

令和元年5月17日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08659

研究課題名(和文) 高悪性度膵管癌におけるNectin3関連miRNAの同定と新規診断・治療への応用

研究課題名(英文) Identification of Nectin-3-related miRNAs in high-grade pancreatic ductal carcinoma and their novel application to diagnosis and treatment

研究代表者

平林 健一 (HIRABAYSHI, Kenichi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：60514388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Nectin-3の発現を制御するmiRNAの発現とその意義を膵管癌を対象として検討した。マイクロアレイによる網羅的解析により、2個のmiRNAがNectin-3-knockdown細胞で有意に発現亢進していることが明らかになった。そのうち1個のmiRNAがNectin-3の発現を抑制することを確認した。更に切除された膵管癌およびpancreatic intraepithelial neoplasiaを対象としたin situ hybridizationでは、Nectin-3関連miRNAが膵管癌の全生存期間の短縮や発癌に関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞間接着分子の一つであるNectin-3の発現と制御に関わるmiRNAを膵管癌細胞で同定した。更にin situ hybridizationを用いた検討では、Nectin-3関連miRNAが膵管癌の発癌や全生存期間の短縮に関わることを示唆された。本研究の成果は、Nectin-3関連miRNAを対象とした膵管癌の新規バイオマーカーや治療法の開発への発展が期待され、学術的・社会的に意義あるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the expression of a miRNA controlling Nectin-3 expression, and its significance in pancreatic ductal carcinoma. Comprehensive analysis by microarray revealed that two miRNAs were significantly upregulated in Nectin-3-knockdown cells. We confirmed that one of these miRNAs suppressed expression of Nectin-3. Furthermore, in situ hybridization in tissues resected from pancreatic cancer and pancreatic intraepithelial neoplasia suggested that the Nectin-3-related miRNA is associated with shorter overall survival and carcinogenesis of pancreatic ductal carcinoma.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵臓 膵管癌 Nectin-3 miRNA 細胞接着分子

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

1. 研究開始当初の背景

膵管癌は膵管上皮から発生する極めて予後不良の腫瘍で5年生存率は僅か10%弱である。既存の治療法では十分な予後の改善は困難で、新規バイオマーカーや治療法の開発が求められている。NectinはCa²⁺非依存性の細胞間接着分子で、E-cadherinと相互に作用し接着結合を形成している。NectinにはNectin-1、-2、-3、-4の4つのsubtypeがあり、様々な腫瘍で浸潤転移や予後に関連することが報告されている¹。我々はこれまでNectin-3発現消失膵管癌は予後不良であることを報告している²。

miRNAは18-25塩基程のnon-coding RNAで、mRNAに結合することにより細胞周期、代謝、老化などに関連する多くの遺伝子やタンパク質の発現を制御している。miRNAは正常組織と腫瘍組織では発現量や種類が異なり、血液や尿などに分泌されるmiRNAは新たな疾患バイオマーカーとして期待されている。また、細胞機能を抑制するというmiRNAの働きを活かした、miRNA創薬の研究も行われている³。しかしながら、Nectin-3の発現や機能を制御するmiRNAは不明な点が多く十分な検討は行われていない。

我々のこれまでの研究結果からは、Nectin-3発現消失膵管癌は特に高悪性度で、既存の治療に抵抗性があることが示唆される²。Nectin-3は膵管癌の高悪性化に関与する重要な分子と考えられるが、Nectin-3を制御するmiRNAは報告されていない。そこで本研究では、miRNAの網羅的解析により、Nectin-3の発現や機能を制御するmiRNAを明らかにすることを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高悪性度膵管癌におけるNectin-3関連miRNAの発現と機能を解明することである。Nectin-3関連miRNAの発現と機能を明らかにすることにより、Nectin-3関連miRNAを対象とした新規バイオマーカーと治療法を開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) miRNAマイクロアレイによる網羅的解析

siRNA法を用い膵癌細胞株(MiaPaCa2, BxPC3, Panc1)のNectin-3発現をknockdown(KD)させた。Nectin-3-KD細胞およびnegative control(NC)細胞よりmiRNAを含む全RNAを抽出し、miRNAマイクロアレイにより網羅的解析した。Nectin-3-KD細胞とNC細胞でのmiRNAの発現を比較することで、Nectin-3関連miRNAを絞り込んだ。

次に、網羅的解析で同定したmiRNAに模したmiRNA mimicを膵癌細胞に導入しmiRNAを過剰発現させた。miRNA過剰発現細胞とNC細胞間でのNectin-3の発現をRT-PCR、western blottingで比較することで、網羅的解析で同定したmiRNAが実際にNectin-3の発現に影響するか検証した。

