

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592034

研究課題名(和文)膵臓癌における肝転移を規定する Long non coding RNAの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of function of long non-coding RNA associated with liver metastasis from pancreatic cancer

研究代表者

中原 修 (nakahara, osamu)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：40583042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： 原発巣と肝転移巣のサンプル採取。超音波内視鏡を用い切除不能膵癌患者より原発巣の組織採取を行ってprospectivelyに症例の蓄積をおこなった。採取したサンプルは-80℃にて凍結保存を行い、順次RNAの抽出を行った。抽出に関しては、RNA抽出キット(miRvana、Ambion)を用いてtotal RNAを抽出した。今後さらに症例を蓄積し、データベースの構築を行う。

リアルタイムPCRによるHOTAIRの発現の評価。当科で培養ストックしてある膵癌細胞株からRNAを抽出した。8株からRNAを抽出し、RT-PCRをおこなった。HOTAIRのプライマーを作成しcDNAを作成し、解析を行った。

研究成果の概要(英文)：1.Samples of primary lesions and liver metastasis from same patients.Pancreatic samples were retrieved from patients with unresectable pancreatic cancer at Kumamoto University Hospital.Core-needle biopsies by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration(EUS-FNA)from the center of the pancreas were immediately snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80℃.Samples of histologically-confirmed pancreatic ductal adenocarcinoma were extracted.Total RNA was prepared by RNA kit(miRvana、Ambion).Samples have been collected prospectively and the database has been made.We will also retrieve the RNA sample from liver metastasis of the same patients and analyze the expression of HOTAIR.Total RNA samples were obtained from 8 pancreatic cancer cell lines,and real-time RT-PCR was performed.Primers of HOTAIR have been made and then cDNA of them were constructed and analyzed.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 転移性肝腫瘍 HOTAIR

1. 研究開始当初の背景

膵癌は最も予後の悪い癌の一つであり、特に肝転移は重要な予後因子である(図1)。一方で、局所進行を主とした病状を呈する症例もあり、この転移のメカニズムを解明することは、全身化学療法や放射線化学療法といった治療法選択に寄与すると考えられる。

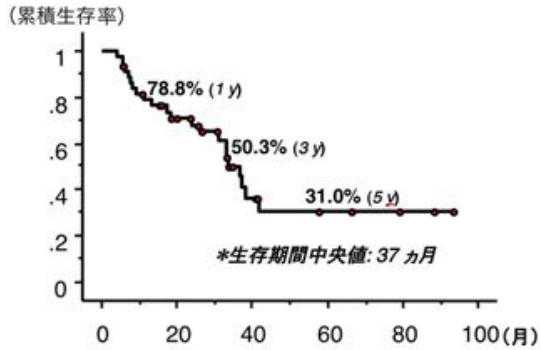


図1 膵癌の生存率

Long non-coding RNA (lncRNA) とは? (図2) lncRNA は、タンパク質をコードしない長鎖 RNA の総称であり、特定の性質をもった機能分子につけられたものではなく、様々な機能を持っている。現在までに分かっている範囲に分類すると クロマチン修飾酵素複合体に作用し Epigenetic に関与するもの。タンパクの活性、転写に関与するもの。核内に構造体を形成し RNA の splicing に関与するものに大別できる。

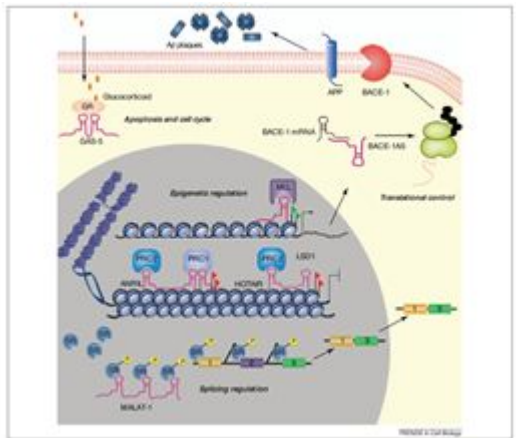


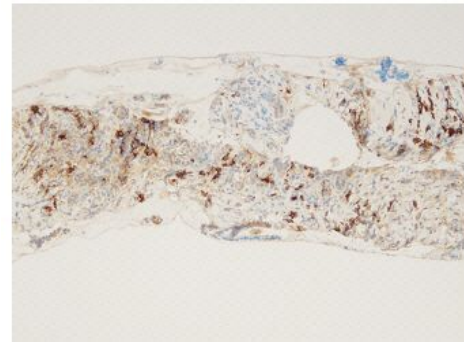
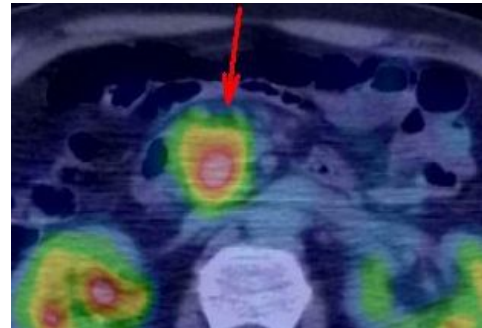
図2 Long non-coding RNA (lncRNA)

