida K, Ohtsuka T, Akagawa S, Eguchi D, Shindo K, Kozono S, Cui L, Takahata S, Mizumoto K, Tanaka M. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting , 2012/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
22. Pancreatic cancer Cells Enhance the Ability of Collagen Internalization During Epithelial-Mesenchymal Transition. Ikenaga N, Ouchida K, Mizumoto K, Akagawa S, Fujiwara K, Eguchi D, Kozono S, Otsuka T, Takahata S, Tanaka M. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting , 2012/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
23. Antifibrotic Agent, Pirfenidone, Inhibits Pancreatic Stellate Cells and Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer. Kozono S, Ouchida K, Eguchi D, Fujiwara K, Zhao M, Cui L, Mizumoto K, Tanaka M. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting , 2012/10/30-11/2 , Miami(United States of America)

- 24 Pancreatic Cancer Cells in Hypoxia Enhance the Motility of Pancreatic Stellate Cells Via Increased Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor. Eguchi D, Ouchida K, Kozono S, Cui L, Zhao M, Fujiwara K, Akagawa S, Otsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Tanaka M. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting , 2012/10/30-11/2 , Miami(United States of America)
- 25 CD271+ pancreatic stellate cells are correlated with prognosis of patients with pancreatic cancer and regulated by interaction with cancer cells. Fujiwara K, Ohuchida K, Mizumoto K, Shindo K, Eguchi D, Kozono S, Ikenaga N, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. Pancreas Cancer 2012 in Kyoto , 2012/10/4-6 , Kyoto(Japan)
- 26 Prifenidone による膵星細胞およびその癌間質相互作用を標的とした膵癌治療の可能性. 小園真吾、大内田研宙、水元一博、大塚隆生、赤川進、江口大樹、藤原謙次、Ana Ines Cases、趙茗、崔林、池永直樹、田中雅夫. 第 43 回日本膵臓学会大会 , 2012/6/28-29 , 山形県山形市
- 27 CD105 陽性膵癌細胞は膵星細胞から影響を受けて強い遊走能を獲得する. 藤原謙次、大内田研宙、江口大樹、小園真吾、池永直樹、高畑俊一、水元一博、田中雅夫. 第 43 回日本膵臓学会大会 , 2012/6/28-29 , 山形県山形市
- 28 浮遊条件で培養した膵癌由来線維芽細胞の癌間質相互作用における役割. 崔林、大内田研宙、趙茗、池永直樹、小園真吾、江口大樹、藤原謙次、赤川進、寅田信博、Mahawithitwong Prawej、水元一博、田中雅夫. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉県千葉市
- 29 Pirfenidone による膵星細胞を標的とした新しい膵癌治療の可能性. 小園真吾、大内田研宙、大塚隆生、赤川進、Mahawititwong Prawej、高浪英樹、江口大樹、藤原謙次、趙茗、崔林、池永直樹、水元一博、田中雅夫. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉県千葉市
- 30 膵癌における CD271 陽性膵星細胞の意義. 藤原謙次、大内田研宙、進藤幸治、赤川進、江口大樹、小園真吾、池永直樹、崔林、相島慎一、大塚隆生、高畑俊一、水元一博、小田義直、田中雅夫. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉県千葉市
- 31 膵星細胞は低酸素下で connective tissue growth factor(CTGF)の分泌を介して膵癌の浸潤を促進する. 江口大樹、池永直樹、小園真吾、藤原謙次、趙茗、崔林、大内田研宙、大塚隆生、水元一博、田中雅夫. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 , 2012/4/12-14 , 千葉県千葉市
- 〔図書〕(計 0 件)
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
当間 宏樹 (TOMA Hiroki)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号 : 80437780
- (2)研究分担者
田中 雅夫 (TANAKA Masao)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号 : 30163570
富永 洋平 (TOMINAGA Yohei)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号 : 90304823
大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 20452708
宮坂 義浩 (MIYASAKA Yoshihiro)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号 : 40507795
- (3)連携研究者
なし