

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月2日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591776

研究課題名（和文）膵癌 EMT 関連 miRNA の同定と Redox によるその miRNA 制御機能の  
解明研究課題名（英文） Identification of MicroRNA related to EMT of pancreas cancer, and  
elucidation of the miRNA control facility by Redox

研究代表者

高畑 俊一（TAKAHATA SHUNICHI）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50437779

研究成果の概要（和文）：

膵臓癌手術標本 100 例以上の凍結標本組織を用いた解析で、複数の miRNA が膵臓癌で特異的に発現されていることを同定した。その中で EMT を誘導するものとして有望なのが、miR-17-5p と miR-10b であり、precursor を導入したところ、その増殖能力及び浸潤能力が増強され悪性度に寄与する因子と考えられた。EMT の抑制に働いていると考えられるのは miR-200c であり、precursor を導入したところ、その浸潤能力が抑制された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed over 100 surgical tissues of pancreatic cancer by using frozen sections. Several MicroRNA (miRNA) were identified as prognostic markers. Furthermore, we detected that precursor of miR-17-5p and that of miR-10b enhanced proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. Meanwhile, we detected that precursor of miR-200c suppressed invasion of pancreatic cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓外科学、膵癌、EMT、miRNA、Redox

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌はわが国において癌死の5位を占め、現在でも100人中3人しか根治しない疾患で、その治療法/診断法の開発は社会的緊急性・重要度が高い。治癒切除が唯一の根治治療であるが、80%の患者が進行癌で既に切除不能である。これは早期から浸潤、転移を来す膵臓癌の生物学的悪性度の高さによる。この転移の初期段階に重要な働きをするのが EMT (epithelial-mesenchymal transition) である。EMT は上皮性細胞が遊走など間葉系

細胞の性質を獲得、転移、浸潤に強く関わる。

MicroRNA (miRNA) は 20 数個の塩基から構成され、蛋白質へ翻訳されない一本鎖 RNA として発見された。最近では癌において miRNA の発現が低下あるいは上昇し、癌抑制遺伝子や癌遺伝子として機能し、浸潤、転移と関連することが示唆されている。

Redox (reduction-oxidation state) 反応とは酸化還元反応を介した細胞制御であり、膵臓癌を含めて多くの癌化シグナルや多くの癌治療の治療効果発現機序に関わることが判

明している。

膵癌における miRNA と EMT の関連、また Redox-miRNA-EMT を一元的に検討した報告は皆無である。

## 2. 研究の目的

転移浸潤に強く関連する EMT の機序を、多くの遺伝子を制御するとされる miRNA、さらには近年新たな分子標的治療薬として注目を集める Redox 関連因子との関係を解明することにより、膵臓癌の新たな診断、治療法を開発する。

## 3. 研究の方法

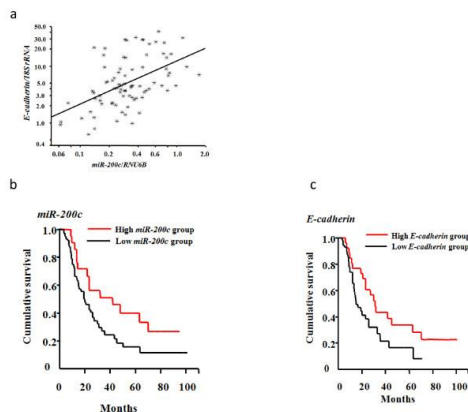
本研究では、EMT 誘導膵癌細胞の miRNA 網羅的発現解析を行い、EMT 特異的 miRNA の同定、機能解析を行う。さらに、臨床情報豊富なホルマリン固定パラフィン封入 (FFPE) 検体や凍結標本由来マイクロダイセクション検体を対象に同定した miRNA の発現解析を行い、その臨床情報に基づいて分類し、膵癌の転移、浸潤、膵癌患者の予後との関連を検証する。また膵癌細胞酸化ストレス EMT 誘導モデルを作成し、その miRNA 網羅的解析により Redox 関連 EMT に関わる miRNA を同定する。この 2 系統の網羅的解析により EMT と Redox を結びつける miRNA を絞り込み、その制御機序を解明する。さらに抗癌剤・放射線治療における Redox を介した EMT 促進の機序を検討し、抗癌剤・放射線療法と一体となった miRNA を標的とした個別化治療の可能性を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 膵臓癌手術標本 100 例以上の組織を用いた解析で、複数の miRNA が膵臓癌で特異的に発現されていることを同定した。

以下に列挙する。

- ① miR-17-5p は、膵臓において高発現しており、予後不良因子であることを示した (Cancer Biology & Therapy 誌)。
- ② miR-200c は、高発現症例は有意に予後良好であった。E-cadherin の発現と関連していた (Molecular Cancer 誌)。

