

## 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25年 5月15日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390258

研究課題名（和文） 膵癌における新規遺伝子制御機能 micro RNA activation の解明と応用

研究課題名（英文） Investigation the mechanism and the role of RNA activation by micro RNA in pancreatic cancer

研究代表者

永井 英司（NAGAI EISHI）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30264021

研究成果の概要（和文）：

近年、miRNAによるRNA activationという新しいmiRNAによる遺伝子制御機構が報告され、新規遺伝子制御手法として注目を浴びている。我々はこの制御機能に関与するmiRNAが膵癌の転移に重要なEMT関連遺伝子にどのように関わるかを検討し、miRNAがEMT制御因子の発現を増強させる事を確認、一方で、miRNA10bが膵癌の浸潤、転移予後に関与している可能性を発見した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated miRNA expression in pancreatic cancer. We found miR-10b expression is overexpressed and miR-X(now submitting) expression is inhibited in pancreatic cancer. We also found miR-10b is related with pancreatic cancer invasiveness and its expression is related with poor prognosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：膵癌、microRNA

### 1. 研究開始当初の背景

RNA interference (RNAi) は二本鎖 RNA (dsRNA) が相補的な配列をもつ mRNA を分解する事により遺伝子発現を抑制する現象で (Nature, 1998, Fier)、その発見はこれまでの分子生物学的研究を一変させその発見者は2006年ノーベル医学・生理学賞を受賞した。一方、microRNA (miRNA) は内在的に存在する22塩基前後のRNAで、3' UTR領域に相補的な配列をもつ mRNA の分解を促進、もしくはその翻訳を抑制することで遺伝子発現を抑制する

(Cell, 1993, Lee)。RNAi, miRNA はともに簡便、有用な配列特異的な遺伝子発現抑制機構として世界中で爆発的に普及しており現在のがん研究においてその治療薬の開発には不可欠な手法となっている。このような遺伝子発現抑制機構の急速な解明に対して配列特異的な遺伝子発現促進機構に関する報告はわずかであった (Curr Opin Chem Biol, 2005, Majumdar)。近年、dsRNA や miRNA を用いた新規遺伝子制御法である <RNA activation> が報告された。これまで標的遺伝子を抑制的に

制御すると考えられていた dsRNA, miRNA が標的遺伝子の promoter 領域に直接結合し遺伝子発現を促進する現象が相次いで報告された (PNAS, 2006, Li) (Nat chem boil, 2007, Janowski) (PNAS, 2008, Place)。しかし、その詳細なメカニズムは不明であった。膵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。しかし他の消化器癌と異なり、その 5 年生存率はここ 30 年間でほとんど改善がない。現在、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、転移を来たす膵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 は初期胚の器官形成で見られ、上皮性細胞が遊走など間葉系細胞の性質を獲得することであるが、このプロセスが癌でもみられ、転移、浸潤に強く関わる。最近でもその仕組みが本邦から Nature cell biol 誌に報告され、EMT に対する注目は大きくなっている (2008, Nakaya)。近年ある種の miRNA による twist などの EMT 関連因子の制御が固形腫瘍モデルにて報告されたばかりであるが (Nature, 2007, Ma)、膵癌における報告は殆どない (Cancer Res, 2009, Li)。

また、RNA activation に関しては前述のごとく、ごく最近発見された現象であり、膵臓癌における miRNA による RNA activation の報告は無い。更には RNA activation を実用した報告は皆無であった。

## 2. 研究の目的

膵発癌のみならず癌進展過程において miRNA の新しい役割である RNA activation に関して殆ど報告されていない。今回、我々は膵癌に関連する miRNA による RNA activation を同定し、その機序を解明する。さらに、癌関連 RNA activation 機構を利用した新規治療戦略を開発するため in vivo, in vitro の解析から検討した。

## 3. 研究の方法

- ① 膵癌細胞株の miRNA 網羅解析に引きつづき、膵癌特異的発現を示す miRNA の同定と膵癌の浸潤・転移にかかわる miRNA の絞り込みを進めた。
- ② miRNA で EMT 関連分子を制御する miRNA の on line 上のデータに基づく絞り込みと同定した miRNA の precursor (Pre-miRNA) 導入による標的分子発現変動の確認をおこない、そのプロモーター領域への直接的な結合とそれに引き続く標的分子発現

