

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592012

研究課題名(和文) 癌間質相互作用を制御する膵星細胞関連miRNAの同定とその制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of pancreatic stellate cell associated-microRNA that suppress tumor-stromal interaction and clarification of its mechanism.

研究代表者

富永 洋平 (TOMINAGA, Yohei)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：90304823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌間質相互作用に関して、他の癌腫で報告のあるmiRNAに関して、癌関連膵星細胞(PSCs)での発現解析を行った。  
膵癌細胞株SUIT-2とPANC-1より樹立した高肝転移株(MS・MP)を用いて発現解析を行ったところ、親株と比較してMSでは、miR-125b-5p・miR-4324・miR-4706の発現増加を認め、miR-16-5p・miR-21-5p・miR-192・miR-194・miR-5100では発現低下を認めた。膵星細胞、膵癌高肝転移株、IPMNのmiRNAを解析することで、これらが予後規定因子としてのマーカーになり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed microRNAs of pancreatic stellate cells(PSCs) derived from pancreatic cancer and normal pancreas. Microarray showed miR-31 and miR-34a increased in cancer associated PSCs and miR-21 decreased compared with normal PSCs. Next, we established highly metastatic pancreatic cancer cells to identify the miRs that associate with metastasis. In highly metastatic SUIT-2 cells(MSCs), microarray showed that miR-125b-5p, miR-4324 and miR-4706 increased and miR-16-5p, miR-21-5p, miR-192, miR-194 and miR-5100 decreased in MSCs compared with parent cells. In highly metastatic PANC-1 cells(MPCs), miR-1247-3p, miR-2964a-5p and miR-3135b increased and miR-377-5p, miR-4454 and miR-5100 decreased in MPCs compared with parent cells. We have identified several miRNAs from pancreatic stellate cell, highly metastatic pancreatic cancer cells and IPMN that has possibility of becoming markers for prognostic value of pancreatic cancer.

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

膵癌は癌死の5位を占めながら現在でも100人中3人しか根治しない難治性疾患であり、膵癌治療法の開発は社会的要請度・緊急性・貢献度が高い。

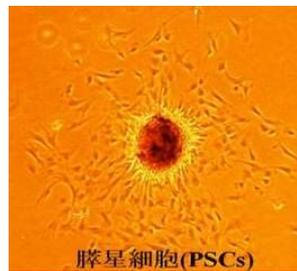
膵癌は固形癌の中でもとりわけ豊富な間質構造を有し、癌間質相互作用が膵癌の高い浸潤能、転移能、治療抵抗性に強く影響を与えている(Bhowmick, Nature, 2004)。近年、膵間質に存在する膵星細胞 (Pancreatic Stellate cells; PSCs)が同定され、種々の液性因子の分泌を介し膵線維化に関与することが明らかになった(Omary, J Clin Invest, 2007)。マウス共移植モデルで PSCs は膵癌細胞の増殖、浸潤、転移を促進することが示されており(Vonlaufen, Cancer Res, 2008)、PSCs の活性型である myofibroblast が膵癌の悪性形質を誘導する責任細胞として注目されている。また、癌組織中にある特定の微量細胞集団だけが腫瘍形成能を持つとする癌幹細胞の概念(Passegue, Nature, 2006)の提唱に伴い、癌幹細胞を周囲微小環境で支持する間質細胞(ニッチ)の存在も推測され、その相互作用が今後の新たな治療標的になると大きく期待されている(Kaplan, Nature, 2005)。

microRNA(miRNA)は20数個の塩基から構成される non-coding RNA であり、mRNA に結合して翻訳を抑制し、アポトーシス、分化、代謝など様々な細胞機能を制御している。miRNA の発現が癌の浸潤や転移にも関与しており、癌抑制遺伝子または癌遺伝子として機能することも明らかとなっている(Tavazoie, Nature, 2008)。しかし癌組織や、癌細胞における miRNA の機能的解析は多くの研究がなされてきた一方で、癌の進展に影響を与える癌関連繊維芽細胞における miRNA の働きに着目して研究し論じた報告は世界で1つもなかった。膵癌は特に豊富な間質を有しており、癌間質相互作用における miRNA の働きを解明することは膵癌進展のメカニズムを明らかにし、効果ある新規膵癌治療法を開発する上で避けては通れない課題であると考えられた。

2. 研究の目的

膵癌は特に豊富な間質構造を有しており、癌間質相互作用における miRNA の働きを解明することは膵癌進展のメカニズムを解明する上で大変重要と思われる。現在進んでいる癌細胞発現 miRNA を標的とした治療法開発に新たな視点を提供し、より有効な治療法開発につなげるべく、癌間質相互作用を制御する膵星細胞関連 miRNA の発現・機能解析を行う。

3. 研究の方法



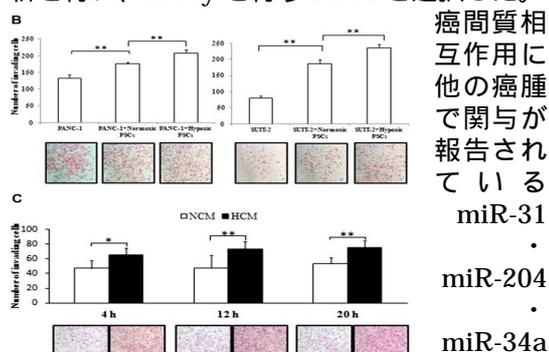
膵星細胞(PSCs)

