

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：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591518

研究課題名（和文）膵臓癌に対する術前化学放射線治療の感受性予測法構築における
MicroRNA の関与研究課題名（英文）Involvement of microRNA in the sensitivity prediction of
preoperative chemoradiotherapy in pancreatic cancer

研究代表者

江口 英利 (EGUCHI HIDETOSHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90542118

研究成果の概要（和文）：膵癌細胞株から樹立した塩酸ゲムシタビン耐性株(MiaPaCa2-RG、PSN1-RG)およびそれらの親株(MiaPaCa2-P、PSN1-P)の網羅的解析により、薬剤耐性に関連する miR として miR-X を選択した。miR-X の強制発現/発現抑制による薬剤耐性の変化を確認し、その miR により制御されている蛋白質 Y が薬剤耐性に関わることも確認した。さらに膵癌切除標本 66 例を用いて蛋白質 Y の発現量と臨床経過を検討し、蛋白質 Y が塩酸ゲムシタビンの薬剤耐性に関与していることを証明した。本研究により miR-X/蛋白質 Y は塩酸ゲムシタビンによる膵癌治療の薬剤感受性の予測に有用であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：miRNA microarray analysis using gemcitabine-resistant clones of MiaPaCa2 (MiaPaCa2-RGs), PSN1 (PSN1-RGs), and their parental cells (MiaPaCa2-P, PSN1-P) was conducted. MiR-X was selected as a candidate for drug-resistance regulator. Changes in the anti-cancer effects of gemcitabine were studied after gain/loss-of-function analysis of the candidate miRNA. Further assessment of the putative target protein (protein-Y) was performed *in vitro* and in 66 pancreatic cancer clinical samples. The results indicate that miR-X regulates the resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine through protein-Y, suggesting that miR-X/protein-Y could be suitable for prediction of the clinical response in pancreatic cancer patients on gemcitabine-based therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：癌、マイクロ RNA、マイクロアレイ、薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

通常型膵臓癌（以下、膵癌）は 5 年生存率が 5%以下と極めて予後が悪く、現在、日本人の癌による死亡者数のうちの第 5 位を占め

ている。膵癌に対する唯一の根治的治療法は外科的切除であるが、たとえ肉眼的に切除できたとしてもその約 80%が 1~2 年以内に再発し患者を死に至らしめる。切除のみでは根

治が期待したいことから、近年では術前・術後に抗癌剤治療や放射線治療を併用する集学的治療が積極的に試みられている。

膵癌症例に対して術後の抗癌剤治療を行うことは十分に evidence の集積があり、今や標準治療となっている。一方で術前療法については、その治療のために手術時期が遅れるという欠点があるために、全例に行うには問題がある。しかし現時点では効果予測法がないままに術前治療が普及しはじめ、病理組織学的判定で効果が有効とされた症例では5年生存率が40~50%にも達する一方で、無効症例では術前治療中に遠隔転移が出現して手術そのものが不可能となる症例もあるために、効果予測法の確立は急務である。さらには感受性不良症例に対する増感剤 (chemoradiotherapy-sensitizer) の開発も急務であるが、感受性に関与する機序の解明がなされていない現時点では、創薬研究は全く進んでいない。以上より術前治療の感受性の臨床的判定法の開発および感受性制御機構の解明は、膵癌の予後の改善のための breakthrough となる。しかし術前治療の効果予測の報告は、僅かに本申請者 (研究代表者) らによって報告された、Microarray による網羅的遺伝子発現解析によって選択された癌部特異的遺伝子産物を末梢血で測定する方法があるのみである (Eguchi H, *et al.*, *Pancreas* 38(7), 791-798, 2009)。しかしこの方法も単独の遺伝子産物の測定によって予測をするためにその正確度 (accuracy) に問題が残る。

術前治療の感受性の判定が臨床で極めて重要であるにもかかわらず、臨床応用可能な方法が確立できていないのは、以下の様な理由があるからである。まず、これまでの膵癌における抗癌剤の感受性に関する研究のほとんどが細胞株を用いてなされてきたためにその臨床的実用性に問題があった。また、切除組織を使用した研究もなされてきたが、この手法は当然ながら切除後にしか判定できず、術前治療の効果予測には応用できない。膵癌においては治療前の癌組織 (原発巣) の十分な採取が困難であるという解剖学的な問題が、臨床応用可能な術前治療の感受性判定方法確立の妨げとなっている。

