

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19303

研究課題名(和文)細胞外小胞体EVを介した長鎖機能性RNAによる膵癌進展制御機構の解明

研究課題名(英文)EV mediated transfer of long non-coding RNA in pancreatic cancer development

研究代表者

高橋 賢治 (Takahashi, Kenji)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：00736332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖機能性RNA(lncRNA)は細胞外小胞(EV)を介して細胞間伝達されるRNAであるが、膵癌との関連報告は乏しい。EVは体液中を循環し、EV内RNAの発現変化は疾患のバイオマーカーとして有用である。我々は膵癌浸潤、転移に重要な上皮間葉形質転換(EMT)に寄与するlncRNAを同定し、EVを介したEMT制御機構と、膵癌早期診断のマーカーとしての有用性を検討した。HULCはEMT促進を介し、膵癌細胞の浸潤、遊走能を増強させる一方で、miR-133bはHULCの発現抑制を介してEMTを抑制する事を同定した。血清EV中HULCは、膵癌診断における新規マーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：TGF- $\beta$  induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a trigger of invasion and metastasis in pancreatic cancer (PDAC). De-regulated expression of long non-coding RNAs (lncRNAs) has been reported to be correlated with several diseases. However, their roles to EMT in PDAC remain unclear. Some lncRNAs are transferred by extracellular vesicles (EVs). Although EV-encapsulated lncRNAs have been reported to serve as biomarkers for cancers, there is only a handful information regarding "EV lncRNA".

We investigated EV mediated transfer of lncRNA in PDAC. We identified lncRNA HULC is increased in PDAC cells and their EVs. HULC could promote cell invasion and migration via induction of EMT through transfer by EVs. Moreover, miR-133b could target HULC and attenuate cell invasion and migration via suppression of EMT. Furthermore, EV encapsulated HULC derived from PDAC patient serum would be a useful biomarker for human PDAC.

研究分野：胆道学、膵臓学

キーワード：膵癌 長鎖機能性RNA 細胞外小胞 上皮間葉形質転換

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は、発生過程において、K-ras や p53 などの遺伝子変異の蓄積を伴い、多段階発癌のプロセスを辿る。その過程で上皮細胞が細胞接着能、極性等の性質を失い、間葉系細胞へと形質転換する上皮間葉形質転換 (Epithelial Mesenchymal Transition; EMT) という現象が、膵癌の悪性形質の獲得、特に浸潤、転移に大きく関わっている事が知られている。従って、膵癌における EMT の機序ならびに EMT を介した癌浸潤、転移のメカニズムを明らかにすることは、膵癌治療成績を向上させる突破口となる可能性が高いと考えられる。

Long non-coding RNA (長鎖機能性 RNA; lncRNA) は、タンパク質をコードしない、200塩基以上の機能性 RNA の総称であるが、近年その機能が徐々に明らかになりつつある。我々は、これまで複数の lncRNA が、肝癌の進展に関わることを報告してきた (J Cell Sci 2014, FEBS Open Bio 2014, Mol Cancer Res 2014)。例えば linc-RoR は肝癌における抗癌剤、低酸素抵抗性に寄与するなど、lncRNA が多彩なメカニズムで消化器癌の病態に密接に関わる事を示した。膵癌においては、HOTAIR、H19、PPP3CB、MAPK3K14 など、少数の lncRNA の発現が報告されているが、膵癌浸潤、転移のプロセスにおける、lncRNA の役割については解明されていない。最近、他の癌において HOTAIR や lncRNA-ATB と EMT との関連が報告されており、膵癌においても EMT の制御に lncRNA が密接に関わる可能性が高い。よって、EMT を制御する lncRNA を同定することは、膵癌における EMT 機序の解明のブレイクスルーとなる可能性を秘めると考えられる。

Non-coding RNA の細胞間情報伝達媒体として、近年、細胞外小胞 (Extracellular vesicle; EV) が注目されている。EV は、癌細胞を

