

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08346

研究課題名(和文) 膵癌における浸潤・転移抑制に関与する BART 発現機序の解析と診断治療への応用

研究課題名(英文) Molecular and immunohistochemical analysis of BART expression controlling the inhibition to pancreatic cancer invasion and metastasis

研究代表者

降幡 睦夫 (FURIHATA, Mutsuo)

高知大学・教育研究部医療学系連携医学部門・教授

研究者番号：10209158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵管癌細胞においてRNA結合蛋白-mRNA複合体候補が何種類か存在し、膵管癌細胞における、運動・浸潤時に必須の葉状仮足において、RNA結合蛋白と結合した特定mRNAの発現調節機構が存在し、膵管癌細胞の浸潤・転移能に大きな影響を与え得る結果を示してきた。今回は浸潤性膵管癌症例を対象とし、目的とする関連蛋白としてVar3、PODXL、CCDC88をとり上げ、同蛋白がmRNA複合体候補に結合することを示した。さらに進行膵管癌での臨床病理学的諸因子や予後との検討を行い、それぞれ独立した膵癌進展を促進させる候補マーカーとして、臨床応用が可能となり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that mRNA-binding protein-bound transcripts accumulate in membrane protrusions of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells, and the formation of additional membrane protrusions increased the invasive and metastatic properties of the PDAC cells. In the course of this investigation, we picked up the three mRNA-binding proteins; Var3, PODXL and CCDC88, and demonstrated that these candidate markers were accumulated in cell protrusions, contributed to the formation of membrane protrusions, and increased the migration and invasiveness of PDAC cells. In contrast, knockdown of each of them inhibited the motility and invasiveness of PDAC. Immunohistochemistry leveled that high expression of these proteins was an independent predictor of worse overall survival of pancreatic cancer patients. Our studies suggest that they can be a useful marker for predicting the outcome of patients with PDAC and thereby increased the motility and invasiveness of PDAC.

研究分野：基礎医学・人体病理学

キーワード：膵癌 浸潤転移 RNA結合蛋白 RNA結合蛋白RNA 免疫組織化学

### 1. 研究開始当初の背景

原則として取り扱う膵管癌を、膵癌取り扱い規約(第6版補訂版)に基づく乳頭腺癌、管状腺癌、低分化腺癌の3つの浸潤性膵管癌とするが、比較材料として、上皮内癌症例及び浸潤性膵管癌に付随した上皮内癌病変も取り扱い症例及び材料に含める。平成27年度以前における高知大学医学部病理学教室及び医学部附属病院に関連した膵管癌の、生検及び手術症例を把握集計し、組織型、進達度、リンパ節転移及び遠隔転移の有無等の、臨床病理学的諸因子に関する基本的な統計学的解析を行う。

### 2. 研究の目的

膵癌細胞における浸潤転移制御因子として同定した、RNA結合蛋白に結合する mRNA (binder of Arl Two : BART) の発現産物及び膵管癌細胞における、運動・浸潤時に必須の細胞先端構造物である葉状仮足において、RNA結合蛋白と結合した特定 mRNA の発現調節機構が存在し、膵癌細胞の浸潤・転移能に大きな影響を与え得ることを外科症例(材料)にて確認する。さらに BART mRNA も含め、その他 RNA 結合蛋白及びその結合 mRNA 由来蛋白に対する抗体を用いて、膵管癌症例で免疫組織化学的検討を行い、浸潤進達度・遠隔転移等の臨床病理学的諸因子との関連や、多変量解析による検討を行い、RNA 結合蛋白及び結合する mRNA の発現が、特に進行膵管癌での臨床病理学的評価因子となり得るか検討し、膵管癌術後治療方針決定にも応用可能な病理診断の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

ヒト膵癌細胞株 S2-013 細胞は、ファイブロネクチン上で培養することにより葉状仮足形成を促進する事が知られている。RIP アッセイと次世代シーケンサーを用いた遺伝子オントロジー解析により得られた結合 mRNA 候補に対する siRNA を、ファイブロネクチン上で培養する S2-013 細胞に pGFP-V-RS ベクターを用いて細胞内導入し、結合 mRNA 候補の発現抑制を確認後、MTT アッセイにより細胞増殖能保持を確かめる。更に Wound-healing motility アッセイ、Trans-well motility アッセイ、Two-chamber invasion アッセイにより、結合 mRNA 候補に対する siRNA を導入された同細胞において、ファイブロネクチン上での進展増殖抑制や、葉状仮足形成抑制及び細胞形態の円形から楕円形化と言った抑制効果を確認し、結合 mRNA 候補を評価検討する。膵管癌生検及び手術材料の病理組織標本を用い、BART、その他の結合 mRNA 由

