

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791294

研究課題名 (和文)

膵発癌過程における癌化抑制機構としてのセネセンスの解析とその診断・治療への応用

研究課題名 (英文) The analysis of senescence as a cancer suppressing mechanism in pancreatic carcinogenesis and its introduction to the diagnostic and therapeutic strategy

研究代表者

宮坂 義浩 (MIYASAKA YOSHIHIRO)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：40507795

研究成果の概要 (和文)：

我々は、正常膵組織、膵癌、膵癌前駆病変である膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の切除組織を用いて、SA- β -gal や SAHF、p16^{INK4A}、p15^{INK4B} などのセネセンス関連マーカーの発現を解析した。その結果、セネセンス関連 β ガラクトシダーゼ活性やセネセンス関連ヘテロクロマチン凝集の形成、p16、p15 などのセネセンスマーカーは正常膵管ではほとんど発現しておらず、一方で IPMN with low grade dysplasia において最も高頻度に発現していることを明らかにした。更に、これらのセネセンスマーカーの発現は悪性化に伴い減少した。これらの結果は、膵発癌過程の初期において強く誘導されるセネセンスが悪性化に伴い損なわれ、セネセンスによる細胞の分裂停止が誘導できなくなることを示している。また、膵液や膵穿刺吸引細胞診検体における microRNA や mRNA の定量的発現解析の手法を確立し、セネセンスマーカーを含めた様々な癌関連遺伝子の発現を基に、術前あるいは切除不能膵癌患者における個別化治療が実現可能であることを示した。

研究成果の概要 (英文)：

We analyzed the expression levels of senescence associated markers, including senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal), senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), p16^{INK4A}, and p15^{INK4B}, in normal pancreas, pancreatic cancer, and intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) tissues. As the result, we found that the percentage of positive cases was lowest in normal pancreas and it reached a peak in IPMN with low-grade dysplasia. Furthermore, it showed significant decreasing trends in the transition from IPMN with low-grade dysplasia to IPMN with an associated invasive carcinoma. These results indicated that senescence is induced in the early stage of IPMN and gradually attenuated according to the progression. It is suggested that senescence plays a role in preventing malignant progression of IPMN. Additionally, we established the reliable methods to quantify the expression levels of microRNA and mRNA in pancreatic juice and FNA cytological samples. These methods are potent strategy to perform individualized therapy in preoperative and unresectable cases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：消化器外科

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、セネセンス

1. 研究開始当初の背景

膵癌は消化器癌の中で最も予後不良であり、発見時に根治手術が可能な症例は約半数である。更に、根治手術が行われた症例の5年生存率も13%と限られている。この膵癌の前駆病変として最近注目されているのが、膵上皮内新生物（pancreatic intraepithelial neoplasia; PanIN）と膵管内乳頭粘液性腫瘍（intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN）である。

近年、ヒト悪性黒色腫の前癌病変やトランスジェニック動物の前癌病変においてセネセンスと呼ばれる細胞の分裂停止が報告されている。これらの結果は、セネセンスが腫瘍の悪性化を抑制しており、セネセンスの破綻が癌化の引き金となることを示唆している。長期経過観察を行った臨床試験から、膵癌の前癌病変である IPMN や PanIN においてもセネセンスが誘導されていることが想定される。しかしながら、ヒトにおける膵癌前駆病変でのセネセンスを検討した報告は皆無である。

2. 研究の目的

本研究の第1の目的は、PanIN や IPMN などの膵前癌病変におけるセネセンスの有無を解析し、セネセンスに関連する遺伝子群の発現変化を解明することである。さらに、高感度かつ簡便・迅速に測定可能な因子や測定方法を選別し、膵癌の早期診断へ応用することである。

診断標的分子の探索は同時にセネセンスと膵発癌メカニズムの解明にも寄与する。本研究の第2の目的は、新たに特定されたセネセンス関連分子を膵癌の個別化治療や新規治療法の探索へ応用することである。

3. 研究の方法

(1)膵癌、膵癌前駆病変、正常膵組織における既知のセネセンスマーカー発現の解析。

①凍結切片におけるセネセンス関連βガラクトシダーゼ活性(senescence-associated β-galactosidase; SA-β-gal)の検出。

Dimriらが1995年にPNAS誌に報告した方法を採用し、正常膵、IPMN、膵癌の切除組織におけるSA-β-gal発現を解析した。

②凍結切片におけるセネセンス関連ヘテロクロマチン凝集の形成(senescence-associated heterochromatin foci; SAHF)の検出。