はじめ多くの細胞から分泌され、RNA やタンパク質を含有し、それらの情報を細胞間伝達する役割を担っている (図 1)。例えば、microRNA(miRNA) は、その多くが EV に含まれており、EV 分泌細胞 (ドナー細胞) から EV を受け入れる細胞 (レシピエント細胞) へと運搬され、シグナル伝達や生存能に影響を与える事がわかっている (Kogure et al. Genes Cancer 2013, Kogure et al. Hepatology 2011)。一方、lncRNA については我々が、linc-RoR と linc-VLDLR が肝癌細胞から分泌される EV により運搬され、レシピエント細胞内でのストレス抵抗性と生存能に寄与する事を報告しているが (J Cell Sci 2014, FEBS Open Bio 2014, Mol Cancer Res 2014)、膵癌細胞における EV による lncRNA 輸送のメカニズムとその役割については未解明な部分が多い。よって膵癌における EV を介した EMT 関連 lncRNA の情報伝達様式を明らかにする事は、膵癌進展にかかわる細胞間情報伝達のこれまでにないモデルを提唱すると共に、膵癌治療標的の探索に全く新たな切り口を提供する可能性が高いとの考えに至った。

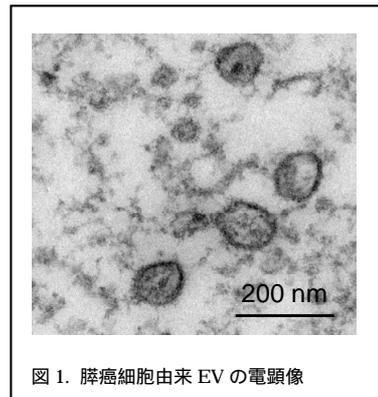


図 1. 膵癌細胞由来 EV の電顕像

## 2. 研究の目的

本研究は、膵癌浸潤、転移に重要なプロセスである EMT に寄与する新規 lncRNA を同定し、その核酸本体としての EMT 制御機構と EV を介した情報伝達機構を解明する事を目的とするものである。更に患者検体を用いた解析により lncRNA の膵癌新規バイオマーカーとして有用性について検証した。

### 3. 研究の方法

膵癌細胞(Panc-1)とそれらから分泌されるEVに高発現するlncRNAをqRT-PCR法を用いたlncRNA profilingによって発現解析した。同時にEMT促進サイトカインであるTGF-βの投与により膵癌細胞、EVに誘導されるlncRNAを分析した。

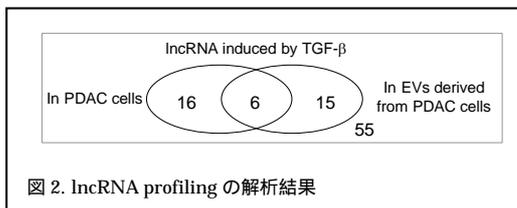
同定したlncRNAが膵癌細胞における浸潤、遊走能に与える影響をTranswell assay及びWound healing assayにて解析した。また、EMT関連遺伝子に与える影響についてqRT-PCR法、Western blot法を用いて解析した。

同定したlncRNAを標的とし、EMTを抑制的に制御するmiRNAの同定をmicroarrayを用いて試みた。また、同定したmiRNAの膵癌細胞浸潤、遊走能に与える影響を解析した。

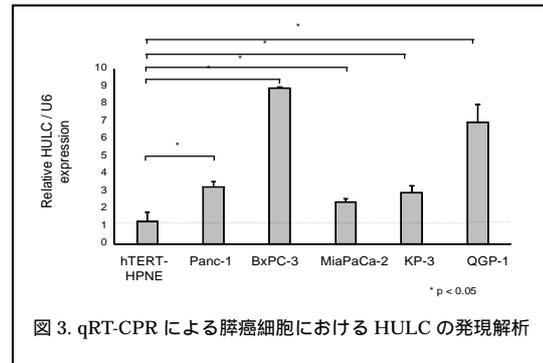
膵癌患者、IPMN患者、健常者各15名より血清を採取し、血清EV中におけるlncRNAの発現変化をdigital PCRを用いて検討した。

### 4. 研究成果

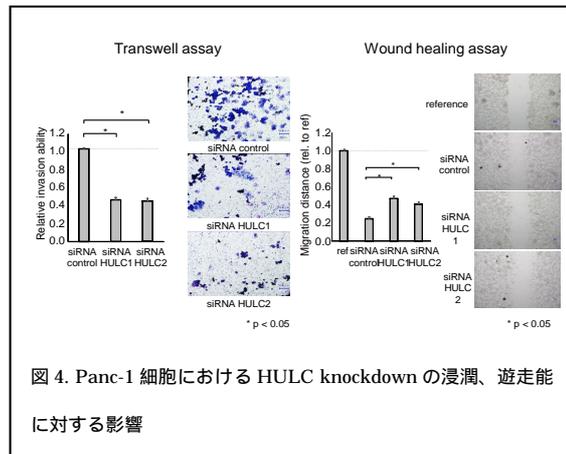
(1) 90種類のlncRNAの発現についてprofilingを行い、膵癌細胞(Panc-1)とEVに高発現し、TGF-βによって更に発現誘導されるEMT促進lncRNAの候補として、HULC (highly up-regulated in liver cancer)を含め6つのlncRNAを同定した(図2)。



(2) HULCは正常膵管上皮細胞hTERT-HPNEに比べ、5種類の膵癌細胞株で高レベルに発現した(図3)。



(3) siRNAを用いたHULCのノックダウンによって、膵癌細胞Panc-1におけるEMT経路抑制を経て、浸潤、遊走能は有意に低下した(図4)。以上の結果から、HULCは膵癌細胞におけるEMT促進を介し、浸潤、遊走能を増強させるoncogenic lncRNAである可能性が示唆された。



(4) MiRNA microarrayと、Target Scanなどを利用したバイオインフォマティクス解析を用い、HULCを標的とし、膵癌細胞におけるEMTを抑制的に制御する候補miRNAとして、miR-133bを同定した。

MiR mimicを用いたmiR-133bの強制発現により、HULCの発現は有意に低下する事を確認した(図5)。

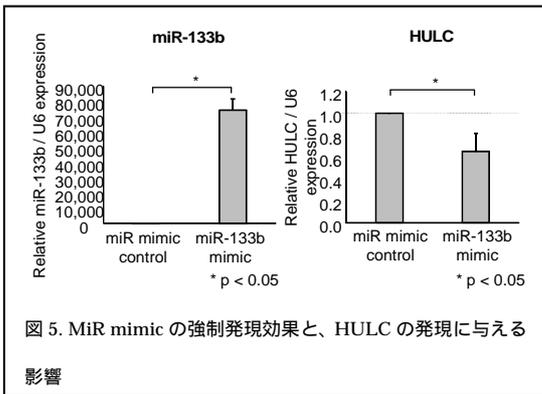


図 5. MiR mimic の強制発現効果と、HULC の発現に与える影響

(5) MiR-133b の強制発現により、膵癌細胞 Panc-1 における EMT 経路は抑制的に制御され、浸潤、遊走能は有意に低下した (図 6)。この結果から、miR-133b は HULC の抑制を介し、EMT 経路の阻害を経て、膵癌細胞の浸潤、遊走能を減弱する、癌抑制性 miRNA である事が示唆された。

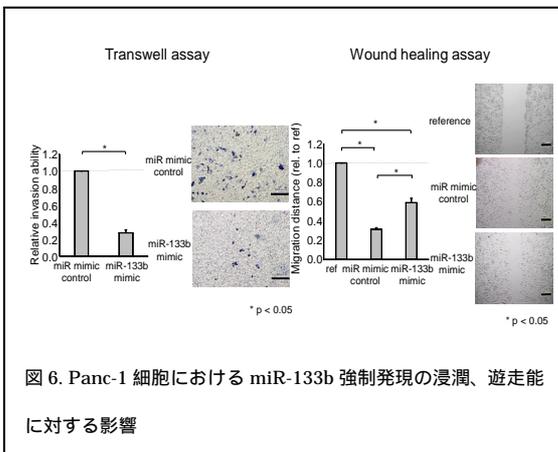


図 6. Panc-1 細胞における miR-133b 強制発現の浸潤、遊走能に対する影響

(6) 膵癌患者、分子型 IPMN 患者、健常ボランティア各 15 名より血清を採取し、血清中 EV を抽出。EV 中 HULC の発現変化を digital PCR を用いて解析し、膵癌新規バイオマーカーとしての有用性について検討した。

