

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15498

研究課題名(和文)新規人工ウイルスによるDDSとmicroRNA制御による膵癌治療の新展開

研究課題名(英文)A novel treatment of pancreatic cancer through microRNA management using a drug delivery system by artificial virus.

研究代表者

永井 英司(NAGAI, Eishi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30264021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌肝高転移株を作製し、網羅的解析から肝転移に関わるmicroRNAとしてmiR-5100を同定し、さらにその標的分子としてpodocalyxin(PODXL)を特定した。PODXLの強制発現実験、膵癌組織の免疫組織化学染色から、PODXLが膵癌の治療標的となりうる可能性を示した。また、膵癌細胞に特異的な表面抗原としてCD110を同定し、人工ウイルスを腫瘍細胞特異的に輸送する際の表面マーカーとして利用可能である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We established a highly metastatic pancreatic cancer cell line, and identified miR-5100 as a microRNA related to metastatic characteristics of pancreatic cancer. Additional experiments revealed that miR-5100 directly regulates podocalyxin (PODXL) expression, and this pathway correlates with the aggressiveness of pancreatic cancer. Immunohistochemical analysis showed high PODXL expression of tumor correlates with distant metastasis of pancreatic cancer including liver metastasis. High expression of CD110 was observed in primary tumor and liver metastatic lesion of pancreatic cancer, but not in normal pancreatic ductal epithelium. Our data suggest that CD110 may be available as a cell surface marker of pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Pancreatic cancer microRNA miR-5100 podcalyxin (PODXL) CD110



miR-5100 に相補的な配列を持つ mRNA を絞り込み、候補の中から乳がんや卵巣がん、大腸がんなどの様々なや癌腫において予後マ

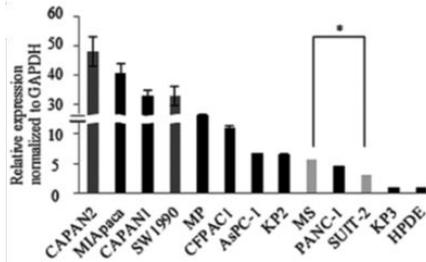


図 4. 各種癌細胞株の PODXL 発現

ーカーとして報告されている podocalyxin(PODXL)に注目した(図 3)。各種膵癌細胞株と HPDE について PODXL の発現を RT-PCR にて解析すると、各種膵癌細胞株では HPDE に比べて発現が高く、さらに MS においても SUIT-2 に比べて有意に発現が増加していることが分かった(図 4)。

PODXL の役割を調べるために膵癌細胞株 CAPAN-2 と MS において PODXL のノックダウンを行うと、miR-5100 を強制導入した時と同様

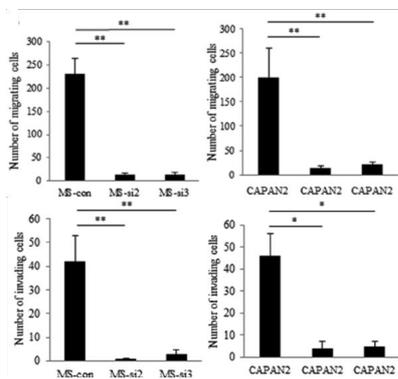


図 5. PODXL ノックダウンと遊走能(上), 浸潤能(下)

に膵癌細胞の遊走能・浸潤能が有意に低下した(図 5)。また、免疫組織化学染色を行って臨床データの解析を行ったところ、PODXL の発現と、予後や肝転移に有意な相関が見られた。以上から miR-5100 が PODXL の発現を制御することによって、膵癌の悪性度や肝転移に影響を与えていることが分かり、miR-5100 と PODXL の治療標的としての可能性を明らかにした。

### (3)ヒト膵癌組織から樹立したオルガノイドを用いた Patient derived Xenograft モデルの作製

膵癌マウスモデルにおいて、miRNA-5100 の発現を抑制する人工ウイルスの効果を評価するために、ヒト膵癌組織から癌細胞を選択的に 3D 培養技術で樹立した膵癌オルガノイドをマウスに同所移植する、Patient derived Xenograft(PDX)モデルを作製した。人工ウイルスの組織移行性を評価するために、50nm の蛍光マイクロビーズをマウス尾静脈から投与し、IVIS、蛍光実体顕微鏡を用いた観察を行ったが、検出困難であり、評価法についてはさらなる検討が必要である。

### (4)膵癌細胞に特異的な細胞表面マ

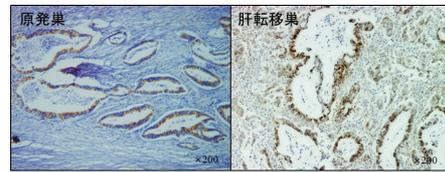


図 6. ヒト膵癌切除標本 CD110 免疫組織化学染色

### ーカーの同定

癌細胞特異的な薬剤送達を実現するために必要な、膵癌細胞表面マーカーの検討において、myeloproliferative leukemia protein (MPL)や thrombopoietin receptor (TPO-R)として知られる一型膜貫通タンパクの CD110 は、正常膵組織の膵管上皮には発現せず、膵癌原発巣と肝転移巣で発現していることがわかった(図 6)。さらに RT-P

