

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：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461027

研究課題名(和文) microRNAによるnestin制御：膵癌治療の臨床応用を目指した検討

研究課題名(英文) Regulation of nestin using microRNA: Examination for clinical application of pancreatic cancer therapy

研究代表者

石渡 俊行 (Ishiwata, Toshiyuki)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：90203041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Nestinは中間径フィラメントで、膵癌の癌幹細胞マーカーとして知られ、癌の増殖、浸潤、転移に関与している。microRNA (miRNA)による膵癌治療法の可能性を検討するため、膵癌の幹細胞性に関連するmiRNAの同定を試みた。ヒト膵癌培養細胞に1190種のヒトmiRNAを投与し、スフェア形成能を抑制する8種類のmiRNAと、スフェア形成能を促進させる1種類のmiRNA(miR-4254)を同定した。miR-4254の発現ベクターをPANC-1細胞に遺伝子導入すると、nestinとnanogの発現が亢進した。miR-4254が膵癌の癌幹細胞性を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is associated with extremely high mortality rates, therefore, there is an urgent need to develop new therapeutic options. Nestin is a member of class VI intermediate filament proteins, and is known as a pancreatic cancer stem cell marker. Nestin plays important roles in proliferation, invasion and metastasis of pancreatic cancer cells. In the present study, we tried to identify the microRNAs (miRNAs) which are correlated with stemness of pancreatic cancer. Among 1190 miRNAs, we identified 8 types of miRNA that decrease the number of spheres, and 1 miRNA (miR-4254) that increases the number of spheres. Transfection of miR-4254-expression vector to PANC-1 cells increased nestin and nanog mRNA levels in the cells. These findings suggest that miR-4254 takes part in regulation of the stemness of pancreatic cancer.

研究分野：実験病理学

キーワード：膵癌 癌幹細胞 miRNA スフェア形成能 nestin 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する医療の進歩にも関わらず、膵癌の予後はきわめて不良であり、5年生存率は5%にも満たない状況であった。その原因は、膵癌は早期発見が困難で診断時には既に切除不能となっている例や、切除術後に局所浸潤や遠隔転移のため再発する例が多いことに加え、これらの症例に対して未だ有効な治療手段が開発されていないためである。このため膵癌に対する新たな治療手段の開発が待ち望まれていた。

Nestin は、1990年にラットの神経上皮幹細胞で発現が報告された Class に分類される中間径フィラメントの一つである。Nestin は神経系だけでなく、筋肉、精巣、歯、心臓、血管の前駆細胞での発現が確認されており、膵臓においても外分泌系の前駆細胞に発現することが報告されている。Nestin は 1600 アミノ酸から成る大型のタンパク質で、vimentin や desmin 等の他の中間径フィラメントと heterodimer を形成し重合して線維状となり、細胞内に存在している。中間径フィラメントは細胞の種類によって特異的な発現パターンを示し、細胞機能、特に細胞の運動性や細胞分裂に関与する。これまでに私たちは、膵癌 (Hum Pathol, 2009; Cancer Biol Ther, 2011; World J Gastroenterol, 2011; Int J Oncol, 2012; Med Mol Morphol, 2012; Int J Oncol, 2012)、大腸癌 (Int J Oncol, 2007)、膠芽腫 (Oncol Rep, 2011)、子宮頸癌 (Int J Oncol, 2012)、悪性黒色腫 (第 103 回米国癌学会、2012) における nestin の役割について研究を行ってきた。膵癌においては、浸潤性膵管癌の約 30% の症例で nestin の発現を認め、nestin 発現が膵癌の神経浸潤、及び切除断端浸潤と関連することを報告した (Human Pathol, 2009)。さらに、ヒト培養膵癌細胞株 Panc-1 に short hairpin RNA (shRNA) を導入して nestin を抑制すると、遊走と浸潤の抑制、細胞間接着の亢進、細胞

間接着分子 E-Cadherin の発現上昇、F-actin 線維の発現の変化や細胞形態の変化を認め、in vivo で肝転移が抑制された (Cancer Biol Ther, 2011)。さらに幹細胞を増殖させる sphere 形成法で膵癌細胞を培養すると nestin の発現が上昇し、nestin を抑制した膵癌細胞では sphere の形成率が低下した (国際膵癌シンポジウム, 2012)。Nestin 抑制膵癌細胞株及び nestin 過剰発現膵癌細胞株における DNA マイクロアレイ解析では、転写因子 transcription factor 4 (TCF4) の発現が nestin と関連することが明らかとなった。TCF4 は多能性幹細胞のマーカーのひとつである Nanog を抑制することで知られており、nestin 抑制膵癌細胞において Nanog の発現低下がみられた。これまでの私たちの検討から、膵癌において、nestin は TCF4 の発現制御を介して、Nanog の発現を制御し、癌幹細胞を抑制することが示された。さらに、nestin 抑制膵癌細胞株において miRNA アレイ解析を行ったところ、細胞の形態変化や浸潤性に関わる分子を標的とする miR-20a、miR-34a、miR-42 の上昇が確認された (国際膵癌シンポジウム, 2012)。

私たちの研究結果から、nestin が膵癌細胞の浸潤や転移に関わる機序が解明されつつあったが、nestin を制御する上流の機序についてはいまだ明らかになっていなかった。miRNA は蛋白質に翻訳されない内在性の低分子 RNA で、遺伝子発現をさまざまなかたちで調節する。ヒト遺伝子のうち 3 分の 1 もが、miRNA により制御されていると考えられている。そこで本研究では 1190 種の miRNA を含む Library を用いて nestin 発現を制御する miRNA を同定し、その miRNA が腫瘍に与える作用を検討した。

