

令和元年6月20日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08696

研究課題名(和文)膵管内乳頭粘液性腫瘍発癌過程でのマイクロRNAとシグナル伝達系活性化の関連の解明

研究課題名(英文)The relationship of microRNA expression on the signaling pathway activation in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasm

研究代表者

福村 由紀 (Fukumura, Yuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90407312

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)：膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)の悪性化・浸潤能獲得には、Wnt/ β -catenin、GTP結合タンパク質関連、AKT/mTOR、Hedgehogシグナル伝達系の活性化が関与するが、この活性化機転は不明である。本研究では、IPMNにおけるシグナル伝達系活性化に関与するmiRを解析した。IPMN切除検体に対し、各種miRを定量、miR21高発現がIPMN上皮内癌/浸潤癌群に、miR181b高発現が浸潤癌群に認められ、miR20-a高発現も浸潤癌群で高値の傾向を認めた。Nanostring nCounter法によるシグナル伝達経路活性化解析では、IPMNの悪性度、組織亜型と活性化経路の関与を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵IPMNは浸潤癌となると生命予後が悪いため、その悪性化の早期段階で発見し、手術する必要がある。本研究で、悪性IPMNにおいてmiR21、miR181bが高値を示すことを発見し、これらは、悪性IPMNの検出のための膵液や血液中バイオマーカーとなりうる可能性を示唆し得た。今後、膵液・血液などを用いた前向き検討を行う必要がある。

これらのmiRとシグナル伝達経路との関連に関しては、手術検体症例数を増やし、組織亜型・悪性度別の解析を行い検討する。また、膵癌株化細胞にmiRのtransfectionを行い、伝達経路への関与を検討する所存である。

研究成果の概要(英文)：Malignant transformation/stromal invasion of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) requires the activation of Wnt/ β -catenin, GTP-binding protein related, AKT/mTOR, Hedgehog signal pathways. This study analyzed microRNAs which associates with these signal pathway activation in IPMN.

By quantification of miRs in resected IPMN specimen, high expression of miR 21 was seen in carcinoma in situ and invasive IPMN; high expression of miR181b was seen in invasive IPMN; and high expression of miR20-a tended to relate with invasive IPMN. By Nanostring nCounter method, the malignancy/non-malignancy and histological subtype of IPMN were related with activation pattern of the signal pathways.

研究分野：胆道・膵臓腫瘍

キーワード：膵管内乳頭粘液性腫瘍 miR21 miR181b miR20-a シグナル伝達経路 Wnt/ β -catenin Akt/mTOR

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

1. 研究開始当初の背景

膵管内乳頭状粘液産生腫瘍 (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm : IPMN) は嚢胞を形成するため、近年の画像診断の普及に伴い発見例が増加している。申請者 (福村) の研究グループの検討で、非浸潤性 IPMN の術後 5 年生存率は 92% に対し、浸潤性膵管内乳頭状粘液産生癌 (IPM Carcinoma : IPMC) では 30% で、通常型浸潤性膵管癌の 5 生率 (15%) と有意差がなく、予後不良であった。従い、当施設では、非浸潤性 IPMN は経過観察、浸潤性 IPMC は外科切除を行っている。申請者らは IPMN 59 例を検討 (下表) し、浸潤性 IPMC は非浸潤性 IPMN に比し腫瘍高が高く、組織亜型として胆膵型が多く、p16 蛋白発現低下及び β -catenin 核内発現例が多い事を示した。 β -catenin は Wnt シグナル伝達系の中心的役割を担うが、Wnt 刺激は Frizzled を介し GSK-3 β 活性を抑制し、Wnt 刺激は antagonist の secreted Frizzled-related protein (SFRP) が抑制する。Wnt 非刺激状態では GSK-3 β は APC, AXIN と複合体を形成し、 β -catenin を分解するが、Wnt 刺激状態ないし β -catenin, APC, AXIN 遺伝子変異やメチル化等の異常がある場合 GSK-3 β 活性が低下し、 β -catenin は分解されず核内移行し、標的遺伝子転写を促進する。このことから IPMN が浸潤する際には、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系関連遺伝子の変異やそのメチル化によるシグナル伝達系活性化が重要な因子と推測した。一方、GTP 結合蛋白は GNAS に代表される G 蛋白質共役受容体に結合して働く G 蛋白と Ras 蛋白に代表される低分子型 GTP 結合蛋白に分けられるが、自験例の検討では GNAS, Kras 遺伝子変異は非浸潤性 IPMN と浸潤性 IPMC で差がなく、GNAS 変異は腸型 IPMC (70%) と胃型 IPMC (40%) に高率であった (Fukumura, et al, Histopathology)。さらに、同一例で GNAS, Kras 両者の遺伝子異常がみられる例も存在するため、IPMN の発育進展の早期段階において、この 2 つの GTP 結合蛋白が関与するシグナル伝達系の crosstalk が重要と考えられる。

研究分担者 (三富) は研究申請者 (福村) のグループに加わり IPMN 症例を検鏡していく中で、広基性鋸歯状腺腫/ポリープ発癌過程の組織変化 (Mitomi, et al: Int J Surg Pathol 2005; J Gastroenterol Hepatol 2014; Diagn Pathol 2014) と類似した腺底部から表層への段階的な異型細胞増生 (bottom-up morphogenesis) と同様の細胞増殖活性の亢進が特徴で、IPMN 発癌過程においても腺腫発癌経路 (Mitomi, et al: Am J Surg Pathol 1997; Modern Pathol 1999; Cancer 2000; J Pathol 2003; J Cancer Res Clin Oncol 2003; Hum Pathol 2013) とは異なる bottom-up type の β -catenin の核内発現パターンを見出した。

各種腫瘍の miR 発現とシグナル伝達系との関連を示唆する報告は、(1) Wnt/ β -catenin シグナル伝達系に関しては、髄膜腫株化細胞において miR200a が β -catenin mRNA レベルを負に制御している事 (Mol Cell Biol 2009)、(2) GTP 結合蛋白関連シグナル伝達系では、膵癌株化細胞における低分子型 GTP 結合蛋白である Ras 蛋白の miR217 による負の調節が報告されているが (Carcinogenesis 2010)、GNAS 遺伝子異常と miR との関連性を示す報告はこれまでない。(3) AKT/mTOR シグナル伝達系では、PTEN はその主な基質である phosphatidylinositol trisphosphate を脱リン酸化することで AKT/mTOR シグナル伝達系を負に調節するが、肝細胞癌株化細胞では miR21 が PTEN を負に調節する事 (Gastroenterology 2007)、(4) Hedgehog シグナル伝達系は、リガンドが patched 受容体に結合すると smoothed 蛋白が脱抑制され、転写因子 Gli-1 が核内に移行し標的遺伝子を増幅するが、慢性骨髄性白血病患者の骨髄幹細胞で、miR326 が smoothed 蛋白発現を抑制することが示されており (Int J Cancer 2013) IPMN で Patched Domain Containing 2 遺伝子の高頻度のメチル化も報告されているが (Clin Cancer Res 2012)、IPMN における miR とこれらのシグナル伝達系との相関はこれまで全く明らかにされていない状況であった。

2. 研究の目的

「IPMN 発癌過程では、広基性鋸歯状腺腫/ポリープ発癌過程での miR 発現パターンや Wnt/ β -catenin シグナル伝達系, GTP 結合蛋白関連シグナル伝達系, AKT/mTOR シグナル伝達系, Hedgehog シグナル伝達系などの活性化機構との相関に類似性がある」という仮説のもと、IPMN 悪性化、浸潤癌移行において高発現を示す miR を解析し、これと各シグナル経路との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 非浸潤性 (良性) IPMN (IPMA), 非浸潤性 IPMC (上皮内 IPMC), 浸潤性 IPMC における miR 発現解析

IPMN 症例のうち、IPMA, 上皮内 IPMC, 浸潤性 IPMC を選別し、通常型膵管癌とその前癌病変 (PanIN) および正常膵管上皮を対照として、ホルマリン固定パラフィン切片から RNA を抽出し、miR20, 21, 93, 181b 発現を比較した。

a) 対象 (切除材料のホルマリン固定パラフィン切片を使用)

IPMA (50 例), 上皮内 IPMC (20 例), 浸潤性 IPMC (25 例), Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) 1-2 20 病変, PanIN3 20 病変, 通常型浸潤性膵管癌 20 例, 正常膵 (膵癌切除例非腫瘍部ホルマリン固定パラフィン切片使用) 膵管上皮細胞 20 サンプル, 腺房細胞 20 サンプル, ラ氏島細胞 20 サンプル。

b) RNA 抽出

10 μ m 厚のパラフィン切片 2-5 枚/各症例を用い、目的部部位から Laser capture microdissection 法で選択的に RNA を抽出 (IPMN 92 例, 膵管上皮細胞 10 サンプル, 腺房細胞 10 サンプル, ラ氏島細胞 10 サンプル)。

c) ターゲット miR 発現解析

miR 発現に関しては高感度の stem loop reverse transcriptase-PCR 法 (Nucleic Acids Res 2001) を用いた。解析に用いた 4 つの miR20, 21, 93, 181b は、研究分担者の大腸鋸歯状ポリープ発癌過程での知見 (大腸鋸歯状腫瘍と膵 IPMN には腫瘍形成像が類似し、Wnt シグナル系の関与も共通している事) をヒントに選択した。

(2) IPMN 発癌経路におけるシグナル伝達系活性化の解析

(2) (1) の症例について、Wnt/ β -catenin 系、GTP 結合蛋白系、AKT/mTOR 系、Hedgehog シグナル伝達系を含む 11 の cancer pathway 解析を Nanostring 社 nCounter 法で行い、miR 発現との関連を調べた。

a) 対象 (切除材料のホルマリン固定パラフィン切片を使用)

IPMA (6 例), IPMC 上皮内癌 (6 例), IPMC 浸潤癌 (4 例) (肝内 IPMN/IPNB 症例を含み検討)。デジタルバーコード標識法による mRNA 直接カウントにより 770 遺伝子 mRNA 量を測定、各症例ごとの cancer pathway の動態を調べる。

b) 統計解析

nSolver Analysis Software 4.0 (Nanostring technology 社) を用い、ヒートマップ、Principal component analysis, Volcano plotting で解析した。

c) 全症例での再現性の確認

Wnt 系: β -catenin 抗体 (Abcam) を用いて核内蛋白発現を免疫染色で検討、TGF- β 系: Follistatin, Smad4, TGF β 1 抗体で検討、Cancer stem 系: CD133, Oct3/5, CD25 染色で確認した。

4. 研究成果

膵 IPMN 切除検体に対し、各種 miR を定量、miR21 高発現が IPMN 上皮内癌/浸潤癌群に、miR181b 高発現が浸潤癌群に認められ、miR20-a 高発現も浸潤癌群で高値の傾向を認めた。Nanostring nCounter 法によるシグナル伝達経路活性解析では、IPMN の悪性

度、組織亜型と活性化経路が関与し、特に、TGF- 経路亢進と Cancer stem 系亢進は腸型 IPMN との関連が見られた。

膵 IPMN は浸潤癌となると生命予後が悪いため、その悪性の早期に発見し、手術する必要がある。本研究で、悪性 IPMN で miR21, miR181b が高値を示すことがわかり、これらは、悪性 IPMN の検出のための膵液や血液中バイオマーカーとなりうる可能性を示唆し得た。今後、膵液・血液などを用いた前向き検討を行う必要がある。

これらの miR とシグナル伝達経路との関連に関しては、手術検体を用いた検討としては、組織亜型・悪性度別の解析を行い、また、miR の機能解析とし、膵癌株化細胞に miR の transfection を行っていく所存である。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

1. Nakahodo J, Fukumura Y, et al. Pathological and imaging features of malignant IPMN of the pancreas. World Congress on Gastroenterology, Kuala Lumpur, Malaysia, 2018.
2. Nakahodo J, Fukumura Y, et al. Pathological markers which predict malignancy of intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas. American Pancreatic Association, San Diego, CA, USA, 2017.
3. 福村由紀、他. 膵 IPMN 悪性化・間質浸潤部位の病理組織学的検討. 腫瘍・膵管マッピング解析. 膵臓学会 京都、2017.

〔図書〕(計1件)

福村由紀、岸川さつき、他. IPNB: 病理の観点から. IPMN との比較を含めて. 肝胆膵 75(6): 1057-1062, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

順天堂大学ホームページに掲載

https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab0/jintai_byori/k4_02_08.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三富 弘之

ローマ字氏名：MITOMI, hiroyuki

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：非常勤講師

研究者番号(8桁): 90181940

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。