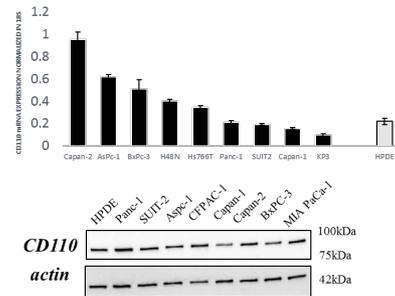


図 7. 各種癌細胞株の CD110 発現

CR、タンパク発現解析の結果から、膵癌肝高転移株では CD110 が高発現しており、CD110 発現を抑制すると、転写因子 MYC の発現が低下し、膵癌細胞の遊走能・浸潤能も有意に低下することが分かった(図 7)。免疫組織化学染色では、膵癌切除症例において、CD110 発現陽性群は陰性群よりも有意に予後不良であった。また、術後肝転移の出現についても相関性が認めら

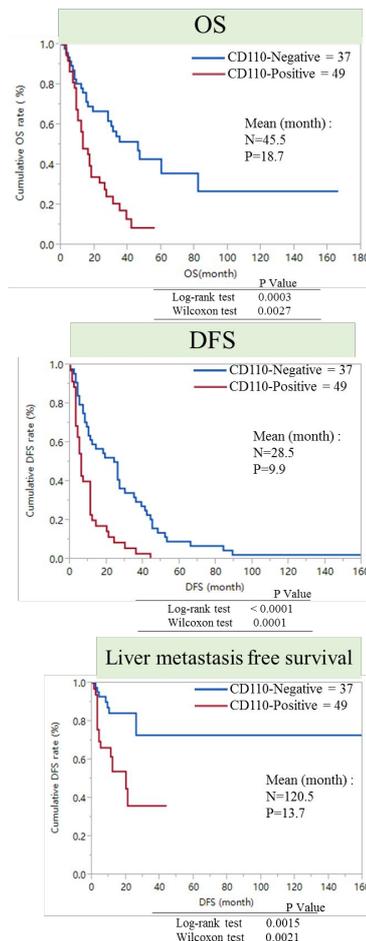


図 8. CD110 発現と OS(上), DFS(中), 肝転移(下)

れ、CD110 発現陽性群がより早く肝転移巣を形成することが分かった(図 7)。DDS の標的となる膵癌細胞特異的表面マーカーとして、また肝転移を制御する治療標的としての CD110 の可能性を明らかにした。

#### 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 4 件)

Takashi Okumura, Kenoki Ohuchida, Masafumi Sada, Toshiya Abe, Sho Endo, Kazuhiro Koikawa, Chika Iwamoto, Daisuke Miura, Yusuke Mizuuchi, Taiki Moriyama, Kohei Nakata, Yoshihiro Miyasaka, Tatsuya Manabe, Takao Ohtsuka, Eishi Nagai, Kazuhiro Mizumoto, Yoshinao Oda, Makoto Hashizume, Masafumi Nakamura.

Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells.

Oncotarget, 8(11)18280-18295, 2017, 査読有 doi:10.18632/oncotarget.15430.

Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Mizuuchi Y, Iwamoto C, Murata M, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M. Autophagy is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice.

Gastroenterology, 152(6)1492-1506, 2017, 査読有, doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.010

Sada M, Ohuchida K, Horioka K, Okumura T, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility. Cancer Letters, 372(2):210-218, 2016, 査読有, doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.016.

Chijiwa Y, Moriyama T, Ohuchida K, Nabae T, Ohtsuka T, Miyasaka Y, Fujita H, Maeyama R, Manabe T, Abe A, Mizuuchi Y, Oda Y, Mizumoto K, Nakamura M. Overexpression of microRNA-5100 decreases the aggressive phenotype of pancreatic cancer cells by targeting PODXL. Int J Oncol. 48(4):1688-700, 2016, 査読有 doi: 10.3892/ijo.2016.3389.

〔学会発表〕(計 3 件)

Koikawa K, Ohuchida K, Kibe S, Ando Y,

Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Okumura T, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Endo180 regulate phosphorylation of myosin light chain 2 activity and increase the ability of extracellular matrix remodeling in leading pancreatic stellate cells. 2016/10/27, Boston(USA)

Zilong Yan、大内田研宙、Zheng Biao、堀岡宏平、佐田政史、奥村隆志、千々岩芳朗、吉田真樹、遠藤翔、肥川和寛、阿部俊也、中山宏道、武居晋、森山大樹、宮坂義造、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、肝癌における CD110 の臨床的意義と癌進展におけるその役割、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016/4/16、大阪国際会議場(大阪市)

吉田真樹、宮坂義造、大内田研宙、遠藤翔、阿部俊也、肥川和寛、齋子龍、千々岩芳朗、奥村隆志、佐田政史、堀岡宏平、鄭彪、森山大樹、真鍋達也、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、癌と間質を同時に標的とするカルパイン阻害薬カルペプチンの膵癌に対する治療効果の検討、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016/4/14、大阪国際会議場(大阪市)

〔図書〕(計 1 件)

仲田興平、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史、膵癌における miRNA 発現と上皮間葉転換、胆と膵、36(10):1117-1122, 2015 医学図書出版

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 英司(NAGAI, Eishi)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号: 30264021

(2) 研究分担者

白羽根 健吾(SHIRAHANE, Kengo)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号: 10529803

仲田 興平(NAKATA, Kohei)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号: 30419569

(2015 年度)

宮坂 義浩 (MIYASAKA, Yoshihiro)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：40507795

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )