

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15099

研究課題名(和文)膵管癌におけるNecl-4の関連miRNAの解明と新規診断・治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of Necl-4-related miRNAs in pancreatic ductal carcinoma and their novel application to diagnosis and treatment

研究代表者

川西 彩(KAWANISHI, AYA)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：40773114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Necl-4の発現を制御するmiRNAの発現と機能について検討した。マイクロアレイによる網羅探索を行い、miRNAの1個がNecl-4-knockdown(KD)細胞で有意に発現亢進していることを同定した。miRNA mimicおよびinhibitorを導入した膵癌細胞でマイクロアレイで発現亢進していたmiRNAが、Necl-4の発現を抑制することを確認した。Necl-4-KD細胞ではTP53、SMAD4が発現低下し、1個のmiRNAの発現が亢進することを明らかにした。

Necl-4の発現低下が膵癌関連癌抑制遺伝子の発現低下およびそれを制御するmiRNAの発現亢進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、細胞接着因子の一つであるNecl-4の発現を制御するmiRNAを膵管癌細胞で同定した。更に、Necl-4-knockdown細胞で発現亢進していたmiRNAがNecl-4の発現を抑制することを明らかにした。また、Necl-4抑制細胞およびNecl-4関連miRNAが膵癌関連癌抑制遺伝子の発現変動に関与することが示唆された。本研究の成果は、Necl-4関連miRNAを対象とした独自の・創造的な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・社会的に意義が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 and function of miRNAs that regulate the expression of Necl-4. We performed a comprehensive microarray search and identified one miRNA that was significantly up-regulated in Necl-4-knockdown cells. Furthermore, in pancreatic ductal carcinoma cells transfected with miRNA mimic and miRNA inhibitor, we confirmed that the miRNA that was upregulated by the microarray repressed the expression of Necl-4. In addition, TP53, SMAD4, which are major tumor suppressor genes of pancreatic ductal carcinoma, were down-regulated in Necl-4-knockdown cells, while the expression of one miRNA was up-regulated.

These results suggest that down-regulation of Necl-4 is associated with down-regulation of pancreatic ductal carcinoma-related tumor suppressor genes and up-regulation of miRNAs that regulate them.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵臓 膵管癌 Necl-4 miRNA 細胞接着因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで Necl-4 の発現低下が腫瘍の予後や悪性度に関連することが報告されている。乳癌では上皮内癌と比較し浸潤癌で Necl-4 の発現が有意に低下することが報告されている¹。腎細胞癌では、Necl-4 の発現低下は進行した病期(T 因子)と血管浸潤と関連することが報告されている²。我々は以前、膵管癌の切除検体より作製された 258 例の tissue microarray 切片を用い Necl-4 の免疫組織化学および臨床病理学的検討を行った。その結果、Necl-4 の発現が低下する膵管癌は、Necl-4 発現膵管癌と比較し有意に予後不良であり、大きな腫瘍径、リンパ節転移、低分化腫瘍と関連することを明らかにした³。このように necl-4 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、Necl-4 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、Necl-4 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。さらに、膵管癌の高悪性化に関わる Necl-4 関連 miRNA を制御することで、既存の化学療法の治療効果増強や Necl-4 関連 miRNA に関連した新たな分子標的治療の開発が望めるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Necl-4 を制御する miRNA を解析することにより膵管癌の高悪性化機構を明らかにすることである。更に、膵管癌での Necl-4 関連 miRNA の発現と機能を明らかにすることにより、Necl-4 関連 miRNA を対象とした独自の・創造的な新規バイオマーカーや治療法の開発への発展を目指す。

3. 研究の方法

(1) miRNA マイクロアレイによる網羅的解析

siRNA 法により膵管癌細胞株の Necl-4 発現を knockdown(KD)した。Necl-4-KD 細胞および非 KD 細胞より RNA を抽出後マイクロアレイにより miRNA の発現を網羅的に解析した。Necl-4-KD 細胞と非 KD 細胞での miRNA の発現量を比較することで、Necl-4 に関連すると想定される miRNA を探索した。

(2) miRNA が Necl-4 を発現抑制するか検証

上記で見出した Necl-4 に関連すると想定される miRNA を模倣した miRNA mimic(miRNA と同様の働きをする合成 RNA) および対象 miRNA を抑制する miRNA inhibitor を膵癌培養細胞 MIA PaCa-2 にトランスフェクションし、Necl-4 の発現変動を RT-qPCR で検討した。

(3) 癌抑制遺伝子の発現検証

Necl-4-KD 細胞における、necl-4 関連 miRNA と膵癌の主要癌抑制遺伝子である *TP53*, *SMAD4* の発現を RT-qPCR で検証した。

4. 研究成果

(1) miRNA マイクロアレイによる網羅的解析

Necl-4 の発現制御に関わる miRNA をマイクロアレイにより網羅的に探索した。その結果、非 KD 細胞と比較し necl-4-KD 細胞では 81 個の miRNA で 2 倍以上の発現亢進および 123 個で 2 倍以上の発現低下がみられた。統計学的解析の結果、発現亢進 miRNA の 1 個、発現低下 miRNA の 7 個が非 KD 細胞よりも Necl-4-KD 細胞で有意な発現亢進または発現低下をしていることを同定した。

(2) miRNA が Necl-4 を発現抑制するか検証

マイクロアレイで同定した miRNA が、Necl-4 を標的とする miRNA かどうか TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/) で検索を行った。その結果、マイクロアレイで発現亢進していた 1 個の miRNA、発現低下していた miRNA 7 個のうち 1 個が Necl-4 を標的とすることが予想された。そのうち Necl-4-KD 細胞で発現が亢進していた 1 個の miRNA を対象とした。

対象とする miRNA を模倣した miRNA mimic および対象 miRNA を抑制する miRNA inhibitor を膵癌培養細胞 MIA PaCa-2 にトランスフェクションし total RNA を抽出した。RT-qPCR を行い Necl-4 の発現を検討した結果、Necl-4-KD 細胞で発現亢進していた miRNA が Necl-4 の発現を抑制することを確認した。

(3) 癌抑制遺伝子の発現検証

miRNA マイクロアレイ検索において Necl-4-KD 細胞で 2 倍以上の発現亢進していた miRNA を対象として、膵癌の主要癌抑制遺伝子である *TP53*, *SMAD4* を標的とする miRNA の検索を行った。スクリーニングは TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/) と miRDB (<http://mirdb.org/>) を用い、両データベースで *TP53* または *SMAD4* を標的すると推定される miRNA を抽出した。その結果、*TP53* を標的とする 2 個の miRNA と *SMAD4* を標的とする 1 個の miRNA

が抽出された。対象とする3個の miRNA と *TP53*、*SMAD4* の発現を Necl-4-KD 膵癌細胞を用いて RT-qPCR 法で検討した。その結果、Necl-4-KD 細胞では *TP53*、*SMAD4* が発現低下し、1つの miRNA の発現が亢進していた。これらの結果より Necl-4 の発現低下が膵癌関連癌抑制遺伝子の発現低下およびそれを制御する miRNA の発現亢進に関連することが示唆された。

<引用文献>

1. Jang SM, Sim J, Han H, et al. Clinicopathological significance of CADM4 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J Clin Pathol*. 2013 ;66:681-6.
2. Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, et al. Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2012;130:1329-37.
3. Kawanishi A, Hirabayashi K, Yamada M, et al. Clinicopathological significance of Necl-4 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2017 ;70:619-624.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saika Tsubasa, Hirabayashi Kenichi, Itoh Hitoshi, Miyajima Yoko, Serizawa Akihiko, Kato Nobuaki, Oyamada Hiroyuki, Machida Tomohisa, Kawanishi Aya, Nakamura Naoya	4. 巻 31
2. 論文標題 Cancer associated fibroblasts are a useful cytological finding for diagnosing pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytopathology	6. 最初と最後の頁 310～314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cyt.12868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirabayashi Kenichi, Kawanishi Aya, Morimachi Masashi, Yamada Misuzu, Takanashi Yumi, Hori Sadaaki, Serizawa Akihiko, Saika Tsubasa, Nakagohri Toshio, Nakamura Naoya	4. 巻 49
2. 論文標題 Hyalinized stroma is a characteristic feature of pancreatic intraductal oncocytic papillary neoplasm: An immunohistochemical study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Diagnostic Pathology	6. 最初と最後の頁 151639～151639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anndiagpath.2020.151639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimachi Masashi, Hirabayashi Kenichi, Takanashi Yumi, Kawanishi Aya, Saika Tsubasa, Ueyama Yumiko, Nakagohri Toshio, Nakamura Naoya, Suzuki Hidekazu, Kagawa Tatehiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Low expression of DDX5 is associated with poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jclinpath-2020-207002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 益子 太郎, 矢澤 直樹, 川西 彩, 他.
2. 発表標題 切除不能膵癌に対するconversion surgeryの治療成績と適応.
3. 学会等名 第49回 日本膵臓学会大会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川西 彩, 藤本 龍太郎, 川島 洋平, 他.
2. 発表標題 膵嚢胞を契機に発見された膵体部癌の1例
3. 学会等名 第49回 日本膵臓学会大会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川 真実, 川島 洋平, 川西 彩, 他.
2. 発表標題 当院における膵腺房細胞癌の特徴.
3. 学会等名 第49回 日本膵臓学会大会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平林 健一, 高梨 由美, 川西 彩, 他.
2. 発表標題 浸潤性膵管癌におけるmiR4653-3p発現の臨床病理学的検討.
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平林 健一, 川西 彩, 羽田野 敦子, 他.
2. 発表標題 細胞診の未来molecular cytopathology膵腫瘍細胞診のmolecular cytopathology.
3. 学会等名 第57回日本臨床細胞学会総会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川西 彩, 川島 洋平, 小川 真実, 他.
2. 発表標題 当院でEUS-FNAより診断した膵Solid Pseudopapillary Neoplasmの検討.
3. 学会等名 第50回 日本膵臓学会大会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林 健一, 高梨 由美, 川西 彩, 他.
2. 発表標題 膵神経内分泌腫瘍におけるmiR185-5pによるsomatostatin analogue作用増強効果の検討.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林 健一, 才荷 翼, 川西 彩, 他.
2. 発表標題 膵EUS-FNAの精度向上を目指して 膵腫瘍のmolecular cytopathologyとEUS-FNA検体を用いた分子学的解析の展望.
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会総会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横田 将, 川島 洋平, 川西 彩, 他.
2. 発表標題 当院におけるTS1膵癌の検討.
3. 学会等名 第61回 日本消化器病学会大会 (JDDW 2019) .
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川西 彩, 山路 葉子, 小玉 敏生, 他.
2. 発表標題 膵神経内分泌腫瘍に対するEUS-FNAの有用性の検討.
3. 学会等名 第100回 日本消化器内視鏡学会総会 (JDDW 2019) . (JDDW 2020) .
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	平林 健一 (HIRABAYASHI KENICHI) (60514388)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	
研究協力者	森町 将司 (MORIMACHI MASASHI) (70838010)	東海大学・医学部・助教 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------