

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09408

研究課題名(和文) 膵癌における肝転移の分子機序の解明と新規血清バイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism and new serum biomarker about liver metastasis with pancreatic cancer patients

研究代表者

宮本 弘志 (MIYAMOTO, Hiroshi)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：90398024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌患者の癌の検体から、肝転移に關与するマイクロRNAを見出した。次に、膵癌細胞株を用いた実験で、このマイクロRNAが標的とする遺伝子を見出した。この遺伝子が膵癌細胞株において浸潤能を増強させ、その機序として上皮間葉転換(細胞の形質を変えること)を起こすこと、さらには、アポトーシス(細胞の不死化)を誘導させることで抗がん剤耐性を引き起こすことを発見した。このマイクロRNAを用いることで、膵癌の肝転移をみつけるための有用なマーカーとなる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は発見時にすでに進行しており、根治治療ができない段階で発見されるものが多く、治療成績も悪い。なかでも肝転移をきたすことが多い。そこで、膵癌において、肝転移をきたした膵癌発見の有用なマーカーになる可能性があるマイクロRNAを見出した。このマイクロRNAは血液や体液から検出することができ、繰り返し測定することも可能である。今後、膵癌が診断された際に、マイクロRNAを用いることで、肝転移の有無を早期に判断することができれば、適切な治療の選択を簡便に行うことができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：With cancer tissue acquired from pancreatic cancer patients using EUS-FNA, a micro RNA was detected regarding liver metastases. Moreover, a target gene of this micro RNA was clarified with in-vitro experiments with pancreatic cancer cell lines. This target gene increased invasion activity by induction of epithelial-mesenchymal transition and induced anti-cancer drug resistance by making pancreatic cancer cells to apoptosis. These results suggest that this micro RNA is a useful biomarker for detecting liver metastases in patients with pancreatic cancer.

研究分野：胆膵疾患の診断治療

キーワード：膵癌 マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は我が国において5番目に死亡数の多い癌である。また、最も予後の悪い癌と言っても過言ではない。その原因は、早期診断が困難なことから、診断時にすでに肝、肺、リンパ節転移や腹膜播種などが存在する進行した状態でみつかるためである。なかでも肝転移は膵癌に最も多く認める転移形式であり、その有無は膵癌の予後不良因子として重要である。一方、膵癌の肝転移に関する検討は多数行われているが、いまだに確立したバイオマーカーはない。

2. 研究の目的

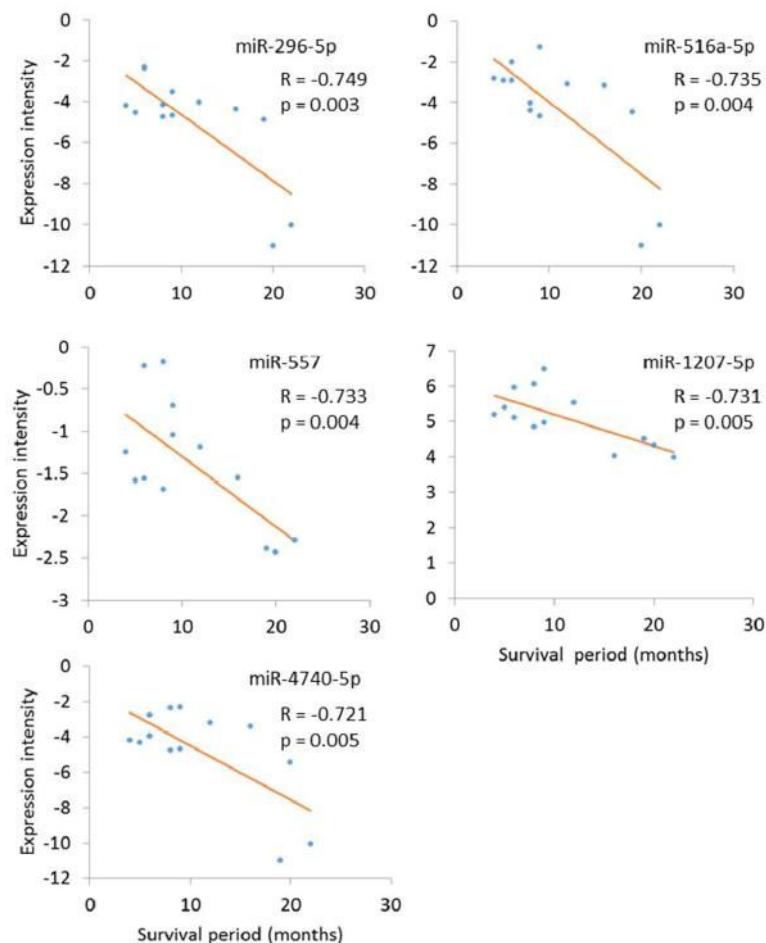
本研究では、まず肝転移陽性及び陰性膵癌を対象に、miRNA アレイ解析から得られた肝転移に関わると考えられる4つの候補miRNAのvalidationを行うとともに、IPA解析などにより標的遺伝子を検索する。次いで、培養膵癌細胞を用いてmiRNAや標的遺伝子の導入及びKnockdown (Knockout)を行い、in vitro や肝転移マウスモデルを用いたin vivo で転移浸潤能に及ぼす効果を調べることにより、膵癌肝転移の分子機序を明らかにする。さらに、肝転移診断のための膵癌血清を用いた新規バイオマーカーを同定する。