2003年にNaritaらがCell誌に発表したセネセンスの特徴となる現象であり、我々はHP1γ抗体を用いた蛍光免疫染色で捉える。

③の発現解析。

2005年にColladoらがNature誌に発表したセネセンスのマーカーである。

A)ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いた免疫組織化学染色により蛋白発現解析を行う。

B)候補遺伝子の高感度primerを作成し、凍結切片からマイクロダイセクション法により採取した細胞におけるmRNA発現を解析する。

(2)膵特異的セネセンス関連分子の探索および機能解析。

①セネセンスマーカー陽性群と陰性群の2群におけるセネセンス関連遺伝子発現解析。

②RNAiを用いたセネセンス関連遺伝子抑制による機能解析。

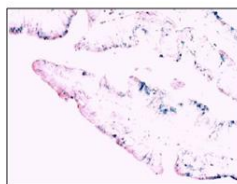
(3)セネセンスマーカーの診断への応用の検討。

膵液や超音波内視鏡ガイド下膵穿刺吸引細胞診などの微量検体を用いたセネセンス関連遺伝子群の発現解析を行う。さらに、細胞診サンプルにマイクロダイセクション法を導入し、標的細胞のみにおける発現解析を行う。

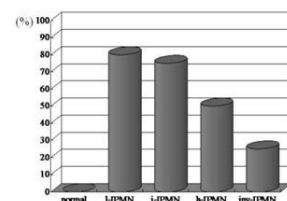
4. 研究成果

(1)SA-β-gal

正常膵組織、膵腺房細胞および腫瘍間質においてはSA-β-gal発現を認めず、異型細胞においてのみ発現を認めた(図1)。IPMN with low grade dysplasia (l-IPMN)において最も高頻度にSA-β-gal陽性例を認め、悪性度が高まるに連れ陽性例が現象することが判明した(図2)(Miyasaka et al., Human Pathology, 2011; in press)。



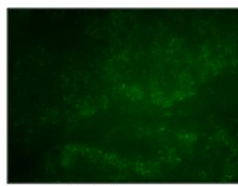
(図1)セネセンス関連βガラクトシダーゼ活性 (l-IPMN)



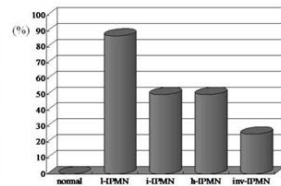
(図2)SA-β-gal陽性率 (l-IPMN)

(2) SAHF

SAHF 形成も SA-β-gal 同様、異型細胞に限られており、I-IPMN において最も高頻度に認められた (図3・4) (Miyasaka et al., Human Pathology, 2011; *in press*)。



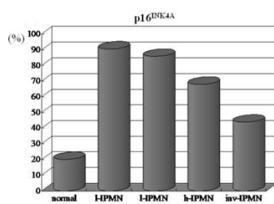
(図3) SAHF
(I-IPMN)



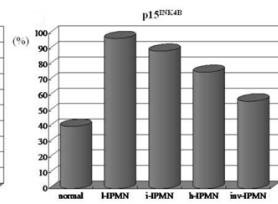
(図4) SAHF陽性率
(I-IPMN)

(3) p16^{INK4A}・p15^{INK4B}

ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて免疫染色を行い、セネセンスマーカーである p16^{INK4A} および p15^{INK4B} の発現も I-IPMN で高頻度に発現しており、悪性化に伴い発現頻度が低下することが明らかとなった (図5・6) (Miyasaka et al., Human Pathology, 2011; *in press*)。



(図5) p16^{INK4A}発現頻度



(図6) p15^{INK4B}発現頻度

(4) 膵液細胞診検体における microRNA 発現解析

膵液細胞診検体を用いて、miR-21、miR-155 を始めとする microRNA の発現解析を行い、膵癌の診断に極めて有用であることを示した (Sadakari et al., JOP, 2011)。

(5) 超音波内視鏡ガイド下膵穿刺吸引細胞診検体における mRNA 発現解析

膵穿刺吸引細胞診検体にマイクロダイセクション法を導入し、標的細胞における定量的 mRNA 発現解析を行い、その有用性を示した (Fujita et al., Neoplasia, 2010; Fujita et al., International Journal of Oncology, 2011)。術前あるいは切除不能膵癌症例における個別化治療の指標と成り得る。

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3件)

1. Miyasaka Y, Nagai E, Ohuchida K, Fujita H,

Nakata K, Hayashi A, Mizumoto K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Senescence in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. Human Pathology, 2011, *in press*

2. Sadakari Y, Ohtsuka T, Ohuchida K, Tsutsumi K, Takahata S, Nakamura M, Mizumoto K, Tanaka M. MicroRNA expression analysis in preoperative pancreatic juice samples of pancreatic ductal adenocarcinoma. JOP, 11: 587-92, 2010

3. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Souzaki R, Tajiri T, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M. Gene expression levels as predictive markers of outcome in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. Neoplasia. 12: 807-17, 2010

4. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Hayashi A, Souzaki R, Tajiri T, Onimaru M, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M. High EGFR mRNA expression is a prognostic factor for reduced survival in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. Int J Oncol. 38: 629-41, 2011

[学会発表] (計1件)

1. Miyasaka Y, Nagai E, Ohuchida K, Nakata K, Hayashi A, Mizumoto K, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Senescence in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Digestive Disease Week, 2008, San Diego

[図書] (計0件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮坂 義浩 (MIYSAKA YOSHIHIRO)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：40507795

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし