

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19046

研究課題名(和文) 膵発癌における分化異常とmiRNA制御不安定性の関連解析

研究課題名(英文) Abnormal differentiation and instability of microRNA regulation in pancreatic carcinogenesis

研究代表者

田中 麻理子(Tanaka, Mariko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：50645710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は膵発がん時の分化異常(胃上皮分化)に着目し、胃上皮細胞接着分子CLDN18と転写因子EV11の高発現、EV11-miRNA96-KRAS axisを同定し、膵発がん過程の解明をこれまで進めてきた。これに基づき本研究では、膵発がんのbiologicalな背景の解明をEV11を軸に行い、発がん促進サイクルの一つとしてEV11-miRNA96-Glypican-1 axisを同定した。また、膵がん細胞と膵前がん細胞のmiRNA発現の比較により、発がん時に包括的変動を示すmiRNA群の解析を進める基盤を作った。本研究の成果は、未解明な部分の多い膵発がん過程を明らかにする重要な結果である。

研究成果の概要(英文)：I previously revealed the importance of claudin-18 and EV11 in pancreatic carcinogenesis and identified the EV11-miRNA96-KRAS axis. Based on our results, I tried to reveal the molecular mechanism to promote pancreatic carcinogenesis with a central focus on EV11 and microRNA. Consequently, I revealed that EV11 promote pancreatic carcinogenesis by a new pathway, EV11-miRNA96-Glypican1. I also built a basis for miRNA expression profile of pancreatic cancer cells and preneoplastic pancreatic cancer cells. These results are important to shed light on unsolved pancreatic carcinogenesis.

研究分野：病理

キーワード：膵がん EV11 microRNA 発がん

1. 研究開始当初の背景

膵癌は本邦がん死因の第4位を占める予後不良疾患で、最多の組織型は浸潤性膵管癌で、前癌病変には PanIN、intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN)、mucinous cystic neoplasm (MCN) があり、形態・遺伝子異常に基づく多段階発癌モデルが受け入れられている。driver mutation は KRAS、CDKN2A/p16、SMAD4/DPC4、p53 で、膵癌内の genomic heterogeneity や進展時の clonal evolution も報告され (Yachida. *Nature* 2010) 膵癌の横断的遺伝子変異解析は近年飛躍的に進歩したが、発癌早期や多段階発癌期の経時的なメカニズムについては未だ不透明な部分が多い。

発癌早期では、膵管上皮が胃上皮への分化異常を示すことが知られており (Prasad. *Cancer Res* 2005) これまでに申請者は分化異常に注目し、胃上皮細胞間接着分子 claudin-18 (CLDN18) および胃上皮形質と発現相関を示す転写因子 Ecotropic virus integration 1 site (EVII) が前癌病変から浸潤癌まで広く高発現すること、EVII が miRNA-96 を介して KRAS 発現を正に制御し膵発癌を促進することを見出した (*Oncogene* 2014, 図1)。これは、近年、KRAS 変異のみならず KRAS/KRAS 下流経路の活性化レベルの維持が膵癌発癌・進展に必須あるという報告を支持し (Ji. *Gastroenterology* 2009) low-grade PanIN での KRAS 変異率が 30% 程度であるにも関わらず PanIN という形態変化が生ずる機序を理解する一助になる。申請者は EVII 分子を軸に、発がん促進ネットワークの描出を目的に研究を進めた。

ゲノム変異以外に形態変化・分化異常をもたらす原因としてエピゲノム異常が考えられ、申請者は miRNA に注目した。ヒト遺伝子の 30% は miRNA 制御下にあると言われ (Rajewsky. *Nat Genet.* 2006) 各種の癌にて miRNA 発現異常が報告されており、各個の miRNA が oncogene (oncomiR) や tumor suppressor (anti-oncomiR) として機能することが理解されている (Cheng. *Cancer J.* 2012)。個々の miRNA の機能が注目される一方、経時的切り口からは、例えば microsatellite-stable 大腸直腸癌での adenoma-carcinoma sequence に沿った miRNA の複雑な発現変動の報告がある (Bartley. *Clin Cancer Res.* 2011)。膵癌では