(2) 切除検体を用いたNectin-3関連miRNAに対する*in situ* hybridization (ISH)

91例の浸潤性膵管癌および前癌病変と考えられるpancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN, low-grade: 29例、high-grade: 32例)の切除検体を対象として、(1)で同定したNectin-3関連miRNAの発現をISHにより解析した。また、ISHの結果と臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析した。

(3) Nectin-3関連miRNAの化学療法薬に及ぼす影響の検討

Nectin-3関連miRNA過剰発現細胞、NC細胞に対しGemcitabineを添加し細胞障害能の違いを検討した。

4. 研究成果

(1) miRNAマイクロアレイによる網羅的解析

マイクロアレイによる網羅的解析の結果、NC細胞と比べNectin3-KD細胞では30個のmiRNAが2倍以上発現亢進していた。統計学的解析の結果、その内2個のmiRNAがNC細胞よりもNectin-3-KD細胞で有意に発現亢進していることを同定した。さらに、マイクロアレイで同定した2個のmiRNAうち1個のmiRNAがNectin-3の発現を抑制することを確認した。

(2) 切除検体を用いたNectin-3関連miRNAに対するISH

正常膵管にNectin-3関連miRNAの発現は認められなかった。Nectin-3関連miRNAは、low-grade PanINでは34%(10例)に陽性、high-grade PanINでは63%(20例)に陽性、浸潤性膵管癌では73%(66例)に陽性であった。

統計学的解析では、浸潤性膵管癌とhigh grade PanINはlow-grade PanINと比較し有意にNectin-3関連miRNAが高発現していた。一方、high-grade PanINと浸潤性膵管癌ではNectin-3関連miRNAの発現に有意差はみられなかった。

臨床病理学的因子との関連では、Nectin-3関連miRNA陽性症例は、UICC第8版のpT3因子、pN2因子、Stage IIA-IV、全生存期間の短縮に有意に関連していた。

以上の結果からは、Nectin-3関連miRNAの発現は浸潤性膵管癌の局所浸潤やリンパ節転移、生存期間の短縮に関連することが示唆された。また、Nectin-3関連miRNAの発現は、low-grade PanIN、high-grade PanIN、浸潤性膵管癌となるにつれ陽性率が高くなった。この結果からは膵

管癌の発癌や悪性化に Nectin-3 関連 miRNA が関与することが示唆された。以上の結果からは、Nectin-3 関連 miRNA が膵管癌の発癌や悪性化に関与することが示唆された。

(3) Nectin-3 関連 miRNA の化学療法薬に及ぼす影響の検討

Gemcitabine を添加した Nectin-3 関連 miRNA 過剰発現膵癌細胞と NC 細胞では細胞生存率に有意差はみられなかった。

<引用文献>

1. Derycke MS, Pambuccian SE, Gilks CB, et al. Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol* 2010;134:835-45.2.
2. Izumi H, Hirabayashi K, Nakamura N, Nakagohri T. Nectin expression in pancreatic adenocarcinoma: nectin-3 is associated with a poor prognosis. *Surg Today* 2015;45:487-94.
3. Di Leva G, Briskin D, Croce CM. MicroRNA in cancer: new hopes for antineoplastic chemotherapy. *Ups J Med Sci* 2012;117:202-16.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

