

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461020

研究課題名(和文) 臨床検体から導き出す膵癌幹細胞関連 miRNAを用いた膵癌治療の確立

研究課題名(英文) The establishment of treatment for pancreatic cancer using miRNA associated with stem cells related pancreatic cancer.

研究代表者

菅野 敦 (Kanno, Atsushi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70509190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：術前化学療法前の膵癌症例から超音波内視鏡下穿刺吸引を用いた膵癌組織のtotal RNAを採取し、そのprofile作成を継続した。合わせて、採取された組織のCD44やCD133といった膵癌幹細胞のマーカー検出を行ったが同定できなかった。採取される組織量が少ないと推測されたため、切除標本を用いて膵癌幹細胞のマーカー検出を継続している。NAC前後にEUS-FNAを行う事が困難なため、NAC後に手術した膵癌症例から組織を譲り受け、遺伝子profileの作成を行っている。

研究成果の概要(英文)：We have obtained the histological sample of pancreatic cancer using Endoscopic ultrasonography-fine needle aspiration (EUS-FNA) and continued to make the genetic profile. The evaluation of expression of the marker associated with stem cells related pancreatic cancer was performed. However, we could not detect these markers. Since one of the causes not to detect these markers is that the amount of histological sample by EUS-FNA is very small, we continue to evaluate these markers using the histological samples acquired by operation. Furthermore, sensitivity test of anti cancer drug for pancreatic cancer using histological sample acquired by EUS-FNA has been continued. We have compared the clinical information and surgical stage. The cell lines of resistance for anti-cancer drug were used for checking the genetic profile.

研究分野：膵臓

キーワード：膵癌 EUS-FNA miRNA

1. 研究開始当初の背景

・一方、近年各臓器における化学療法の進歩はめざましい。膵癌も 2000 年に gemcitabine が適応となって以来、明らかに膵癌の予後が延長したが、いまだ満足する成果が得られていない。膵癌における化学療法での根治は難しく、化学療法単独での効果は限られる。その理由の一つに癌幹細胞の関与が推測されている。癌幹細胞は多くの抗癌剤に対して抵抗性であり、多くの固形腫瘍が抗癌剤で完全寛解が得られないのは、癌幹細胞が残存するためと推測されている。加えて、通常の化学療法薬剤は膵癌の癌幹細胞成分を増加させることも判明しており、このような耐性機構を有効に阻害する新規治療の開発が期待されている。しかし、癌幹細胞の適切なマーカーは完全に同定されておらず、幹細胞性の維持に関わるメカニズムも不明な点が多い。

・このような複雑な細胞機能の制御因子として、蛋白をコードしない miRNA が注目されている。miRNA は 20-24 塩基からなる低分子量 RNA であり、mRNA の 3' 被翻訳領域に配列特異的に結合し蛋白翻訳を制御すると考えられている。miRNA は多くの標的 mRNA を有し、それらの発現を網羅的に制御する。さらに、miRNA は組織中で発現するのみならず、末梢血液中にエクソームに包み込まれた状態で細胞の能動的分泌によって放出され、安定な状態で存在することが報告されている。血液中の miRNA は簡便に採取できるため、疾患のマーカーとしての応用が期待されている。膵癌において転移・浸潤能や抗癌剤耐性に関わる miRNA の報告が散見されているが、膵癌幹細胞の機能維持に関連する miRNA については未知の部分が多く、今後の検討が必要である。

・我々は、いままで膵癌の悪性度に関する様々な研究を行ってきた¹⁾⁻⁷⁾。内視鏡的逆

行性膵胆管造影(ERCP)下に施行した胆管膵管擦過細胞から得られる mRNA を用いた検討も行い、微量な細胞から分子生物学的な解析が可能であることを確認している⁸⁻⁹⁾。近年普及の目覚ましい EUS-FNA は膵癌の組織診断に際して高い正診率を有し、採取される組織量も分子生物学的検討に十分利用が可能である。我々は、化学療法後の癌組織中では癌幹細胞成分が増加している点に着目し、EUS-FNA を用いて化学療法前後の組織における miRNA 発現プロファイル変化の網羅的解析を行い、癌幹細胞関連 miRNA を同定することを計画している。同時に、血液中の miRNA 発現プロファイルも合わせて解析し、血液中でも検出可能な癌幹細胞関連マーカーとしての応用を目指している。次項に本研究計画の概要を示す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、いまだに根治の困難な膵癌の治療標的となりうる癌幹細胞関連 miRNA の候補を EUS-FNA 検体と末梢血から絞り込み、治療へ応用することが目的である。そのため以下の計画を立てた。(1) 化学療法前後の血液および膵癌組織から採取した FNA 検体から total RNA を抽出する。(2) 化学療法前後の血液中・膵癌組織中 miRNA プロファイルを比較。化学療法後に増加することが知られている膵癌幹細胞に関連する可能性がある miRNA の候補を絞り込む。(3) この miRNA をターゲットとした in vitro および in vivo の検討を行い、膵癌幹細胞特異的な miRNA の機能解析・標的遺伝子の同定を行い、治療応用を目指す。

3. 研究の方法

膵癌患者における化学療法前後の血液、および EUS-FNA 検体より total RNA を抽出し、microarray を用いて網羅的に比較を行い膵癌幹細胞に特異的な発現変動のみられる miRNA の候補を同定する。膵癌幹細胞