もし原発巣のかわりに末梢血にて感受性予測が可能となれば、その簡便さから急速に実用化しうことは明らかである。近年の Proteomics 技術の革新により、末梢血中の微量蛋白質を網羅的に測定し同定することは比較的容易になってきた。この新規 Technology を用いて新規の効果予測方法を構築することが期待されるが、実際には末梢血中の蛋白質には個人差が大きいことや夾雑物の混入が著しいことにより、薬剤耐性に関わる蛋白の同定は困難というのが実情で

ある。

わずか 22 ヌクレオチド程度の小さな RNA 配列である microRNA (miRNA) は近年急速に研究が進んでいる。近年、miRNA の癌部での発現量の変化が多数報告され、さらに癌細胞の抗癌剤感受性との関与が様々な種類の癌で報告されはじめている。今後は様々な癌腫で、臨床標本における miRNA の発現プロファイルを網羅的に検討することによって薬剤感受性にかかわる miRNA が同定されるものと思われる。

しかし膵癌組織における miRNA の発現解析の結果は、術前治療の感受性予測に応用することはできない。膵癌では手術前に原発巣が取れないという上述の解剖学的な根本的問題があるからである。一方近年、RNase が豊富に存在する末梢血中にも miRNA が多数存在し測定可能であるとの報告がなされてはじめている。さらにいくつかの癌腫の患者において、末梢血中の miRNA の発現プロファイルが正常者と有意に異なるとの報告も相次いでいる。現時点では原発巣の miRNA プロファイルと末梢血のそれとの関連性は全く未知であるが、膵癌症例においても原発巣と正常膵組織、あるいは患者末梢血と健常者末梢血の間には異なる miRNA の発現プロファイルが発現している可能性があり、さらにはそれを詳細に解析することにより膵癌の抗癌剤感受性をも予測できる可能性が十分にあると予測される。

2. 研究の目的

各種の悪性腫瘍において抗癌剤耐性機構に深く関わるものが近年明らかになってきた miRNA の膵癌における抗癌剤耐性機構との関連を *in vitro* および臨床試料を用いて解明し、さらに患者の末梢血での発現プロファイルを解析することにより、臨床応用可能な効果予測法を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)膵癌細胞株に対する miRNA の強制発現/発現抑制による薬剤耐性の変化の検討

miRNA のうちで他臓器の癌の薬剤耐性に関与すると報告されている miR-181b に関し、その発現が低い膵癌細胞株 (MiaPaCa2) に対して pre-miR-181b を用いて強制発現を、また発現の高い BxPC3, Panc1, PSN1 に対して anti-miR-181b を導入して発現抑制を行い、塩酸ゲムシタピンに対する薬剤感受性の変化を MTT 法にて測定する。

(2)miR-181b による薬剤耐性における apoptosis の関与の検討

FACS を用いて癌細胞の apoptosis の割合 annexin V/PI 法によって計測する。

(3)miR-181b が制御する蛋白質の同定と薬剤感受性への関与の検討

miR-181b が制御する蛋白質のうちで薬剤感受性に関与する可能性のあるものとして cylindromatosis (CYLD) に着目し、miR-181b を発現抑制/強制発現することによりその蛋白質量が変化するかどうか、またその際の薬剤耐性の変化を MTT 法にて評価する。

(4) 臨床検体を用いた CYLD 蛋白質の発現と予後、薬剤感受性に関する検討

大阪大学医学部附属病院にて切除術を施行した膵癌患者 49 症例の膵癌切除標本を用いて、免疫染色法にて CYLD の発現量と塩酸ゲムシタビンの薬剤感受性の関連を臨床データから解析する。