現変動を検証した。

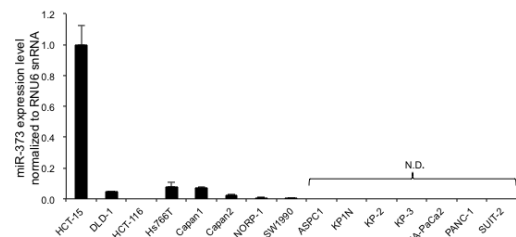
- ③ 同定した EMT 関連因子の activation に関与する個々の miRNA の機能解析を in vitro や in vivo モデルを用いて行った。
- ④ RNA activation を引き起こす miRNA が実際に vivo でどのような発現をしているかを検証する。当科では 1992 年から 2008 年までに切除膵癌の FFPE 検体 120 症例に対してマクロダイセクションを用いて既に RNA を抽出しており、miRNA の発現定量解析を行い、予後、臨床病理学的な因子、標的分子群発現との関係を検討した。

## 4. 研究成果

- ①膵癌培養細胞株の microRNA 網羅解析および EMT 関連 miRNA の同定

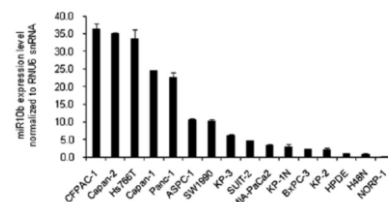
正常膵管上皮である human pancreatic ductal epithelial cell (HPDE cell) clone6 を control と複数のヒト膵癌細胞株における miRNA の網羅的発現解析を行い膵癌において発現が増加するものと、低下するものを同定した。さらに、複数の細胞株を対象として解析を進め、膵癌特異的に発現の変化する miRNA を同定した。

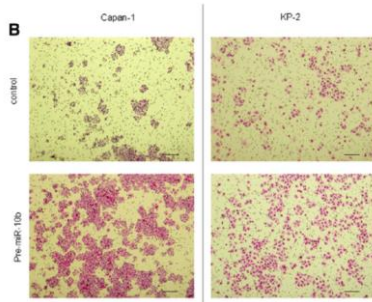
我々は EMT また、浸潤、転移に関連する因子として miR-10b および miR-X (投稿中) に着目した。



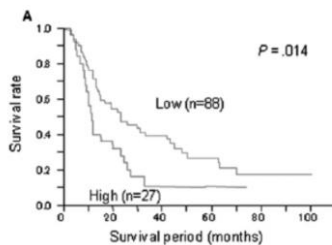
- ②miR-X (投稿中) が EMT 関連因子 E-cadherin の activation に関連している事同定  
申請者らは Nucleofector を用いて膵癌細胞に pre-miRNA を導入し EMT 関連遺伝子 E-cadherin が実際に増強されている事を mRNA および、タンパクレベルで確認した。

- ③miR-10b が膵癌の浸潤、転移に関連している事同定；我々は本実験経過中に miR-10b が膵臓癌において高発現している事を発見、さらに miR-10b の発現が、浸潤を増強する事を確認した (図 A, B)





- ⑤ miR-10b 発現している症例は低発現症例に比較して有意に予後が不良であった。FFPE サンプルから miRNA を抽出し、miRNA10b の発現を検討した、結果 miR-10b 発現症例では有意に予後が不良であることを発見した。



#### 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 16 件)

1. Nagai E, Ohuchida K, Nakata K, Toma H, Tanaka M. Feasibility and safety of intracorporeal esophagojejunostomy after laparoscopic total gastrectomy: Inverted T-shaped anastomosis using linear staplers. *Surgery*. 153(5):732-8,2013.
2. Ohuchida K, Mizumoto K, Nagai E, Tanaka M et al. MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the HOXA gene. *Ann Surg Oncol*. 19(7):2394-402, 2012.
3. Yamanaka N, Nagai E, Ohuchida K, Ueda J, Toma H, Tanaka M. Feasibility of laparoscopic gastrectomy for advanced gastric cancer with positive peritoneal cytology. *Surg Today*. 2012 [Epub ahead of print]

4. Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Nagai E, Tanaka M. MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer, promotes its invasiveness and is correlated with a poor prognosis. *Surgery*, 150: 916-22, 2011.