関連 miRNA の候補については膵癌細胞株を用いて過剰発現株と機能抑制株を作成し、その characterization を行う。データベース解析により miRNA 標的遺伝子の候補を抽出し、発現変動のみられるものについては過剰発現株と発現抑制株を作成し、機能解析を行う。上記の miRNA 発現レベルを改変した細胞株をヌードマウスに同所移植し、in vivo での進展形式も検討する。膵癌幹細胞関連 miRNA を標的とする新規治療戦略の基礎実験として、anti-mirRNA オリゴヌクレオチド (antagomir:AMO) を作成し、in vivo での腫瘍抑制効果についても解析する。

4. 研究成果

術 前 化 学 療 法 (neoadjuvant chemotherapy: NAC) 前の膵癌症例から超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診・組織診 (Endoscopic ultrasonography fine needle aspiration: EUS-FNA) を用いて膵癌組織の total RNA を採取し、その profile 作成を継続した。合わせて採取された組織の CD44 や CD133 といった膵癌幹細胞のマーカー検出を行ったが、同定までは至らなかった。採取されている組織量が少ないことが要因と考えられたため、現在切除標本の一部から膵癌幹細胞マーカーの発現を調べている。また、NAC 前後で EUS-FNA を施行することは困難なため、NAC 後の膵癌切除例から切除標本を用いて、total RNA を採取し、その profile 作成を継続した。また、合わせて EUS-FNA から採取した細胞を用いて ATP assay の手技を用いた抗癌剤感受性試験の可能性を模索している。さらに、EUS-FNA を施行した症例の予後を調査し、臨床情報とその手術所見の検討を行っている。さらに、膵癌細胞株を用いて、抗癌剤耐性株を作成し、遺伝子発現 profile の差を検討している。さらに、抗癌剤耐性膵癌細胞株を用いてヌードマウスを用いた同所移植を行い、膵癌の転移能の差異

から遺伝子発現 profile の検討をしている。

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) Takikawa T, Kanno A (12人中2番目)

, Masamune A, et al. Ectopic Opening of the Common Bile Duct Accompanied by Choledochocoele and Pancreas Divisum. Intern Med. 2016;55(9):1097-102. (査読有り)

(2) Kanno A (17人中1番目), Masamune A, Fujishima F, et al. Diagnosis of autoimmune pancreatitis by endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration using a 22-gauge needle: a prospective multicenter study. Gastrointest Endosc. 2016 Apr 8. pii: S0016-5107(16)30027-X. doi: 10.1016/j.gie.2016.03.1511. (査読有り)

(3) Miura S, Kanno A (15人中2番目), Masamune A, et al. Risk factors for recurrent biliary obstruction following placement of self-expandable metallic stents in patients with malignant perihilar biliary stricture. Endoscopy. 2016 Mar 17. [Epub ahead of print] (査読有り)

(4) Nakano E, Kanno A (14人中2番目), Masamune A, et al. IgG4-unrelated type 1 autoimmune pancreatitis. World J Gastroenterol. 2015 Sep 7;21(33):9808-16. (査読有り)

(5) Hamada S (4人中1番目), Masamune A, Kanno A (4人中3番目), Shimosegawa T. Comprehensive Analysis of Serum microRNAs in Autoimmune Pancreatitis. Digestion. 2015;91(4):263-71. (査読有り)

(6)Kanno A(8人中1番目), Masamune A, Okazaki K, et al. Nationwide epidemiological survey of autoimmune pancreatitis in Japan in 2011. *Pancreas*. 2015 May;44(4):535-9. (査読有り)

(7)Miura S, Kanno A(15人中2番目), Masamune A, et al. Bismuth classification is associated with the requirement for multiple biliary drainage in preoperative patients with malignant perihilar biliary stricture. *Surg Endosc*. 2015 Jul;29(7):1862-70. (査読有り)

(8)Kanno A(3人中1番目), Masamune A, Shimosegawa T. Endoscopic approaches for the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Dig Endosc*. 2015 Jan;27(2):250-8. (査読有り)

(9)Kanno A(13人中1番目), Masamune A, Hamada S, et al. Sudden disappearance of the blood flow in a case of pancreatic acinar cell carcinoma. *Intern Med*. 2014;53(22):2589-93. (査読有り)

(10)Unno J, Kanno A(13人中2番目), Masamune A, et al. The usefulness of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for the diagnosis of pancreatic neuroendocrine tumors based on the World Health Organization classification. *Scand J Gastroenterol*. 2014 Nov;49(11):1367-74. (査読有り)

(11)Takikawa T, Kanno A(15人中2番目), Masamune A, et al. Pancreatic duct drainage using EUS-guided rendezvous technique for stenotic pancreaticojejunostomy. *World J Gastroenterol*. 2013 Aug 21;19(31):5182-6. (査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

(1) 2015 DDW ASGE Poster session Washington DC 2015/5/16-20

Diagnosis of autoimmune pancreatitis by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration using a 22-gauge needle: a multicenter study.

Kanno A(17人中1番目) Masamune A. et al. Washington DC, USA

(2) 2014 DDW ASGE Poster session Chicago 2014/5/3-6

EUS-FNA is useful to diagnose pancreatic neuroendocrine tumors based on the World Health Organization classification.

Kanno A(13番目中1番目), Unno J, Masamune A, et al. Chicago, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
菅野 敦 (KANNO Atsushi)
東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70509190

(2)研究分担者

濱田 晋 (HAMADA Shin)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号： 20451560

(3)連携研究者
なし