(5) 膵癌細胞株の網羅的解析による薬剤感受性に関与する miRNA の同定

我々が樹立した塩酸ゲムシタビンに対する耐性膵癌株 (MiaPaCa-2 細胞由来、PSN-1 細胞由来) およびその親株を用いて、miRNA の網羅的スクリーニングを施行する (東レ社製の高感度チップ 3D-Gene® を使用)。

(6) 薬剤感受性に関与する miR-X が制御する蛋白質 Y の同定

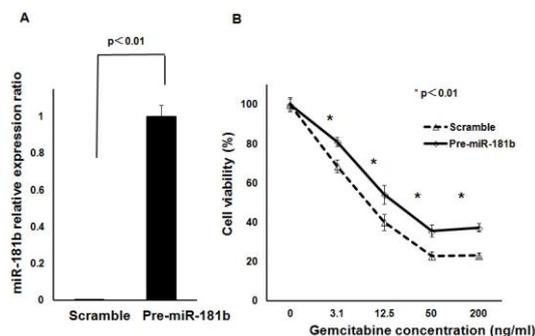
上記 (5) によって同定した薬剤感受性に関わる miR-X を細胞株に強制発現/発現抑制することにより、その下流で制御を受けている蛋白質 Y が変化するかどうか、さらに蛋白質 Y の変化により塩酸ゲムシタビンへの感受性が変化するかどうかを MTT 法にて測定する。

(7) 蛋白質 Y による抗癌剤感受性予測法構築

大阪大学医学部附属病院にて切除術を施行した膵癌患者の膵癌切除標本を用いて、免疫染色法にて蛋白質 Y の発現量を評価し、塩酸ゲムシタビンの薬剤感受性との関連を臨床データから解析する。

4. 研究成果

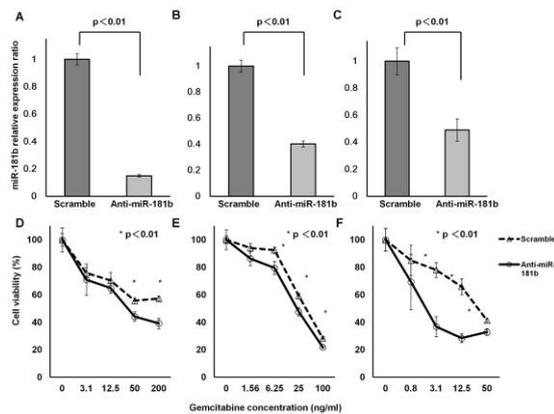
(1) 膵癌細胞株に対する miRNA の強制発現/発現抑制による薬剤耐性の変化の検討



【図1】MiaPaCa2 細胞に pre-miR-181b を用いて miR-181b を強制発現すると (A)、塩酸ゲムシタビンに対する薬剤感受性が有意に低下した (B)。

miR-181b の発現が低い膵癌細胞株 (MiaPaCa2) に対して pre-miR-181b を用いて強制発現を、また発現の低い BxPC3、Panc1、

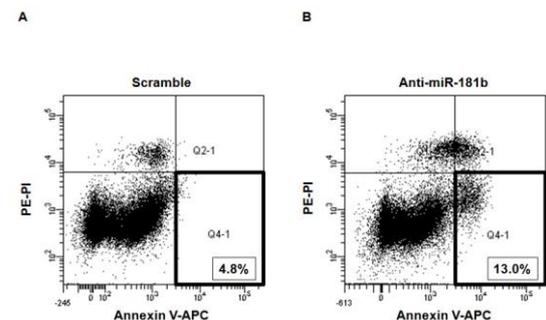
PSN1 に対して anti-miR-181b を導入して発現抑制をしたところ、miR-181b の多寡が抗癌剤 (塩酸ゲムシタビン) に対する感受性を規定していることが判明した (図 1、2)。



【図 2】BxPC3 (A、D)、Panc1 (B、E)、PSN1 (C、F) に anti-miR-181b を用いて発現抑制を行うと、塩酸ゲムシタビンに対する薬剤感受性は有意に上昇した。

(2) miR-181b による薬剤耐性における apoptosis の関与の検討

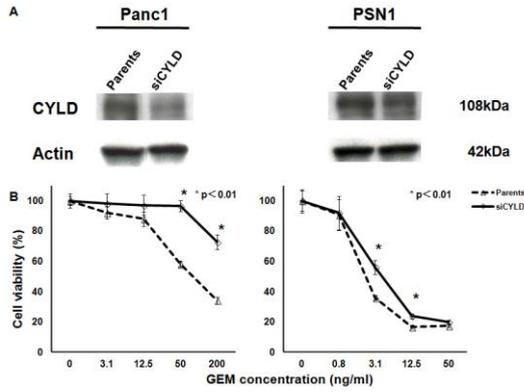
FACS を用いて癌細胞の apoptosis の割合を annexin V/PI 法によって計測したところ、miR-181b の発現を抑制することにより apoptosis の割合が増加していた (図 3)。



【図 3】anti-miR-181b を PSN1 細胞に導入し apoptosis 細胞数を計測したところ、コントロール群に比してその割合が上昇していた。

(3) miR-181b が制御する蛋白質の同定と薬剤感受性への関与の検討

miR-181b の抑制により、その下流で制御を受けていると報告されている cylindromatosis (CYLD) の蛋白質量が増加することを確認した。さらに CYLD を RNAi 法を用いて発現を抑制したところ、Panc1、PSN1 において薬剤感受性の上昇を認めた (図 4)。以上より、この経路が塩酸ゲムシタビンの薬剤感受性を制御している可能性が示唆された。



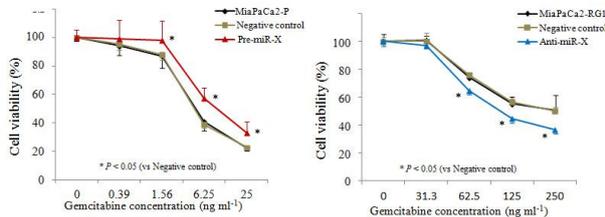
【図4】 siCYLDによりCYLDが減少することをPanc1細胞およびPSN1細胞を用いて確認し(A)、その条件下でMTT法により塩酸ゲムシタピンに対する感受性を評価したところ、siCYLDを作用させることにより薬剤感受性は低下した(B)。

(4) 臨床検体を用いたCYLD蛋白の発現と予後、薬剤感受性に関する検討

主病巣でCYLDが陽性の症例は49例中29例であった。これらのうち術後再発があり、さらに再発に対して塩酸ゲムシタピンによる治療を施行した14例で見ると、CYLD陽性症例は8例、陰性症例は6例であった。両群において再発後の生存期間（これは塩酸ゲムシタピンの有効性を見る指標となる）を比較したが、両群間に生存期間の有意差は見いだせなかった。

(5) 膀胱癌細胞株の網羅的解析による薬剤感受性に関するmiRNAの同定

網羅的解析の結果、Gemcitabine耐性株で3倍以上に発現が上昇しているmiRNAを17個、1/3以下に発現が低下しているmiRNAを10個同定した。これらの薬剤感受性に関する候補miRNAのうち、耐性株で有意差を持って発現上昇を認めていたmiR-Xについて、細胞株に強制発現および発現抑制することにより、薬剤感受性が変化することを確認した。

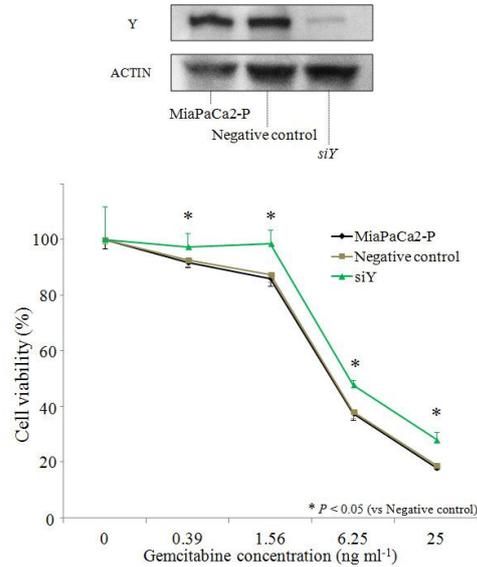


【図5】 MiaPaCa2親株にpre-miR-Xを導入すると塩酸ゲムシタピンに対する薬剤感受性は低下し(左図)、逆にMiaPaCa2から樹立したゲムシタピン耐性株にanti-miR-Xを導入すると薬剤感受性は上昇した(右図)。