前癌病変から浸潤癌までの miRNA 発現プロファイルが報告されているが、oncomiR、anti-oncomiR の発現推移を包括的にとらえる報告は未だなされていない。申請者は膵発がんにおける経時的な miRNA 発現変動の描出を目的に研究を進めた。

2. 研究の目的

EVII 発現がもたらす膵発がん促進機構の描出、ならびに膵発がん過程の miRNA 発現変動の包括的理解を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 膵がんおよび前がん病変における GPC1 発現: 膵がん早期マーカーとして近年報告された glypican-1 (GPC1) (Melo. *Nature* 2015) に着目し、東京大学医学部附属病院の膵腫瘍外科切除症例 (膵がん 311 例、PanIN 23 例、IPMN 136 例、MCN 12 例、acinar cell carcinoma 5 例、solid-papillary neoplasm 8 例、神経内分泌腫瘍 17 例) に対し、whole slide あるいは Tissue Micro Array (TMA) を作成し免疫組織化学的に GPC1 発現を検討した。
- (2) 膵がん細胞における GPC1 の腫瘍促進能: GPC1 に対する siRNA を培養細胞に導入し、細胞増殖能評価、wound healing assay、マイクロアレイ解析を行った。
- (3) 膵がん細胞における EVII による GPC1 発現の修飾: 定量的 RT-PCR と western blotting により GPC1 発現変動を検討した。
- (4) 膵がんにおける EVII-GPC1 ネットワークの描出: EVII の GPC1 制御機構について、文献的検討及び結合予測プログラムから EVII 下流でかつ GPC1 プロモーター領域に結合する miRNA を絞り込み、定量的 RT-PCR で検証した。
- (5) 膵発がん過程の miRNA 発現変動: 膵管上皮細胞および膵癌細胞の miRNA マイクロアレイ解析を行い、文献的考察を加えてデータ解析を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト膵腫瘍における GPC1 過剰発現: ヒト非腫瘍性膵、膵前がん病変、膵管がんの免疫組織学的検討から、GPC1 は正常の形態を維持した膵管上皮に発現しない一方、多くの膵前がん病変および浸潤がんでは発現が確認された (図1)。発現亜型としては胃型、胆膵型、oncocytic 型に多く、腸型に少なかった。膵がん早期の血清マーカーとして有用である、という報告を裏付ける結果を得た。

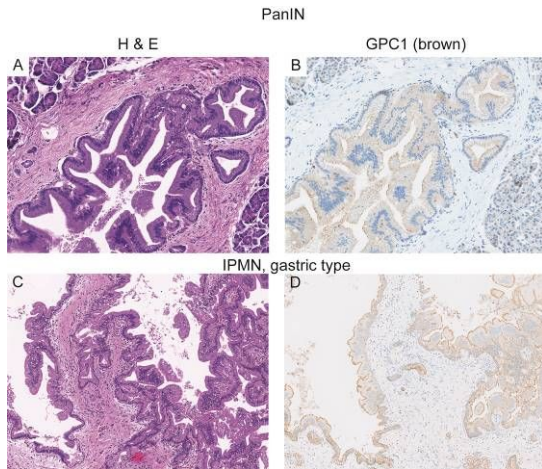


図1 膵前がん病変における GPC1 発現

(2) GPC1 発現と EVI1 発現の比較および KRAS 変異状態との関連：IPMN 検体では、GPC1 と EVI1 の発現に相関が認められた。また、GPC1 発現群の全例で KRAS 変異が検出されたが、GPC1 発現陰性群でも KRAS 変異を有するものがみられた。GPC1 陰性 KRAS 変異陽性の症例は全例腸型 IPMN であった。このことから、必ずしも KRAS 変異が GPC1 発現を誘導する 1 対 1 対応の上流ではないことが示唆された。

(3) 膵がんにおける GPC1 の機能解析：siRNA を用いた GPC1 発現抑制により、増殖能、移動能の低下が見られ、マイクロアレイ解析により、細胞周期関連分子が大きく動くことが見出され、この結果は real time PCR にて裏付けられた。

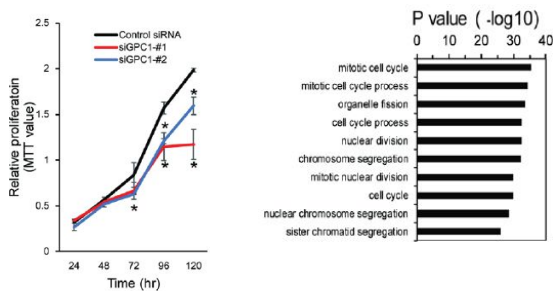


図2 膵癌細胞における GPC1 発現抑制による増殖能抑制 (左, PK8 細胞) とマイクロアレイデータの GO 解析 (右, PK45H 細胞)

(4) EVI1/miRNA96 による GPC1 発現制御

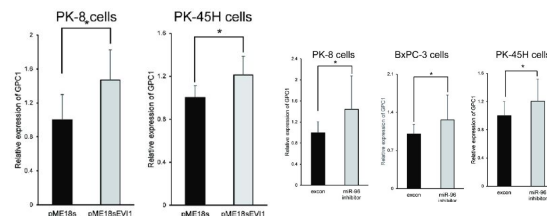


図3 膵癌細胞における EVI1 過剰発現による GPC1 発現上昇 (左) と miRNA96 発現阻害による GPC1 発現上昇 (右) siRNA における EVI1 発現抑制、プラスミド

により EVI1 過剰発現により、EVI1 は GPC1 を正に制御していることが分かった。また結合予測プログラムなどから同定した miRNA96 の発現変動に一致して GPC1 発現が変化することが明らかになった。以上の結果から、EVI1 を中心とした膵発がん促進機構の一つとして miR96-GPC1 経路を同定することができ (図4) 未解明な部分の多い膵発がん過程の解明の一助となった。

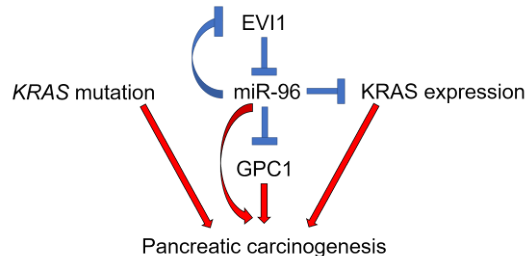


図4 EVI1-miR96-GPC1 axis

(5) miRNA 発現変動：細胞株のマイクロアレイ解析によりデータを得た。前がん段階のモデルとして不死化した膵管上皮細胞と使い、膵がん細胞と照らし合わせることで、包括的な挙動を示す miRNA 群の導出を現在行っている。

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26件)

全て査読あり

1. Pancreatic Lipomatous Hamartoma: A Hitherto Unrecognized Variant. Tanaka M, Ushiku T, Ikemura M, Takazawa Y, Igari T, Shimizu M, Yamaguchi H, Fukushima N, Sakuma K, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Watadani T, Nakai Y, Koike K, Fukayama M. *Am J Surg Pathol.* 2018 May 4. doi: 10.1097/PAS.0000000000001075. [Epub ahead of print]
2. Contrast-enhanced intraoperative ultrasound in the resection of colorectal liver metastases with intrabiliary growth. Hiroyoshi J, Yamashita S, Tanaka M, Hayashi A, Ushiku T, Kaneko J, Akamatsu N, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K. *Clin J Gastroenterol.* 2018