来蛋白や、RNA 結合蛋白に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行う。膵管癌手術症例に関しては、これら蛋白発現と、組織型、進達度、リンパ節及び遠隔転移の有無等の臨床病理学的諸因子と患者予後との関連を、多変量解析を主体に統計学的に病態解析し、これら蛋白発現動態が、特に浸潤転移を呈する進行性膵管癌における、術後の治療方針決定にも応用可能となり得る病理組織診断の確立を検討する。免疫組織化学的染色に関しては Ventana 社の自動免疫染色装置 Ventana automated IHC system を使用し、染色の効率化及び染色性の均一化を図る。

### 4. 研究成果

我々は膵管癌細胞においても、神経細胞同様に RNA 結合蛋白-mRNA 複合体候補が何種類か存在している可能性があり、膵管癌細胞における、運動・浸潤時に必須の細胞先端構造物である葉状仮足において、RNA 結合蛋白と結合した特定 mRNA の発現調節機構が存在し、膵癌細胞の浸潤・転移能に大きな影響を与え得る結果を示してきた。そして、膵管癌材料として乳頭腺癌、管状腺癌、低分化腺癌の3つの浸潤性膵管癌症例を対象とし、平成27~29年度高知大学医学部病理学教室及び医学部附属病院に関連した膵管癌の生検及び手術症例を把握集計し、組織型、進達度、リンパ節転移及び遠隔転移の有無等の臨床病理学的諸因子に関する基本的な統計学的解析を行った。目的とする関連蛋白としては、検討の末 Var3、PODXL、CCDC88 に着目し、その発現に関しては、膵管癌における発現を分子生物学的及び免疫組織科学的に検討し、浸潤進達度・遠隔転移等の臨床病理学的諸因子との関連や多変量解析による検討を行い、特に進行膵管癌での臨床病理学的評価因子となり得るか検討し、それぞれ独立した膵癌進展を促進させる候補マーカーとして、臨床応用が可能となり得ることを示した。

### 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 12件)

Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Pan B, Xu K, Furihata M, Nakamura K, Yurimoto H, Sakai Y, Honda G, Yokoyama A : The fifth epidermal growth factor-like region of thrombomodulin exerts cytoprotective function and prevents SOS in a murine model.

*Bone Marrow Transplant.* 52(1):73-79, 2017, 査読有  
doi: 10.1038/bmt.2016.195.

Okada T, Kurabayashi A, Akimitsu N, Furihata M : Expression of Cadherin-17 Promotes Metastasis in a Highly Bone Marrow Metastatic Murine Breast Cancer Model.

*Biomed Res Int.* 8494286, 2017, 査読有  
doi: 10.1155/2017/8494286.

Tamura K, Furihata M, Satake H, Hashida H, Kawada C, Osakabe H, Fukuhara H, Kumagai N, Iiyama T, Shuin T, Inoue K : SHISA2 enhances the aggressive phenotype in prostate cancer through the regulation of WNT5A expression.

*Oncol Lett.* 14(6):6650-6658, 2017, 査読有  
doi: 10.3892/ol.2017.7099.

Tsuboi M, Taniuchi K, Furihata M, Naganuma S, Kimura M, Watanabe R, Shimizu T, Saito M, Dabanaka K, Hanazaki K, Saibara T : Vav3 is linked to poor prognosis of pancreatic cancers and promotes the motility and invasiveness of pancreatic cancer cells.

*Pancreatology.* 16(5):905-16, 2016, 査読有  
doi: 10.1016/j.pan.2016.07.002

Taniuchi K, Furihata M, Naganuma S, Dabanaka K, Hanazaki K, Saibara T : Podocalyxin-like protein, linked to poor prognosis of pancreatic cancers, promotes cell invasion by binding to gelsolin.

*Cancer Sci.* 107(10):1430-1442, 2016, 査読有  
doi: 10.1111/cas.13018.

Tanouchi A, Taniuchi K, Furihata M, Naganuma S, Dabanaka K, Kimura M, Watanabe R, Kohsaki T, Shimizu T, Saito M, Hanazaki K, Saibara T : CCDC88A, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes the motility and invasiveness of pancreatic cancer cells.

*J Exp Cl in Cancer Res.* 35(1):190, 2016, 査読有

doi:10.1186/s13046-016-0466-0

Taniuchi K, Furihata M, Hanazaki K, Iwasaki S, Tanaka K, Shimizu T, Saito M, Saibara T : Peroxiredoxin 1 promotes pancreatic cancer cell invasion by modulating p38 MAPK activity.

*Pancreas.* 44(2):331-340, 2015, 査読有  
doi: 10.1097/MPA.0000000000000270

Memtily N, Okada T, Ebihara T, Sato M, Kurabayashi A, Furihata M, Suga M, Nishiyama H, Mio K, Sato C : Observation of tissues in open aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy: Applicability to intraoperative cancer diagnosis.