最近になって、lncRNA の機能解析の結果も徐々にではあるが報告され、大腸癌患者の予後と関連するといわれている (Kogo et al. Cancer Res. 2011)。

申請者はこれまで外科医として消化器癌、特に肝胆膵領域の診断、治療および基礎的研究をおこなってきた。

これまで、膵臓などの消化管の管腔外臓器については、その組織採取が困難であり診断は困難とされてきた。しかし、申請者は超音波内視鏡下穿刺吸引生検という技能を診断分野において活用し、その有用性を報告してきた (Nakahara et al. J Gastroenterol. 2009)。

このように、深部臓器といえども、安全、確実に組織採取が可能であり、その微量サンプルからでも RNA の抽出から免疫染色まで幅広く分子生物学的アプローチが可能である。



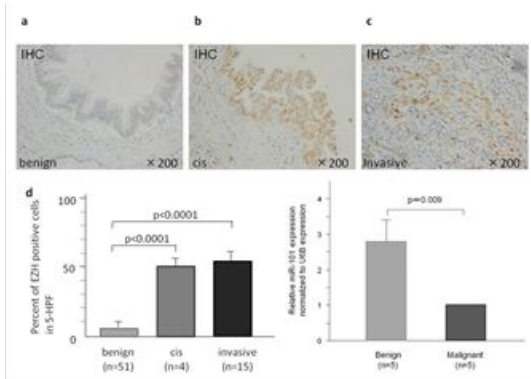
EUS-FNA により採取された膵腫瘍組織の免疫染色像

膵癌の前癌病変の一つである膵 IPMN の癌化におけるメカニズムの解明に microRNA (miR-101) の発現異常に着目し、さらに microRNA のターゲットとするポリコム蛋白 (EZH2) が関与していることを報告した (Nakahara et al. Ann Surg Oncol. 2011)。

良性病変では miR-101 の発現が保たれ EZH2 の発現は抑制されているが、悪性病変に変化するに伴い、miR-101 の発現は低下し、逆に EZH2 の発現が亢進していた。microRNA レベルおよび蛋白レベルの検討で逆相関が示され、膵癌前癌病変の膵 IPMN の悪性化に miR-101 と EZH2 が関与していることが示された。

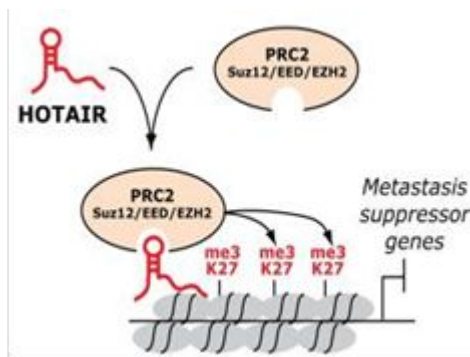
HOX 遺伝子は胚発生期において、重要なキープレーヤーであり、ゲノム上でクラスターを形成している。HOX クラスターからは 231 個の lncRNA が転写される。そのうち HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA) と名付けられた RNA は EZH2 を主とするポリコム蛋白群と結合する。

最近、HOTAIR 高発現により、ゲノムワイドなポリコム蛋白の再配置が起こり、癌転移抑制遺伝子の転写を抑制し、転移が起こることが示唆されている (Rajnish A et al. Nature 2010)。膵癌の肝転移において lncRNA (HOTAIR) が関与していることが予想される。



2. 研究の目的

われわれは、膵癌の癌発生において EZH2 が関与していることは明らかにしてきたが、転移におけるメカニズムについてはまだ明らかにできていない。そこで、膵癌の転移のメカニズムにおいて、lncRNA (HOTAIR) と EZH2 が関与していることを明らかにする。また、下流の転移抑制遺伝子についても明らかにするために本研究に着手した。



膵癌原発巣と転移巣における lncRNA の発現プロファイリングに関する検討についてはこれまで報告例がなく、膵癌の分子生物学的分野に新しい視点を与えることになる。本研究で、難治とされる膵癌の発育・進展において lncRNA の関与を明らかにすることができれば、新しい治療法の開発につながることから本研究は極めて独創的である。

3. 研究の方法

膵原発巣と肝転移巣の組織を EUS-FNA および針生検にて採取し、それぞれの検体から RNA を抽出し、cDNA を作製したのちリアルタイム PCR で HOTAIR の発現を解析した。