本研究で nestin の発現を制御する miRNA が明らかとなれば、癌の浸潤、転移、及び癌幹細胞性を調節する miRNA について重要な情報が得られる可能性があった。さらに本研究

によって、nestinを制御するmiRNAを同定し、それを標的とした治療法の抗腫瘍効果が証明されれば、極めて予後の悪い浸潤性膵管癌の浸潤・転移の抑制を目指した新たな治療法の開発につながる可能性があると考えられた。さらに、未だ不明な点の多いmiRNAの膵癌における役割や、nestin発現制御機序が解明され、膵癌の分子病的メカニズムの解明についても重要な情報が得られる可能性があり、その影響は広範囲に波及するものと考えられた。

2．研究の目的

膵癌、膠芽腫と悪性黒色腫では nestin は癌幹細胞に発現する、癌幹細胞マーカーとして知られている。近年、遺伝子発現を抑制する内在性の低分子 RNA である microRNA (miRNA) を、癌の治療に用いようとする試みが行われている。本研究では、nestin などを高発現する膵癌の癌幹細胞を抑制する miRNA を同定し、その抗腫瘍効果を検討することで、新たな視点からの膵癌治療戦略の可能性を明らかにする。

3．研究の方法

遺伝子発現を抑制する内在性の低分子 RNA である microRNA (miRNA) による膵癌治療法の可能性を解明する目的で、膵癌の幹細胞性に関連する miRNA の同定を試みた。現在までに 1600 種類以上のヒト miRNA precursor が報告されている。その内でも特に主要な 1190 種を含んだ Pre-miR miRNA Library (Ambion 社) を用いて、スフェア形成能を制御する miRNA のスクリーニングを行なった。スフェア形成能は、低接着性ディッシュで癌細胞を培養して浮遊しながら増殖するコロニー (スフェア) を測定する方法で、癌幹細胞を分離、同定することができる方法である。ヒト膵癌培養細胞の KLM-1 細胞と PANC-1 細胞に対して miRNA を導入し、両細胞で共通してスフェア

形成能を増加または減少させる miRNA を検討した。スフェア数の測定は Cell³Imager (Screen ホールディング社) を用いて行った。さらに、1 種類の最もスフェア形成能を促進させた miRNA について、役割をさらに検討するため miRNA 発現ベクターを PANC-1 細胞に遺伝子導入し、過剰発現細胞を作成した。miR-4254 の過剰発現 PANC-1 細胞における nanog mRNA と nestin mRNA の発現量を定量的 PCR 法により測定した。さらに、この過剰 miRNA 過剰発現膵癌細胞株を用いて、細胞増殖能、移動能への影響を *in vitro* で検討中である。

4．研究成果

KLM-1, PANC-1 の 2 種類の膵癌培養細胞においていずれの細胞においても、1.5 倍以上 sphere の形成数を増加させた miRNA は hsa-miR-4254 のみであった。また、両細胞で共通してスフェア形成を 0.66 倍以下に抑制する miRNA は 8 種類認められた。miR-4254 の過剰発現 PANC-1 細胞においては対照の PANC-1 細胞と比べ、nanog mRNA と nestin mRNA の増加がみられた。

Nestin の発現を調節し、膵癌の癌幹細胞性を制御する miRNA が存在することが明らかとなった。miR-4254 は膵癌の癌幹細胞マーカーである nestin の発現を増加させることから、新たな治療標的となることが示唆された。今後は、miR-4254 の直接の標的 mRNA の探索と、膵癌における機能解析、miR-4254 の抑制による膵癌の癌幹細胞を標的とした治療の可能性を検討する予定である。現在、miR-4254 の過剰発現 PANC-1 細胞において、細胞増殖能と遊走能について検討を行っており、今後は miR-4254 の阻害剤の効果判定も行なう計画である。

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5件)

1 . Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Yamashita S, Ushijima T, Arai T. Systemic Administration of Small Interfering RNA Targeting Human Nestin Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Pancreas*. 2016; 45: 93-100. doi: 10.1097/MPA.0000000000000427. (査読有)

2 . Matsuda Y, Yoshimura H, Ueda J, Naito Z, Korc M, Ishiwata T. Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid IL2R (null) (NOG) mice. *Am J Pathol*. 2014; 184: 674-85. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.014. (査読有)

3 . Matsuda Y, Yoshimura H, Suzuki T, Uchida E, Naito Z, Ishiwata T. Inhibition of fibroblast growth factor receptor 2 attenuates proliferation and invasion of pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2014; 105: 1212-9. doi: 10.1111/cas.12470. (査読有)

4 . Narita K, Matsuda Y, Seike M, Naito Z, Gemma A, Ishiwata T. Nestin regulates proliferation, migration, invasion and stemness of lung adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2014 Apr;44(4):1118-30. doi: 10.3892/ijo.2014.2278. (査読有)

5 . Matsuda Y, Suzuki G, Kusano T, Kawamoto Y, Yoshimura H, Fuse A, Yokota H, Naito Z, Ishiwata T. Phosphorylation of Thr(1495) of nestin in a mouse model of cerebral ischemia and reperfusion damage. *Pathol Int*. 2013; 63: 448-56. doi: 10.1111/pin.12092. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

石渡俊行、癌幹細胞と上皮間葉転換を標的とした革新的な癌治療法、第61回日本病理学会秋期特別総会、2015年11月5日、東京大学安田講堂(東京都文京区)

〔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

http://www.tmghig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/koureishagan.html

<http://www.tmig.or.jp/ereseach/a21.html>

l

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石渡 俊行 (ISHIWATA TOSHIYUKI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：90203041

(2)研究分担者

松田 陽子 (MATSUDA YOKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：20363187

松下 晃 (MATSUSHITA AKIRA)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70449263

進士 誠一 (SHINJI SEIICHI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：80409193

(3)連携研究者：なし