1. Toyosaki M, Onizuka M, Amaki J, Shiraiwa S, Aoyama Y, Machida S, Kawai H, Murayama H, Ogiya D, Matsui K, Kawakami S, Harada K, Kondo Y, Hirabayashi K, et al. Primary CNS post-transplant lymphoproliferative disorder following haplo-identical HSCT using post-transplant high-dose cyclophosphamide. *Blood Cell Therapy* 2019;2. 査読有り
2. Amato E, Mafficini A, Hirabayashi K, et al. Molecular alterations associated with metastases of solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas. *J Pathol* 2019;247:123-34. 査読有り
3. Yamada M, Hirabayashi K, Kawanishi A, et al. Nectin-1 expression in cancer-associated fibroblasts is a predictor of poor prognosis for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surg Today* 2018;48:510-6. 査読有り
4. Masuoka Y, Furukawa D, Yazawa N, Izumi H, Yamada M, Mashiko T, Saito G, Okada K, Tanaka A, Suzuki T, Sadahiro S, Hirabayashi K, Nakagohri T. Rectal Neuroendocrine Tumor with Synchronous Pancreatic Metastasis: A Case Report. *Tokai J Exp Clin Med* 2018;43:38-44. 査読有り
5. Kawashima Y, Kawaguchi Y, Kawanishi A, Ogawa M, Hirabayashi K, et al. Comparison between Endoscopic Treatment and Surgical Drainage of the Pancreatic Duct in Chronic Pancreatitis. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine* 2018;43:117-21. 査読有り
6. Fujishiro T, Mashiko T, Masuoka Y, Yamada M, Furukawa D, Yazawa N, Kawashima Y, Ogawa M, Hirabayashi K, Nakagohri T. Conversion surgery for an initially unresectable, locally advanced pancreatic cancer after induction chemotherapy and carbon-ion radiotherapy: a case report. *Surg Case Rep* 2018;4:112. 査読有り
7. Mizuno M, Kawaguchi Y, Kawanishi A, Kawashima Y, Maruno A, Ogawa M, Tomioku M, Furukawa D, Nabeshima K, Nakamura K, Hirabayashi K, Mine T. An Intra-Abdominal Desmoid Tumor, Embedded in the Pancreas, Preoperatively Diagnosed as an Extragastric Growing Gastrointestinal Stromal Tumor. *Case reports in oncology* 2017;10:301-7. 査読有り
8. Kawanishi A, Hirabayashi K, Kono H, et al. A Serous Cystic Neoplasm of the Pancreas Coexisting with High-Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Mimicking an Intraepithelial Papillary Mucinous Neoplasm: A Case Report. *Case reports in oncology* 2017;10:143-50. 査読有り
9. Izumi H, Yazawa N, Furukawa D, Masuoka Y, Yamada M, Mashiko T, Kawashima Y, Ogawa M, Kawaguchi Y, Mine T, Hirabayashi K, Nakagohri T. Laparoscopic splenopancreatectomy for an endocrine tumor with cystic changes: a case report. *Clin Case Rep* 2017;5:328-32. 査読有り
10. Hirabayashi K, Yamada M, Kono H, et al. Epidermoid cysts are a characteristic feature of intrapancreatic but not of extrapancreatic accessory spleens. *Virchows Arch* 2017;471:91-8. 査読有り
11. Tomioku M, Yazawa N, Furukawa D, Izumi H, Mashiko T, Ozawa S, Sadahiro S, Yasuda S, Hirabayashi K, Nakagohri T. Repeated Hepatectomy for Recurrent Intrahepatic Cholangiolocellular Carcinoma: Report of a Case. *Tokai J Exp Clin Med* 2016;41:92-6. 査読有り
12. Mori N, Ichikawa T, Hashimoto J, Yamashita T, Yamada M, Hirabayashi K, Imai Y. Cholangiolocellular Carcinoma of the Liver Exhibiting High F-18 FDG Uptake. *Tokai J*

Exp Clin Med 2016;41:60-4. 査読有り

13. Izumi H, Yazawa N, Furukawa D, Masuoka Y, Yamada M, Mashiko T, Kawashima Y, Ogawa M, Kawaguchi Y, Mine T, Hirabayashi K, Nakagohri T. Carcinosarcoma of the ampulla of Vater: a case report and literature review. Surg Case Rep 2016;2:102. 査読有り
14. Izumi H, Yazawa N, Furukawa D, Masuoka Y, Yamada M, Mashiko T, Kawashima Y, Ogawa M, Kawaguchi Y, Mine T, Hirabayashi K, Nakagohri T. Bile duct carcinoma associated with congenital biliary dilatation in a 16-year-old female: a case report and literature review. Surg Case Rep 2016;2:5. 査読有り
15. Hanai U, Akamatsu T, Kobayashi M, Tsunoda Y, Hirabayashi K, et al. A Case of Occipital Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor with Neurofibromatosis Type 1. Tokai J Exp Clin Med 2016;41:130-4. 査読有り
16. Hadano A, Hirabayashi K, Yamamuro H, et al. Bone morphogenetic protein-2 expression in an intraductal papillary mucinous neoplasm with marked ossification: A case report. Pathol Int 2016;66:343-7. 査読有り
17. Hadano A, Hirabayashi K, Yamada M, et al. Molecular alterations in sporadic pancreatic neuroendocrine microadenomas. Pancreatology 2016;16:411-5. 査読有り