- Apr 9. doi: 10.1007/s12328-018-0858-0. [Epub ahead of print]
3. A 19-Gauge Histology Needle Versus a 19-Gauge Standard Needle in Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration for Solid Lesions: A Multicenter Randomized Comparison Study (GREATER Study). Iwashita T, Nakai Y, Mukai T, Togawa O, Matsubara S, Hatano Y, Hara A, Tanaka M, Shibahara J, Fukayama M, Isayama H, Yasuda I. *Dig Dis Sci*. 2018 Apr;63(4):1043-1051.
 4. CPT2 downregulation adapts HCC to lipid-rich environment and promotes carcinogenesis via acylcarnitine accumulation in obesity. Fujiwara N, Nakagawa H, Enooku K, Kudo Y, Hayata Y, Nakatsuka T, Tanaka Y, Tateishi R, Hikiba Y, Misumi K, Tanaka M, Hayashi A, Shibahara J, Fukayama M, Arita J, Hasegawa K, Hirschfield H, Hoshida Y, Hirata Y, Otsuka M, Tateishi K, Koike K. *Gut*. 2018 Feb 6. pii: gutjnl-2017-315193. doi: 10.1136/gutjnl-2017-315193.
 5. EVI1 modulates oncogenic role of GPC1 in pancreatic carcinogenesis. Tanaka M, Ishikawa S, Ushiku T, Morikawa T, Isagawa T, Yamagishi M, Yamamoto H, Katoh H, Takeshita K, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Fukayama M. *Oncotarget*. 2017 Sep 1;8(59):99552-99566. doi: 10.18632/oncotarget.20601. eCollection 2017 Nov 21.
 6. Intraductal papillary neoplasm originating from an anomalous bile duct. Maki H, Aoki T, Ishizawa T, Tanaka M, et al. *Clin J Gastroenterol*. 2017;10(2):174-178.
 7. Correct Diagnosis of Wild-Type Transthyretin-Related Amyloidosis Followed by the Introduction of a Novel Therapy in a Patient With Cardiac Wall Thickening of Unknown Cause. Sawada N, Nakayama A, Takahashi M, Tanaka M, et al. *Int Heart J*. 2017;7;58(1):147-150.
 8. CASTIN: a system for comprehensive analysis of cancer-stromal interactome. Komura D, Isagawa T, Kishi K, Suzuki R, Sato R, Tanaka M, et al. *BMC Genomics*. 2016;9;17(1):899.
 9. Small colorectal cancers resembling submucosal tumor with massive submucosal invasion and lymph node metastasis: A report of two cases and review of the literature. Shinagawa T, Ishihara S, Nozawa H, Muroto K, Nishikawa T, Otani K, Sasaki K, Yasuda K, Tanaka T, Kiyomatsu T, Hata K, Kawai K, Yamaguchi H, Hayashi A, Tanaka M, et al. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2017 Mar;41(2):e19-e23.
 10. Stromal remodeling by the BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses the progression of human pancreatic cancer. Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Hoshikawa M, Tanaka M, et al. *Oncotarget*. 2016;20;7(38):61469-61484.
 11. Safety of Regular-Dose Imatinib Therapy in Patients with Gastrointestinal Stromal Tumors Undergoing Dialysis. Niikura R, Serizawa T, Yamada A, Yoshida S, Tanaka M, et al. *Case Rep Gastroenterol*. 2016;19;10(1):17-23.
 12. Intracranial Infantile Myofibromatosis Mimicking Malignant Brain Tumor: A Case Report and Literature Review.