臨床検体を用いた検討
膵原発巣と肝転移巣のサンプル採取。

採取したサンプルは-80にて凍結保存を行い、症例が蓄積次第、RNAの抽出を行う。抽出に関しては、RNA抽出キット(miRVana®、Ambion)を用いて total RNA を抽出し、サンプルの適正な純度と量を確保することとする。また、熊本大学には切除可能膵癌の切除サンプルを凍結保存してある。これらのサンプルより同様に RNA を抽出する。これらの転移・再発などの追跡データは随時更新しており、臨床データと比較しながら、統計学的解析を行い、実際の Bench to Bed への還元が可能かどうか検討する。

Core-biopsyによる膵転移巣の組織採取



リアルタイム PCR による HOTAIR の発現の評価

リアルタイム PCR を用いて、膵原発巣と転移巣における HOTAIR の発現の比較を行う。

In Vitro での検討

HOTAIR 導入による浸潤能獲得の検討

ヒト樹立膵癌細胞株に対し vector をもちいて HOTAIR を導入し、matrix invasion による浸潤能の獲得を検証する。

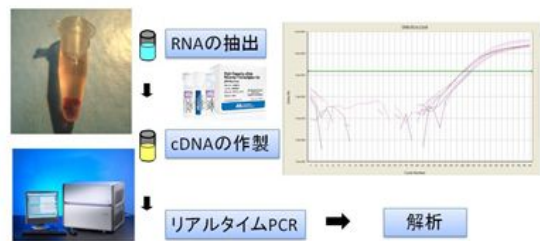
siRNA targeting HOTAIR による浸潤能低下の検討

ヒト樹立膵癌細胞株に対し siHOTAIR を導入し、matrix invasion において浸潤能が低下することを確認する。

HOTAIR のターゲット遺伝子の検索

HOTAIR のターゲット候補とされる OCT4、Sox2、Nanog などの stem cell 関連因子や CDH1 を検討する。HOTAIR の強制発現および抑制実験を行い、mRNA レベル、蛋白レベルでの発現の変化を検討する。

In Vivo での検討



Xenograft を用いた転移能の検討

平成 24 年度までの研究で明らかになった肝転移過程における lncRNA と PcG 複合体蛋白の変化から、エピジェネティクス治療の可能性を検討する。lncRNA と PcG 複合体蛋白のプロファイリングの明らかになった膵癌細胞株をヌードマウスあるいは SCID マウスに移植して、lncRNA や PcG 複合体蛋白の発現を変化させることによる病態の変化を検討する。こ

れにより、エピジェネティクス治療の臨床応用の前段階研究になると考える。

抗腫瘍薬を用いた転移能抑制の検討
Xenograft にて同所性移植ないし経門脈での肝転移が確認できた時点で、抗腫瘍薬との併用を行い、転移能の変化を検討する。
膵癌に対する、薬剤は主に 2 種類 (Gemcitabine、TS-1) であるが、近年では、上皮増殖因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害剤も市販化されている。lncRNA や PcG 複合体蛋白の発現を変化させた場合に、これらの薬剤を単剤ないし複数組み合わせた時の転移能を評価することにより、将来的なエピジェネティクス治療の可能性を探る。

研究体制

熊本大学消化器外科 馬場秀夫教授の指導のもと、中原修 (研究代表者: 熊本大学消化器外科 助教)、近本亮 (研究分担者: 熊本大学消化器外科 講師)、今井克憲 (研究分担者: 熊本大学消化器外科 医員)、新田英利 (研究分担者: 熊本大学消化器外科 医員)、大学院生らを中心に研究を進めた。

4. 研究成果

臨床検体を用いた検討

原発巣と肝転移巣のサンプル採取。
超音波内視鏡を用い切除不能膵癌患者より原発巣の組織採取を行って prospective に症例の蓄積をおこなった。採取したサンプルは -80 にて凍結保存を行い、順次 RNA の抽出を行った。抽出に関しては、RNA 抽出キット (miRVana®, Ambion) を用いて total RNA を抽出した。当初の症例では、サンプル調整の手法が安定せず、実験に使用しうるような RNA を得ることができなかった。切除可能膵癌についても、全例術前の超音波内視鏡化針生検による診断を行ってから手術をおこなっている。この切除可能患者について、術前の超音波内視鏡で採取したサンプルと、手術時に切除標本から採取したサンプルの両方から RNA 抽出を行った。手術標本からのサンプルでは安定した RNA が得られたが、術前の超音波内視鏡からのサンプルではやはり当初十分な RNA が得られなかった。しかしその後手法の見直しを行い、穿刺回数を複数回とし、採取サンプルを多くすることで最近の症例から RNA 抽出が可能となり、解析に耐えうるようになった。これにはサンプル採取の技術の向上も有ったものと思われる。現在切除不能膵癌患者は年間約 20 名が新たに来院している。今後症例を蓄積して、RNA データベースを構築し、肝転移に関わる因子の解明を引き続き行う。