3. 研究の方法

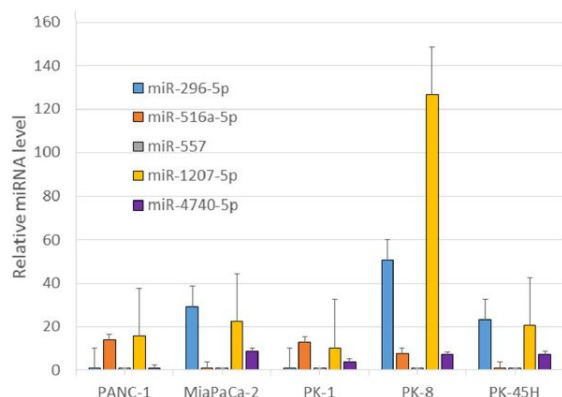
- (1)膵癌細胞株を用いて、miRNAの機能を阻害することで、浸潤・遊走能に及ぼす影響を確認する。同時にExpression Arrayによる遺伝子発現解析を行い、IPA解析などのデータベースを用いてtarget遺伝子候補を同定する。
- (2)同定した遺伝子のKO株を樹立(CRISPR Casシステムを適用)する。
- (3)膵癌肝転移モデルマウスを用いてKO株の脾臓移植により、肝転移を観察する。また、転移巣と元の膵癌細胞との比較から、膵癌肝転移の機序を解析する。
- (4)ヒト膵癌組織でのmiRNAおよびtarget遺伝子の発現をin situ hybridization、IHCにて確認する。
- (5)肝転移陽性及び陰性膵癌症例の血清のmiRNAを定量化し、膵癌肝転移の新規バイオマーカーを樹立する。

4. 研究成果

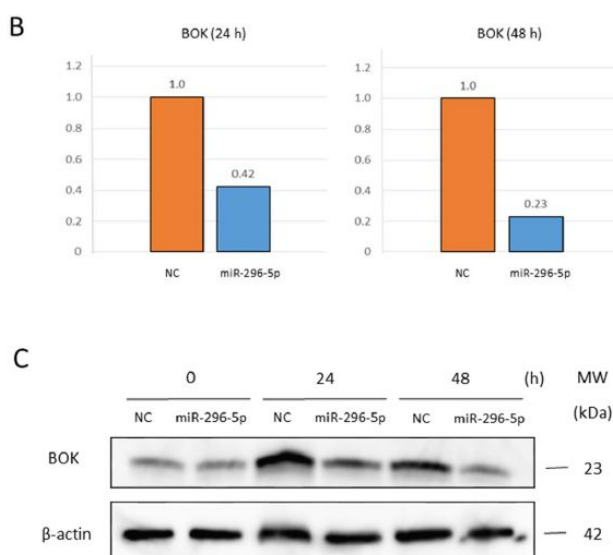
膵癌組織を使いマイクロRNAアレイを施行し、肝転移に関与するmiRNAを拾い上げた(下図)。