膵癌患者における血清 EV HULC の発現は健常者、IPMN 患者双方と比べて有意に上昇しており、EV HULC は新たな膵癌バイオマーカーとなり得る可能性が示唆された (図 7)。

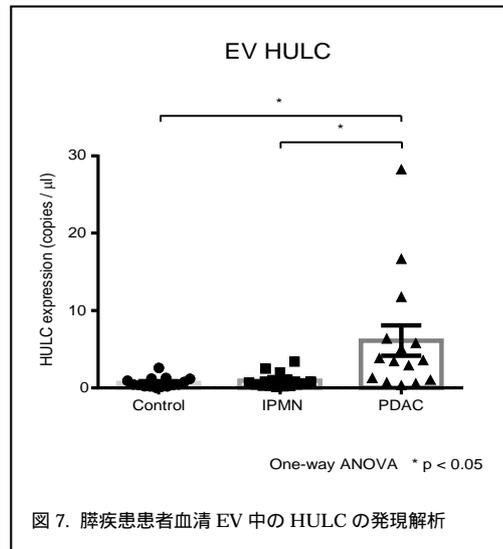


図 7. 膵癌患者血清 EV 中の HULC の発現解析

膵癌細胞において、lncRNA HULC は、EMT 経路促進を経て、浸潤、遊走能を増強する働きを有する事を同定した。また、miR-133b は HULC の発現抑制を介し、膵癌細胞の EMT 阻害を経て、浸潤、遊走能を減弱させる事を同定した。更に、膵癌患者血清中 EV HULC は、膵癌診断における新たなバイオマーカーとなり得る可能性が考えられた。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Kenji Takahashi, Yu Ota, Hidetaka Iwamoto, Keisuke Yamakita, Yohei Kitano, Yuichi Makino, Long Non-coding RNA HULC Derived From Circulating Extracellular Vesicles Would Correlate With Tumor Invasion and Metastasis in Patients With Pancreatic Cancer, The 48th Annual Meeting of American Pancreatic Association, 2017 年 11 月 11 日, San Diego (USA)

(2) Kenji Takahashi, Yu Ota, Yuko Suzuki, Hidetaka Iwamoto, Keisuke Yamakita, Yohei Kitano, Yuichi Makino、microRNA-622 inhibits epithelial mesenchymal transition by targeting long non-coding RNA HULC in human pancreatic cancer、United European Gastroenterology Week 2016、2016年10月17日、Vienna (Austria)

(3) Kenji Takahashi, Yu Ota, Yuko Suzuki, Hidetaka Iwamoto, Keisuke Yamakita, Yohei Kitano, Yuichi Makino and Masakazu Haneda、microRNA-133b mediates epithelial-mesenchymal transition via regulation of extracellular vesicle long non-coding RNA HULC in human pancreatic cancer、The 47th annual meeting of the Japan Pancreas Society (JPS) & The 20th meeting of the International Association of Pancreatology (IAP) & The 6th meeting of the Asian Oceanic Pancreatic Association (AOPA)、2016年8月4日、仙台

(4) 高橋賢治、太田雄、鈴木裕子、岩本英孝、山北圭介、北野陽平、牧野雄一、羽田勝計、長鎖機能性 RNA HULC による細胞外小胞 EV を介した膵癌進展制御機構の検討、第46回日本膵臓学会大会、名古屋国際会議場、2015年6月20日、名古屋

〔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)研究代表者

高橋 賢治 (TAKAHASHI, Kenji)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：00736332