5. Nakata K, Ohuchida K, Nagai E, Mizumoto K. Invasive carcinoma derived from intestinal type intraductal papillary mucinous neoplasm is associated with minimal invasion colloid carcinoma, and less invasive behaviors, leading to better prognosis. *Pancreas*, 40:581-7, 2011.

6. Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Ohtsuka T, Toma H, Tanaka M. The risk of lymph node metastasis in mucosal gastric carcinoma: especially for a mixture of differentiated and undifferentiated adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 59(118):1855-8, 2012.

7. Ohtsuka T, Nagai E, Toma H, Ohuchida K, Tanaka M Single-incision laparoscopy-assisted surgery for bowel obstruction: report of three cases. *Surg Today*, 41(11):1519-23,2011.

8. Miyasaka Y, Nagai E, Ohuchida K, Mizumoto K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Senescence in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Hum Pathol*. 42(12):2010-7,2011.

9. Nakata K, Ohuchida K, Aishima S, Sadakari Y, Kayashima T, Miyasaka Y, Nagai E, Mizumoto K, Tanaka M. Invasive carcinoma derived from intestinal-type intraductal papillary mucinous neoplasm is associated with minimal invasion, colloid carcinoma, and less invasive behavior, leading to a better prognosis, *Pancreas* 40(4):581-7, 2011.

10. Sakai H, Ohuchida K, Mizumoto K, Cui L, Nakata K, Toma H, Nagai E, Tanaka M. Inhibition of p60 expression suppresses both invasiveness and anoikis resistance of gastric cancer. *Ann Surg Oncol*. 18(7):2057-65,2011.

11. Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Ueda J, Nagai E, Tanaka M. MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*. 18(8):2381-7, 2011.

12. Hayashi A, Nakata K, Nagai E, Oda Y, Tanaka M. Pcd4 expression in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: its association with tumor progression and proliferation. *Hum Pathol*. 2010 Nov;41(11):1507-15.

13. Onimaru M, Ohuchida K, Egami T, Mizumoto K, Nagai E, Toma H, Tanaka M. Gemcitabine synergistically enhances the effect of adenovirus gene therapy through activation of the CMV promoter in pancreatic cancer cells. *Cancer Gene Ther*. 17(8):541-9,2010.

14. Hayashi A, Nagai E, Tanaka M. Decreased expression of focal adhesion kinase is associated with a poor prognosis in extrahepatic bile duct carcinoma. *Hum Pathol*. 41(6):859-66,2010.  
Select item 20163915

15. Onimaru M, Ohuchida K, Nagai E, Mizumoto K, Egami T, Tanaka M. Combination with low-dose gemcitabine and hTERT-promoter-dependent conditionally replicative adenovirus enhances cytotoxicity through their crosstalk mechanisms in pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 28;294(2):178-86,2010.

16. Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M. S100P is a novel marker to identify intraductal papillary mucinous neoplasms. *Hum Pathol*. Jun;41(6):824-31, 2010.

[学会発表] (計 2 件)

1. Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Nagai E and Tanaka M. MicroRNA-373 is downregulated in pancreatic cancer and repressed its invasiveness via induction of

mesenchymal-epithelial transition. Joint meeting of the international association of pancreatology and Japan pancreatic society, July 11-13, 2010, Fukuoka, Japan.

2. Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Nagai E and 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 Japan pancreatic society, July 11-13, 2010, Fukuoka, Japan.

[図書] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

永井 英司 (NAGAI EISHI)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：30264021

##### (2) 研究分担者

当間 宏樹 (TOMA HIROKI)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：80437780

江上 拓哉 (EGAMI TAKUYA)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：40507787

水元 一博 (MIZUMOTO KAZUHIRO)  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号：90253418  
(2010 年)

上田 純二 (UEDA JUNJI)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：90529801  
(2010 年)

富永 洋平 (TOMINAGA YOHEI)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：90304823  
(2010 年)

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)  
九州大学・先端イノベーションセンター・講師  
研究者番号：20452708  
(2012 年)

田中 雅夫 (TANAKA MASAO)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：30163570  
(2010年)

(3) 連携研究者  
なし