

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870622

研究課題名(和文)長鎖非コードRNA H19の膵癌における作用機序の解明と、標的治療に向けた研究

研究課題名(英文)Basic study of a long non-coding RNA, H19, as a novel therapeutic target for pancreatic cancer

研究代表者

吉村 久志(Yoshimura, Hisashi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：70645241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膵癌細胞PANC-1を免疫不全マウスに移植し、形成された肺転移巣由来の細胞株に発現する遺伝子をmicroarrayで調べたところ、長鎖非コードRNA H19が親株に比べて著しく高発現していた。ヒト浸潤性膵管癌では一部の症例でH19の強い発現を認め、膵管癌の分化度が低くなるのに従いH19発現率が有意に高くなった。In vitroによる実験で、H19はPANC-1細胞の遊走能や幹細胞性に関わることが明らかになった。また免疫不全マウスにおける実験的転移モデルにおいて、H19の発現を抑制したPANC-1細胞は転移能が著しく低下することが示された。H19は膵癌の新規治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Previously, we established a novel cell line derived from lung metastatic nodules developing after injection of PANC-1 human pancreatic carcinoma cells into an immunodeficient mouse. A microarray analysis showed that enhanced expression of H19 in lung metastasis derived cells compared to parental cells. In situ hybridization showed that H19 was detected in 17% of invasive ductal carcinomas and that H19 expression positively correlated with higher histological grades. Overexpression of H19 in PANC-1 cells induced higher motility and sphere formation ability whereas H19 inhibition using RNA interference technique showed opposite results. Intravenous injection of H19 knockdown PANC-1 cells yielded marked suppression of metastasis in immunodeficient mice. These findings suggest that H19 plays an important role in pancreatic cancer metastasis and H19 is a novel therapeutic target for metastasis of pancreatic cancer.

研究分野：腫瘍病理学、獣医病理学

キーワード：H19 long non-coding RNA pancreatic cancer

1. 研究開始当初の背景

DNA から mRNA が転写され、その mRNA から翻訳されたタンパク質が生命を形作るというセントラルドグマの概念が、過去 50 年に渡り生物学の中心原理として信じられてきた。そのためタンパク質をコードしていない RNA (非コード RNA) は、生物学的な役割を持たないものとみなされ、詳しく研究されてこなかった。しかし、近年のゲノム解析技術の革新的な進歩により、生体内ではかなり多くの種類と量の非コード RNA が存在することが明らかとなり、その機能が注目されるようになった(図 1)。

特に、タンパク質をコードしない 200 塩基長以上の RNA、長鎖非コード RNA (lncRNA) は、胎児発生や様々な疾患に関与するとして研究が進められている。

lncRNA の一つである H19 は、胎生期に発現がみられるが、生後まもなく発現が消失するため胎児発生に重要な役割を果たしていると考えられている。また H19 は、様々な癌組織において発現しており、膀胱癌や乳癌等では癌の進行を促進する作用を有することが知られているが、その役割や作用機序の詳細はわかっていない。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、ヒト膵癌細胞株を超免疫不全動物である NOD/Shi-scid, IL-2γnull (NOG) マウスの脾内に移植し、形成された肺転移巣から新たな細胞株を樹立し、転移巣由来株と親株の性質を比較したところ、転移巣由来株のほうが細胞遊走能や転移能が高いことが示された。転移巣由来株と親株における遺伝子発現の違いを調べるためにマイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、H19 が親株に比べて転移巣由来株において著しく高い発現を示すことを見出した。そこで本研究ではヒト膵癌組織における H19 発現率を調べるとともに、膵癌細胞における H19 の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト膵癌において H19 の発現を検証するために、外科的に切除された膵癌組織サンプルを用いて定量的 PCR により、H19 の発現状況を確認する。またパラフィン包埋組織を用いて、branched DNA 技術を用いた高感度 in situ hybridization (ISH) 法によりヒトの正常、過形成、腫瘍性膵組織における H19 の発現及び局在を検討する。さらに H19 を過剰発現させた膵癌細胞株及び発現をノックダウンした細胞株を作製し、その細胞形態、増殖、遊走、幹細胞性に及ぼす影響を検討する。さらにマイクロアレイにより H19 発現の低下に関連して変動する遺伝子を網羅的に調べる。またそれらの細胞を免疫不全マウスに移植することで、生体内における増殖能、転移能に及ぼす効果を検討する。

4. 研究成果

【ヒト膵癌検体における H19 の発現】

ヒト臨床膵癌検体において定量的 RT-PCR により癌部と非癌部の H19 発現を比較したところ、有意な差は得られなかった。そこでヒトの正常、炎症性、腫瘍性膵臓組織における H19 発現を高感度 in situ hybridization 法を用いて検出したところ、新生児の正常膵臓では腺房に強いシグナルが確認されたが、成人の膵臓では小葉内/介在部膵管でわずかな発現がみられるのみであった。一方、慢性膵炎組織の再生像を示す膵管では H19 発現の上昇がみられた。浸潤性膵管癌では一部の症例で H19 の強い発現を認め、膵管癌の分化度が低くなるのに従い H19 発現率が有意に高くなった。膵管癌の転移巣においては原発巣と比較して高頻度に H19 発現が確認された。また腺扁平上皮癌や神経内分泌癌などの他の組織型でもまれに H19 発現が認められた。

【ヒト膵癌細胞株における H19 の発現】

定量的 RT-PCR により PANC-1 細胞から作製された様々な細胞株の H19 発現レベルと調べたところ、親株である PANC-1 や、PANC-1 細胞を免疫不全マウスの皮下に接種することで形成された皮下腫瘍由来の細胞株に比べて、肺転移巣由来株(PANC-lung)は高い値を示した。同じようにヒト膵癌細胞株 PK-45H においても、親株や皮下腫瘍由来株に比べて、肺転移巣由来株の H19 発現は高値を示した。また 2 種類の正常膵管上皮由来細胞株と 9 種類のヒト膵癌細胞株の H19 発現を調べたところ、膵管細胞株に比べて 5 つの膵癌細胞株では H19 の発現が著しく高かった。

【ヒト膵癌細胞における H19 の過剰発現及びノックダウン実験】

PANC-1 細胞に H19 発現ベクターを遺伝子導入し H19 の発現レベルを上昇させたところ、コントロール細胞と比べて細胞増殖能は変わらなかったが、細胞遊走能が亢進した。幹細胞の増殖法である Sphere assay では、H19 過剰発現細胞は Sphere 形成率が高かった。一方で、PANC-1 細胞に H19 に対する short hairpin RNA を遺伝子導入し H19 発現をノックダウンさせたところ、細胞増殖能には変化がなく、細胞遊走能や Sphere 形成率は低下した。さらに、PANC-lung 細胞に H19 に対する small interfering RNA を導入し、一過性に H19 の発現を低下させたところ、やはり細胞増殖能は変わらなかったが細胞遊走能と Sphere 形成率は低下した。また PANC-1 細胞由来の Sphere 形成細胞における H19 発現は non-sphere 細胞よりも有意に高かった。

【H19 発現ノックダウン細胞の免疫不全マウス移植実験】

H19 の発現をノックダウンした PANC-1 細胞を免疫不全マウスの尾静脈から注入したところ、コントロール細胞に比べ肺転移及び肝転移形成能が著しく低いことが示された。また肝臓に H19 ノックダウン細胞を直接移植する実験においても、コントロール細胞に比べて腫瘍形成能が低いことが示された。

【H19 発現により変動する遺伝子の検出】

H19 ノックダウン細胞とコントロール細胞の遺伝子発現の違いをマイクロアレイで検出し、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software で解析したところ、細胞間相互作用や細胞形態に関わる遺伝子に変化があることが示された。長鎖非コード RNA には microRNA の前駆体として働くものがあるが、PANC-1 細胞の H19 発現を上昇あるいは低下させると miR-675-3p と miR-675-5p の発現も変動したことから、これら microRNA が作用機序に関わっていることが示唆される。

【結論】

このように長鎖非コード RNA H19 は膵癌の実験的転移巣由来の細胞株で高発現しており、膵癌細胞の遊走能や幹細胞性、転移能に関与している可能性がある。膵癌検体の一部、特に低分化な浸潤性膵管癌に発現していることから、膵癌の新しい治療標的になる可能性がある。

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3件)

Yoshimura H, Matsuda Y, Kawamoto Y, Naito Z, Ishiwata T. Simultaneous detection of different RNAs using a novel branched DNA *in situ* hybridization method. *Journal of Nippon Medical School*. 81(2):62-63, 2014.

Yoshimura H, Matsuda Y, Matsushita A, Nakamura Y, Uchida E, Ishiwata T. Multispectral imaging of pancreatic mixed acinar-neuroendocrine-ductal carcinoma with triple-immunoenzyme staining. *Journal of Nippon Medical School*. 82(3):122-123, 2015.

Yoshimura H, Matsuda Y, Yamamoto M, Kamiya S, Ishiwata T. Expression and role of long non-coding RNA H19 in carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience*. In press. 2017.

[学会発表](計7件)

Yoshimura H, Matsuda Y, Suzuki T,

Naito Z, Ishiwata T. Long non-coding RNA H19 as a novel therapeutic target for pancreatic cancer. American association for cancer research, 105th annual meeting, 2014. サンディエゴ (アメリカ合衆国)

吉村久志, 松田陽子, 村瀬めぐみ, 川原清子, 河本陽子, 鈴木妙子, 内藤善哉, 石渡俊行. 長鎖 non-coding RNA H19 の浸潤性膵管癌における発現と役割の検討. 第 103 回日本病理学会総会. 2014 年. 広島国際会議場 (広島県広島市)

吉村久志, 松田陽子, 村瀬めぐみ, 鈴木妙子, 河本陽子, 川原清子, 内藤善哉, 石渡俊行. 膵癌の遊走、転移に対する治療標的としての長鎖 non-coding RNA H19. 第 45 回日本膵臓学会大会. 2014 年. 北九州国際会議場 (福岡県北九州市)

吉村久志, 松田陽子, 内藤善哉, 石渡俊行. 生理学・生化学分科会シンポジウム「ノンコーディング RNA (ncRNA) 研究の新展開」長鎖 non-coding RNA H19 の膵癌における発現と役割. 第 157 回日本獣医学会学術集. 2014 年. 北海道大学 (北海道札幌市)

Ishiwata T, Yoshimura H, Matsuda Y, Ishikawa N, Arai T, Takubo K, Aida J. Long non-coding RNA, H19 as a novel therapeutic target for metastasis of pancreatic cancer. 第 75 回日本癌学会学術集. 2016 年. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Ishiwata T, Yoshimura H, Matsuda Y, Ishikawa N, Takubo K, Arai T, Aida J. A long non-coding RNA, H19, as a novel therapeutic target for pancreatic cancer metastasis. American Association for Cancer Research 108th Annual Meeting, 2017. ワシントン D.C. (アメリカ合衆国)

Ishiwata T, Yoshimura H, Matsuda Y, Ishikawa N, Takubo K, Arai T, Aida J. Roles of long non-coding RNA in growth and metastasis of pancreatic cancer. 第 106 回日本病理学会総会. 2017 年. 京王プラザホテル (東京都新宿区)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉村 久志 (YOSHIMURA, Hisashi)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教
研究者番号：70645241

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

石渡 俊行 (ISHIWATA, Toshiyuki)
松田 陽子 (MATSUDA, Yoko)
高橋 公正 (TAKAHASHI, Kimimasa)
道下 正貴 (MICHISHITA, Masaki)
山本 昌美 (YAMAMOTO, Masami)