リアルタイム PCR による HOTAIR の発現の評価

当科で培養ストックしてある膵癌細胞株から RNA を抽出した。8 株から RNA を抽出し、

RT-PCR を行った。HOTAIR のプライマーを作成し cDNA を作成し、現在解析を行っている。lncRNA と PcG 複合体蛋白のプロファイリングの明かになった膵癌細胞株をヌードマウスあるいは SCID マウスに移植して、lncRNA や PcG 複合体蛋白の発現を変化させることによる病態の変化を検討した。

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 6 件)

1. Kuroki H, Hayashi H, Okabe H, Hashimoto D, Takamori H, Nakahara O, Nakagawa S, Fukushima Y, Chikamoto A, Beppu T, Hirota M, Iyama K, Baba H: EZH2 Is Associated with Malignant Behavior in Pancreatic IPMN via p27Kip1 Downregulation. PLOS ONE 9(8):e100904, 2014. 査読有
2. Ikuta Y, Takamori H, Sakamoto Y, Hashimoto D, Chikamoto A, Kuroki H, Sakata K, Sakamoto K, Hayashi H, Imai K, Nitta H, Hirota M, Kanemitsu K, Beppu T, Baba H: The modified Glasgow Prognostic Score (mGPS) is a good predictor of indication for palliative bypass surgery in patients with unresectable pancreatic and biliary cancers. Int J Clin Oncol 19(4):629-33, 2014. 査読有
3. Imai K, Beppu T, Yamao T, Okabe H, Hayashi H, Nitta H, Hashimoto D, Mima K, Nakagawa S, Sakamoto K, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H: Clinicopathological and prognostic significance of preoperative serum zinc status in patients with hepatocellular carcinoma after initial hepatectomy. Ann Surg Oncol 21(12):3817-26, 2014. 査読有
4. Nakagawa S, Beppu T, Okabe H, Sakamoto K, Kuroki H, Mima K, Nitta H, Imai K, Hayashi H, Sakamoto Y, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Baba H: Triple positive tumor markers predict recurrence and survival in early stage hepatocellular carcinoma. Hepatol Res 44(9):964-74, 2014. 査読有
5. Harada K, Baba Y, Ishimoto T, Chikamoto A, Kosumi K, Hayashi H, Nitta H, Hashimoto D, Beppu T, Baba H: LINE-1 Methylation Level and Patient Prognosis in a Database of 208 Hepatocellular Carcinomas. Ann Surg Oncol 22(4):1280-7, 2015. 査読有
6. Hayashi H, Beppu T, Okabe H, Kuroki H, Nakagawa S, Imai K, Nitta H, Chikamoto

A, Ishiko T, Baba H: Functional assessment versus conventional volumetric assessment in the prediction of operative outcomes after major hepatectomy. *Surgery* 157(1):20-6, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 林 洋光、切除不能大腸癌肝転移における化学療法後 Conversion therapy の臨床的有用性と生物学、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014/4/3、京都
2. 近本 亮、膵頭部領域癌における術前減黄法と手術部位感染との関連、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014/4/4、京都、国立京都国際会館
3. HAYASHI, Hiromitsu, TAZ (WWTR1), a key transcription co-activator of hippo-pathway, promotes hepatocellular carcinoma progression via PI3K/Akt/mTOR pathway, AACR Annual Meeting 2014, 2014/4/5, San Diego, California
4. 林 洋光、肝再生抑制因子トロンボスポンディン1に対する阻害ペプチドを用いた肝再生促進療法、第 50 回日本肝臓学会総会、2014/5/29、東京、ホテルニューオータニ
5. 林 洋光、肝細胞癌進展における Hippo-pathway の転写活性化補助因子 TAZ の役割、第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014/6/12、和歌山、和歌山県民文化会館
6. 近本 亮、肝門部胆管癌非切除症例の治療成績、第 50 回日本胆道学会学術集会、2014/9/26、東京、グランドプリンスホテル新高輪
7. 近本 亮、膵神経内分泌腫瘍肝転移に対する治療成績、JDDW2014 第 22 回日本消化器関連学会週間(第 12 回日本消化器外科学会大会)、2014/10/25、神戸、神戸国際展示場

〔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：
出願年月日：
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

中原 修 (NAKAHARA, osamu)
熊本大学医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：40583042

(2) 研究分担者

近本 亮 (CHIKAMOTO, akira)
熊本大学医学部附属病院・講師
研究者番号：10419640

今井 克憲 (IMAI, katsunori)
熊本大学医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：60555746

林 洋光 (HAYASHI, hiromitsu)
熊本大学大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：80625773

新田 英利 (NITTA, hidetoshi)
熊本大学医学部附属病院・助教
研究者番号：90555749