*Int J Oncol.* 46(5):1872-82, 2015, 査読有  
doi: 10.3892/ijo.2015.2905.

Kurabayashi A, Inoue K, Fukuhara H, Karashima T, Fukata S, Kawada C, Shuin T, Furihata M : Combination with third-generation bisphosphonate (YM529) and interferon-alpha can inhibit the progression of established bone renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 106(8):1092-9, 2015, 査読有  
doi: 10.1111/cas.12711.

Fukuhara H, Inoue K, Kurabayashi A, Furihata M, Shuin T : Performance of 5-aminolevulinic-acid-based photodynamic diagnosis for radical prostatectomy.

*BMC Urol.* 15:78, 2015, 査読有  
doi: 10.1186/s12894-015-0073-y.

Wei S, Fukuhara H, Kawada C, Kurabayashi A, Furihata M, Ogura S, Inoue K, Shuin T : Silencing of ATPase Inhibitory Factor 1 Inhibits Cell Growth via Cell Cycle Arrest in Bladder Cancer.

*Pathobiology.* 82(5):224-32, 2015, 査読有  
doi: 10.1159/000439027

Taniuchi K, Ookawauchi K, Kumon K, Sumiyoshi T, Iwata J, Furihata M, Nakamura T, Uchiumi J : Intramucosal Signet Ring Cell Gastric Cancer Diagnosed 15 Months after the Initial Endoscopic Examination.

*Case Rep Med.* 2015:479625, 2015, 査読有  
doi: 10.1155/2015/479625.

[学会発表](計 9件)

倉林 睦, 田中千遥, 松本和花, 長沼誠二, 降幡睦夫: Hindlimb IR effects on glucose metabolism in the hepatocytes via a brain-liver neurocircuit, 第106回日本病理学会総会, 東京, 2017

倉林 睦, 田中千遥, 松本和花, 長沼誠二, 降幡睦夫, 柿沼由彦: 後肢虚血 再灌流刺激の肝糖代謝への影響と中枢神経を介したそのメカニズム, 第60回日

本糖尿病学会年次学術集会，名古屋，2017

長沼誠二，喜多芳明，中川 裕，北川博之，倉林 睦，田中千遥，松本和花，花崎和弘，夏越祥次，降幡睦夫：食道扁平上皮癌浸潤部における Notch1 の核内発現は生命予後不良の予測因子となりうる，第 35 回日本ヒト細胞学会学術集会，種子島，2017

田中千遥，倉林 睦，松本和花，長沼誠二，弘井 誠，村上一郎，降幡睦夫：生体肝移植後に発症した大脳原発リンパ腫の一例，第 106 回日本病理学会総会，東京，2017

池田一岐，長沼誠二，倉林 睦，村上一郎，降幡睦夫：著明な静脈の変化を伴った静脈硬化性大腸炎の一例，第 106 回日本病理学会総会，東京，2017

倉林 睦，黒江崇史，降幡睦夫：後肢虚血 - 再還流モデルにおける糖代謝への影響，第 104 回日本病理学会総会，名古屋，2015

井上啓史，福原秀雄，執印太郎，倉林睦，降幡睦夫，津田雅之，藤田洋史，内海耕慥，佐々木順造，小淵浩嗣，間久直，粟津邦男，岩月幸一，石井琢也，北嶋勇也，石塚昌宏：膀胱 photodynamic therapy. 膀胱癌に対する局所療法，第 1 回日本泌尿器癌局所療法研究会，京都，2015

北嶋勇也，石井琢也，山内視嗣，村上清隆，井上克司，白銀玲，太田麗，井上啓史，福原秀雄，津田雅之，倉林睦，降幡睦夫，執印太郎，間久直，岩月幸一，粟津邦男，石塚昌宏，田中徹：In Vitro における緑色光を用いた ALA-PDT の有効性評価．第 5 回ポルフィリン ALA 学会年会，東京，2015

石井琢也，北嶋勇也，山内視嗣，村上清隆，井上克司，白銀玲，太田麗，井上啓史，福原秀雄，津田雅之，倉林睦，降幡睦夫，執印太郎，間久直，岩月幸一，粟津邦男，石塚昌宏，田中徹：5-アミノレブリン酸を用いた光線力学的療法における緑色光の有効性と光源開発，第 5 回ポルフィリン ALA 学会年会，東京，2015

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

降幡 睦夫 (FURIHATA, Mutsuo)

高知大学・教育研究部医療学系連携医学部  
門・教授

研究者番号：10209158

### (2) 研究分担者

谷内 恵介 (TANIUCHI, Keisuke)

高知大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号：50626869

岩崎 信二 (IWASAKI, Shinji)

高知大学・教育研究部医療系臨床医学部  
門・准教授

研究者番号：10232654