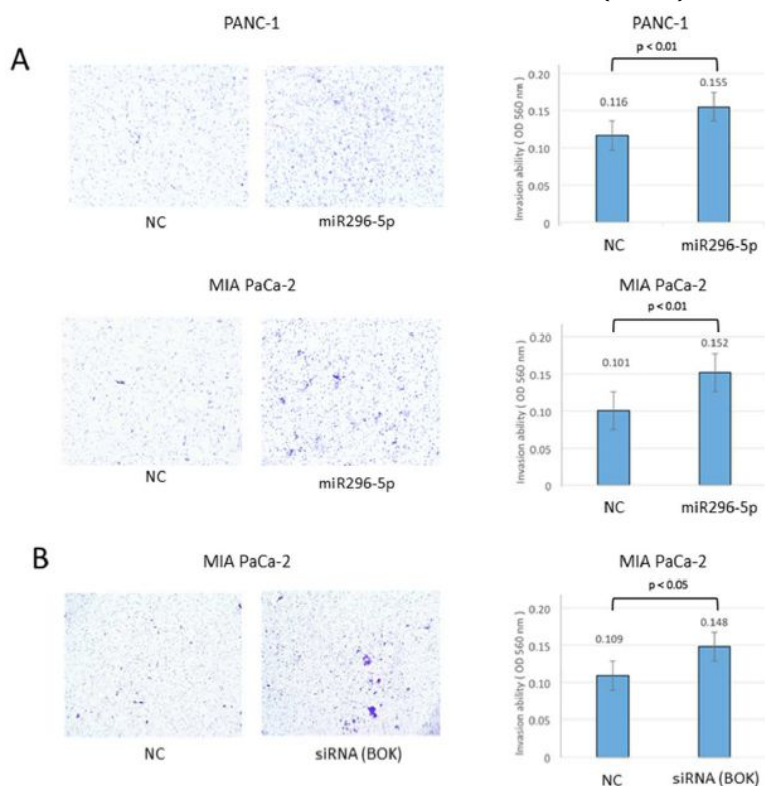
膵癌肝転移による validation を行い、膵癌細胞株での発現を検討した（下図）。



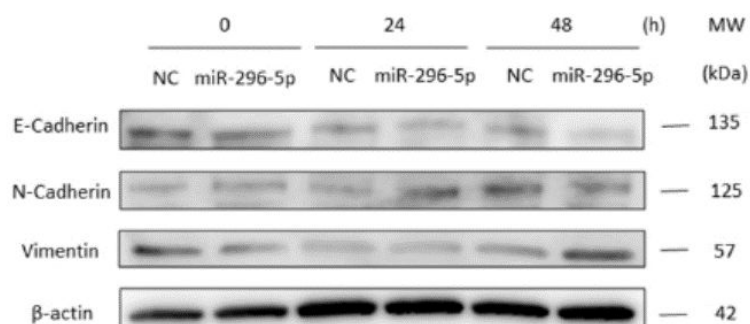
次に膵癌細胞株による in vitro 実験を行い、ターゲット遺伝子を IPA 解析などから同定した。さらに膵癌細胞株を用いた KO 実験などから、miR-296-5p およびそのターゲット遺伝子である BOK 遺伝子を同定した（下図）。



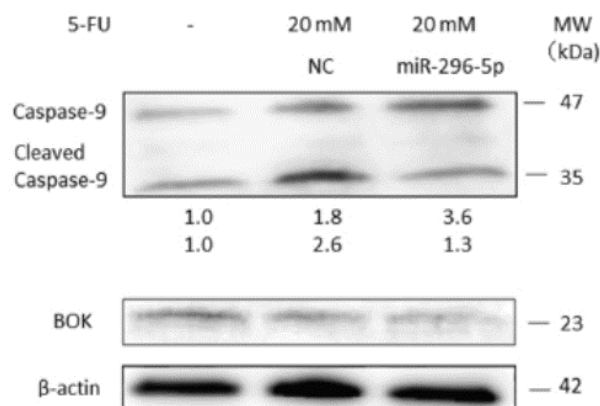
さらにこの系で膵癌浸潤能の増強（下図）をきたすことを、miR-296-5p の mimic およびそのターゲット遺伝子である BOK 遺伝子の siRNA を用いることで証明した（下図）。



また、浸潤能増強の機序として、上皮間葉転換の有無を調べ EMT を促すこと(下図)を示した。



さらに、5-FU に対する薬剤耐性をきたすこと(下図)を証明した。



これらの結果から、miR-296-5p、BOK 経路が膵癌肝転移において重要な役割を果たすこと、また miR-296-5p を用いることで肝転移のバイオマーカーになる可能性があることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 岡崎 潤, 棚橋俊仁, 高山哲治.
切除不能進行膵癌における microRNA プロファイルと肝転移、薬剤感受性及び予後の解析
予後規定因子としての miR2965p 発現の意義 .
第 104 回日本消化器病学会総会, 2018 年
- Okazaki J, Tanahashi T, Tanaka H, Okada Y, Miyamoto Y, Miyoshi J, Taniguchi T, Sato Y, Muguruma N, Takayama T.
miR-296-5p inhibits apoptosis and enhances invasion through the down-regulated BOK in unresectable pancreatic cancer.
第 77 回日本癌学会学術集会, 2018 年

〔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)研究分担者

研究分担者氏名: 高山 哲治

ローマ字氏名: TAKAYAMA, Tetsuji

所属研究機関名: 徳島大学

部局名: 医歯薬学研究部(医学域)

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 10284994

研究分担者氏名 : 岡本 耕一
ローマ字氏名 : OKAMOTO, Koichi
所属研究機関名 : 徳島大学
部局名 : 病院
職名 : 講師
研究者番号 (8 桁): 60531374

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。