- Inoue M, Tanaka S, Nakatomi H, Takayanagi S, Takahashi M, Tanaka M, et al. *World Neurosurg.* 2016;93:487.e15-20.
13. Randomized trial comparing a side-port needle and standard needle for EUS-guided histology of pancreatic lesions. Ishiwatari H, Hayashi T, Kawakami H, Isayama H, Hisai H, Itoi T, Ono M, Kawakubo K, Yamamoto N, Tanaka M, et al. *Gastrointest Endosc.* 2016;84(4):670-8.
 14. Effect of a stylet on a histological specimen in EUS-guided fine-needle tissue acquisition by using 22-gauge needles: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial. Abe Y, Kawakami H, Oba K, Hayashi T, Yasuda I, Mukai T, Isayama H, Ishiwatari H, Doi S, Nakashima M, Yamamoto N, Kuwatani M, Mitsunashi T, Hasegawa T, Hirose Y, Yamada T, Tanaka M, et al. *Gastrointest Endosc.* 2015;82(5):837-844.e1.
 15. Platelet-derived growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, imatinib, is effective for treating pulmonary hypertension induced by pulmonary tumor thrombotic microangiopathy. Minatsuki S, Miura I, Yao A, Abe H, Muraoka H, Tanaka M, et al. *Int Heart J.* 2015;56(2):245-8.
 16. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, et al. *Nat Genet.* 2014 ;46(12):1267-73.
 17. Acoustic Radiation Force Impulse Imaging of the Pancreas for Estimation of Pathologic Fibrosis and Risk of Postoperative Pancreatic Fistula. Harada N, Ishizawa T, Inoue Y, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Tanaka M, et al. *J Am Coll Surg.* 2014;pii:S1072-7515(14)01542-7.
 18. Esophageal adenocarcinoma arising in cervical inlet patch with synchronous Barrett's esophagus-related dysplasia. Tanaka M, et al. *Pathol Int.* 2014;64(8):397-401.
 19. A R0 resection case of initially unresectable metastatic pancreatic cancer downstaged by FOLFIRINOX therapy. Sasaki T, Isayama H, Aoki T, Tanaka M, et al. *Pancreas.* 2014;43(6):972-4.
 20. Slow pull versus suction in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of pancreatic solid masses. Nakai Y, Isayama H, Chang KJ, Yamamoto N, Hamada T, Uchino R, Mizuno S, Miyabayashi K, Yamamoto K, Kawakubo K, Kogure H, Sasaki T, Hirano K, Tanaka M, et al. *Dig Dis Sci.* 2014;59(7):1578-85.
 21. EVI1 oncogene promotes KRAS pathway through suppression of microRNA-96 in pancreatic carcinogenesis. Tanaka M, et al. *Oncogene.* 2014;8;33(19):2454-63.
 22. Claudin-18 overexpression in intestinal-type mucinous borderline tumour of the ovary. Halimi SA, Maeda

- D, Shinozaki-Ushiku A, Koso T,
Matsusaka K, Tanaka M, et al.
Histopathology. 2013;63(4):534-44.
23. Expression levels of adiponectin
receptors are decreased in human
endometrial adenocarcinoma tissues.
Yamauchi N, Takazawa Y, Maeda D,
Hibiya T, Tanaka M, et al. *Int J Gynecol
Pathol*. 2012;31(4):352-7.
24. Claudin-18 is an early-stage marker of
pancreatic carcinogenesis. Tanaka M, et
al. *J Histochem Cytochem*.
2011;59(10):942-52.
25. Claudin-18 in biliary neoplasms. Its
significance in the classification of
intrahepatic cholangiocarcinoma.
Shinozaki A, Shibahara J, Noda N,
Tanaka M, et al. *Virchows Arch*.
2011;459(1):73-80.
26. Intraductal oncocytic papillary neoplasm
of the bile duct: clinicopathologic and
immunohistochemical characteristics of 6
cases. Tanaka M, et al *Hum Pathol*.
2009;40(11):1543-52.

〔学会発表〕(計3件)

第106回日本病理学会総会 東京

2017年4月27日~29日

田中麻理子、深山正久

「EVI1 modulates oncogenic role of GPC1 in
pancreatic carcinogenesis」

山内直子、田中麻理子

「剖検症例の膵臓病変に関する臨床病理学的
検討」

石川俊平、加藤洋人、田中麻理子

「治療標的探索のためのがん-間質細胞間
相互作用解析システム」

〔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：
取得年月日：

〔その他〕
ホームページ等

<http://pathol.umin.ac.jp/index.shtml>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 麻理子 (TANAKA, Mariko)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50645710

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

深山 正久 (Fukayama, Masashi)

石川 俊平 (Ishikawa, Shumpei)

加藤 洋人 (Katoh, Hiroto)

砂河 孝行 (Isagawa, Takayuki)

山本 浩之 (Yamamoto, Hiroyuki)

阿部 淳 (Abe, Jun)

山岸 誠 (Yamagishi, Makoto)

長谷川 潔 (Hasegawa, Kiyoshi)

有田 淳一 (Arita, Junichi)

阪本 良弘 (Sakamoto, Yoshihiro)

國土 貴嗣 (Kokudo, Takashi)