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 加戸 伸明, 才荷 翼, 平林 健一, 他. 当院における超音波内視鏡下穿刺吸引法の現状. 第 59 回日本臨床細胞学会総会. 2018 年
2. 才荷 翼, 加戸 伸明, 平林 健一, 他. 膵管内乳頭粘液性腫瘍における印環様細胞の出現意義について. 第 59 回日本臨床細胞学会総会. 2018 年
3. 上山 由美子, 才荷 翼, 平林 健一, 他. 膵 EUS-FNAC にて診断しえた悪性リンパ腫 5 例の細胞学的検討. 第 59 回日本臨床細胞学会総会. 2018 年
4. 平林 健一, 高梨 由美, 川西 彩, 他. 浸潤性膵管癌における miR4653-3p 発現の臨床病理学的検討. 第 107 回日本病理学会総会. 2018 年
5. 川西 彩, 藤本 龍太郎, 平林 健一, 他. 膵嚢胞を契機に発見された膵体部癌の 1 例. 第 49 回日本膵臓学会大会. 2018 年
6. 川西 彩, 川島 洋平, 平林 健一, 他. 当院における十二指腸乳頭部腫瘍に対する内視鏡的乳頭切除術(Endoscopic papillectomy, EP)の治療成績. 第 54 回日本胆道学会学術集会. 2018 年
7. 才荷 翼, 平林 健一, 萩原 範子, 他. 膵臓領域の細胞診-通常型膵癌を中心に-. 第 57 回日本臨床細胞学会秋期大会. 2018 年
8. 杉山 朋子, 田尻 琢磨, 平林 健一, 他. 膵管内乳頭液性腫瘍の細胞診. 第 57 回日本臨床細胞学会秋期大会. 2018 年
9. 平林 健一, 川西 彩, 羽田野 敦子, 他. 膵腫瘍細胞診の molecular cytopathology. 第 57 回日本臨床細胞学会秋期大会. 2018 年
10. 平林 健一, 川西 彩, 山田 美鈴, 他. 浸潤性膵管癌および PanIN における miR4653-3p 発現の検討. 第 49 回日本膵臓学会大会. 2018 年
11. 才荷 翼, 伊藤 仁, 平林 健一, 他. 膵管内乳頭粘液性腫瘍における癌関連線維芽細胞の細胞学的検討. 第 58 回日本臨床細胞学会総会. 2017 年.
12. 川西 彩, 平林 健一, 山田美鈴, 他. 浸潤性膵管癌における Necl-4 発現の意義に関する臨床病理学的検討. 第 59 回日本消化器病学会大会. 2017 年
13. 町田 知久, 伊藤 仁, 平林 健一, 他. 膵上皮内腫瘍性病変 PanIN-3 に自己免疫性膵炎を伴った一切除例. 第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会. 2017 年
14. 平林 健一, 山田 美鈴, 河野 宏貴, 他. 副脾内に発生する類表皮嚢胞の免疫組織学的検討. 第 106 回日本病理学会総会. 2017 年
15. Yoko Matsuda, Motohiro Kojima, Yuki Fukumura, Kenichi Hirabayashi, et al. Concordance of Tumor Regression Grade After Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced/Borderline Resectable Pancreatic Cancer (LA-PDAC).. Annual Meeting of The United States and Canadian Academy of Pathology. 2017 年
16. 茂木 英里香, 川口 義明, 平林 健一, 他. 主膵管内から十二指腸乳頭部への進展、閉塞性黄疸を呈した膵神経内分泌腫瘍の 1 例. 第 9 1 回日本消化器内視鏡学会総会. 2016 年.
17. 平林 健一, 川口 義明, 羽田野 敦子, 中村 直哉. 膵胆道系の生検と細胞診: 症例検討. 第 105 回日本病理学会総会. 2016 年.
18. 平林 健一, 才荷 翼, 東條 絵里, 他. 膵細胞診検体における各ガイドライン報告様式での検者間診断一致率について. 第 55 回日本臨床細胞学会秋季大会. 2016 年.
19. Kenichi Hirabayashi, Misuzu Yamada, Atsuko Maruno, et al. Nectin-1 expression in cancer-associated fibroblasts is associated with poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. XXXI International Congress of the International Academy of Pathology and the 28th Congress of the European Society of Pathology. 2016 年.
20. Aya Kawanishi, Kenichi Hirabayashi, Misuzu Yamada, et al. A pancreatic serous cystic neoplasm coexisting with high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia mimicking

an intraepithelial papillary mucinous neoplasm: A case report. XXXI International Congress of the International Academy of Pathology and the 28th Congress of the European Society of Pathology. 2016 年.

21. Atsuko Maruno, Kenichi Hirabayashi, Yoshiaki Kawaguchi, et al. KRAS mutation analysis using i-densy in the early diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. XXXI International Congress of the International Academy of Pathology and the 28th Congress of the European Society of Pathology. 2016 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〕

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：川口 義明

ローマ字氏名：KAWAGUCHI, Yoshiaki

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 80381482

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。