(6) 薬剤感受性に関するmiR-Xが制御する蛋白質Yの同定

MiaPaCa2株においてmiR-Xの強制発現/発

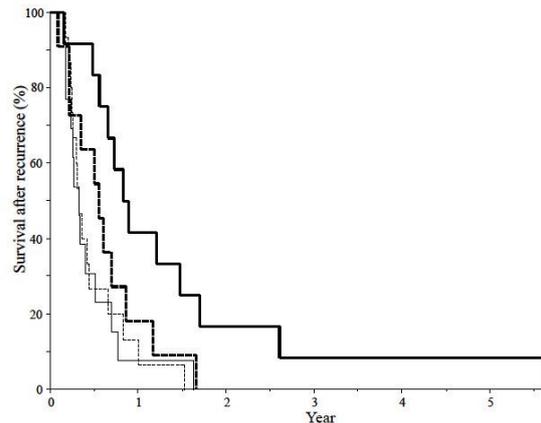
現抑制をしたところ、蛋白質Yの発現量が変化することを確認し、さらに蛋白質Yの遺伝子発現を抑制したところ抗薬剤に対する耐性が増すことが確認できた(図6)。



【図6】 MiaPaCa2株において蛋白質Yの遺伝子発現を抑制したところ、抗薬剤に対する感受性が低下した。

(7) 蛋白質Yによる抗薬剤感受性予測法構築

膀胱癌切除標本66検体における蛋白質Yの検討では、再発後に塩酸ゲムシタピンによる治療を行った症例において、蛋白質Yが陽性の症例の方が陰性症例より有意に予後が良好であった。一方、再発後に塩酸ゲムシタピンによる治療を行わなかった症例では、蛋白質Yの量は予後に無関係であった(図7)。



【図7】 再発後に塩酸ゲムシタピンによる治療を行った症例では、蛋白質Yの陽性の症例(太実線)の方が有意に陰性症例(太破線)より予後が良好であった。一方、再発後に塩酸ゲムシタピンによる治療を行わなかった症例では、蛋白質Yの量が多い症例(細実線)と少ない症例(細破線)の間で予後に有意差は無かった。

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)

[学会発表] (計4件)

①江口英利、永野浩昭、秋田裕史、瀧内大輔、和田浩志、濱直樹、川本弘一、小林省吾、森正樹、土岐祐一郎、膵癌のゲムシタビン耐性に関わる microRNA の同定と臨床応用の可能性、第113回日本外科学会総会、2013. 4. 11、福岡市

②岩上佳史、江口英利、秋田裕史、濱直樹、和田浩志、川本弘一、小林省吾、永野浩昭、森正樹、土岐祐一郎、膵癌細胞株における gemcitabine 耐性を制御する microRNA の同定と機能解析、第113回日本外科学会総会、2013. 4. 11、福岡市

③瀧内大輔、江口英利、和田浩志、川本弘一、小林省吾、丸橋繁、種村匡弘、永野浩昭、森正樹、土岐祐一郎、膵癌細胞株における gemcitabine 耐性と microRNA-181b との検討、第70回日本癌学会総会、2011. 10. 4、名古屋市

④瀧内大輔、江口英利、永野浩昭、和田浩志、小林省吾、丸橋繁、種村匡弘、森正樹、土岐祐一郎、膵癌細胞株における microRNA による抗癌剤耐性制御機構の検討、第111回日本外科学会総会、2011. 5、東京都(紙上開催)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 英利 (EGUCHI HIDETOSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90542118

(2) 研究分担者

永野 浩昭 (NAGANO HIROAKI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10294050

丸橋 繁 (MARUBASHI SHIGERU)
大阪府立成人病センター・その他部局等・その他
研究者番号：20362725

種村 匡 (TANEMURA MASAHIRO)
呉医療センター臨床研究部・その他部局等・その他
研究者番号：30379250

小林 省吾 (KOBAYASHI SHOGO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30452436