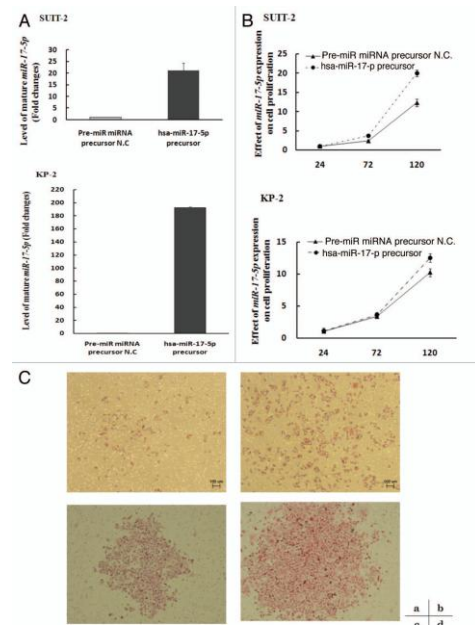


③ miR-203 は高発現症例は有意に予後不良であった (Annals of Surgical Oncology 誌)。

④ miR-10b が膵臓癌で強く発現し、かつその浸潤度および予後不良と関与していることを明らかとした (Surgery)。

⑤ miR-142-5p が抗癌剤 gemcitabine を用いる際の独立した予後因子であることを報告した (Ann. Surg. Oncol.)。

(2) 上記の中で、EMT を誘導するものとして有望なのが、miR-17-5p と miR-10b である。miR-17-5p と miR-10b はマイクロダイセクションによっても癌組織に高発現している事が証明された。膵癌細胞株に miR-17-5p の precursor を導入したところ、その増殖能力及び浸潤能力が増強され悪性度に寄与する因子と考えられた。(Cancer Biology & Therapy 誌、Surgery 誌)。



(4) EMT の抑制に働いていると考えられるのは miR-200c である。

膵癌細胞株で miR-200c は浸潤度の強さと反比例する発現状況であった。この miRNA の precursor を導入したところ、その浸潤能力が抑制された。また、その細胞形態を観察したところ未分化な線維芽細胞様の癌細胞が上皮様形態へと変化しさらには E-cadherin 上昇、Vimentin 低下が mRNA およびタンパクレベルで確認された。すなわち miR-200c は膵癌細胞に対して MET を生じさせることが確認された。EMT を抑制し MET を誘導することによる膵癌の浸潤・転移の抑制に重要な役割を果たすことを証明した。(Molecular Cancer

誌)。

また平成23年度はこれらを統括した複数の報告を行い、当研究室におけるmiRNA研究にひとつの区切りをつけたと考えている。

残念ながら当初の目標としていた膵癌細胞酸化ストレスEMT誘導モデルの作成には至らず、Redox関連EMTに関わるmiRNAの同定には至らなかった。これは将来への課題として更なる探究を行っていく必要が考えられた。

#### 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7件)

- ① Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Kayashima T, Sakai H, Fujita H, Nakata K, Tanaka M. MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma *Annals of Surgical Oncology* 17, 2010, 3120-3128
- ② Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Fujita H, Nakata K, Tanaka M. MicroRNA miR-17-5p is overexpressed in pancreatic cancer, associated with a poor prognosis and involved in cancer cell proliferation and invasion *Cancer Biology & Therapy* 10, 2010, 748-757
- ③ Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Sato N, Kayashima T, Fujita H, Nakata K, Tanaka M. MicroRNA, has-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation *Molecular Cancer* 9, 2010, 169 (1-10)
- ④ Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Fujita H, Moriyama T, Ohtsuka T, Ueda J, Nagai E, Hashizume M, Tanaka M. MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol.* 18(8), 2011, 2381-2387
- ⑤ Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Ikenaga N, Sakai H, Lin C, Fujita H, Otsuka T, Aishima S, Nagai E, Oda Y, Tanaka M. MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer, promotes its invasiveness, and correlates with a poor prognosis. *Surgery* 150, 2011, 916-922
- ⑥ 大内田研宙, 藤田逸人, 水元一博, 田中雅夫 【膵がん・膵内分泌腫瘍の最近の動向】 膵がんの分子生物学的解析の現状 *腫瘍内科* 7(2), 2011, 131-136
- ⑦ 藤田逸人, 大内田研宙, 水元一博, 田中雅夫 分子生物学的研究に基づく膵癌の診断と治療 - 臨床応用を目指して - *福岡医学雑誌* 102(6), 2011, 203-214

[学会発表] (計7件)

- ① 池永直樹, 大内田研宙, 水元一博, 坂井寛, 田中雅夫, MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic cancer (膵癌予後因子としてのmicroRNA-203), 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2010.09.
- ② Ikenaga N, Sakai H, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M. MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic cancer Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society July 11-13, 2010 Fukuoka, Japan
- ③ Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M. MicroRNA-21 (miR-21) Modulates Biologic Functions of Pancreatic Cancer Cells Including Their Proliferation, Invasion and Chemoresistance, Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010, July 11-13, 2010 Fukuoka, Japan
- ④ Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Kozono S, Zhao M, Kayashima T, Ikenaga N, Cui L, Sakai H, Onimaru M, Moriyama T, Fujita H, Ohtsuka T, Nagai E, Tanaka M, MicroRNA-10b is a Useful Prognostic Marker in Pancreatic Cancer and Promotes Its Invasiveness Joint

Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010, July 11-13, 2010 Fukuoka, Japan

- ⑤ 仲田興平, 大内田研宙, 水元一博, 小菌真吾, 萱島理, 池永直樹, 余俊, 藤田逸人, 大塚隆生, 永井英司, 田中雅夫, Micro RNA10b は膵臓癌において浸潤, 悪性度に関与している, 第 110 回日本外科学会定期学術集会, 2010. 04.
- ⑥ 余俊, 大内田研宙, 森山大樹, 崔林, 趙茗, 佐藤典宏, 水元一博, 田中雅夫, 膵癌におけるマイクロ RNA-200c の発現とその発現増強による浸潤能抑制効果, 第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009. 04.
- ⑦ 大内田研宙, 水元一博, 余俊, 森山大樹, 佐藤典宏, 当間宏樹, 永井英司, 橋爪誠, 田中雅夫, 網羅的発現解析による膵癌の治療抵抗性に関わる micro RNA の同定, 第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009. 04.

〔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〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高畑 俊一 (TAKAHATA SHUNICHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 50437779

### (2) 研究分担者

上田 純二 (UEDA JUNJI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 90529801

堤 宏介 (TSUTSUMI KOSUKE)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号: 00467937

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 20452708

### (3) 連携研究者

なし