ヒト PSCs が発現する miRNA の網羅的解析を行い、癌関連 PSCs に特異的な miRNA や癌間質相互作用、膵癌の浸潤・転移・予後と関連を示す key miRNA

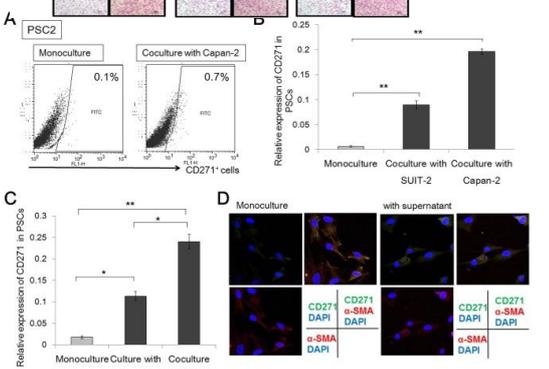
を同定する。続いて、これら key miRNA を培養 PSCs に導入し PSCs の増殖・遊走・蛋白分泌などの機能や、癌の増殖・浸潤・転移の促進機能に及ぼす影響を検討する。また、in vivo マウス膵同所共移植モデル、尾注遠隔転移モデルを用いて、癌細胞の生存・成長・浸潤・遠隔転移における PSCs 発現 miRNA の関与につき検討する。最後に、同定された key miRNA の抑制/強制発現や key miRNA の標的分子の抑制/強制発現により癌間質相互作用をターゲットとした新規分子標的治療の可能性を模索する。既存の癌関連 miRNA 標的治療との併用効果についても評価する。

4. 研究成果

癌関連 PSCs における miRNA の発現プロファイリングのため、膵癌組織由来 PSCs の樹立を行い、その癌間質相互作用に関する解析を行い、Array を行う PSCs を選択した。



癌間質相互作用に他の癌腫で関与が報告されている miR-31  
・  
miR-204  
・  
miR-34a



・ miR-21・miR-200c などの miRNA に関して、膵癌由来 PSCs での発現解析を行った。その結果、miR-31 は癌由来の PSCs で発現が増加していることを認めた。miR-204 は膵星細胞で癌細胞と同程度の発現を認めたが、癌由来と正常由来の膵星細胞の間で明確な発現の差は認められなかった。miR-34a

は癌細胞と比較して正常由来の膵星細胞で発現の増加を認め、さらに癌由来の膵星細胞で発現の増加を認めた。miR-21 は正常由来膵星細胞より癌由来膵星細胞で発現の低下を認めた。miR-200c は正常由来膵星細胞と癌由来膵星細胞とで明らかな差は認められなかった。

次に、膵癌の転移に関わる microRNA を同定するために、膵癌細胞株 SUIT-2 と PANC-1 より樹立した高肝転移株を用いて、miRNA 発現解析を親株との比較で行った。SUIT-2 の高肝転移株は、網羅的解析の結果 miR-4706・miR-4324・miR-125b-5p など親株と比較して有意な上昇を認め、miR-192・miR-194・miR-21-5p・miR-16-5p・miR-5100などで低下を認めた。PANC-1 の高肝転移株は、網羅的解析の結果 miR-2964a-5p・miR-3135b・miR-1247-3pなどで親株と比較して有意な上昇を認め、miR-377-5p・miR-5100・miR-4454などで低下を認めた。

さらに、膵癌やその間質のみならず前癌状態といわれている IPMN のサブタイプにおける miRNA の評価も追加し、腸型 IPMN はそれ以外の IPMN に比して miRNA196a が高発現していることを示した。

膵星細胞、膵癌高肝転移株、IPMN の miRNA を解析することで、これらが予後規定因子としてのマーカーになり得る可能性が示唆された。

## 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 4 件)

全て査読有

(1) Aso T, Ohtsuka T, Tamura K, Ideno N, Kono H, Nagayoshi Y, Ohuchida K, Ueda J, Takahata S, Shindo K, Aishima S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M. Elevated Expression Level of MicroRNA-196a Is Predictive of Intestinal-Type Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. *Pancreas*, 43(3), 361-366, 2013.

(2) Kenji Fujiwara, Kenoki Ohuchida, Takao Ohtsuka, Kazuhiro Mizumoto, Koji Shindo, Naoki Ikenaga, Lin Cui, Shunichi Takahata, Shinichi Aishima, and Masao Tanaka. Migratory activity of CD105+ pancreatic cancer cells is strongly enhanced by pancreatic stellate cells, *Pancreas*, 42(8)1283-90, 2013

(3) Daiki Eguchi, Kenoki Ohuchida, Shingo Kozono, Naoki Ikenaga, Koji Shindo, Lin Cui, Kenji Fujiwara, Shin Akagawa, Takao Ohtsuka, Shunichi Takahata, Shoji Tokunaga, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka. MAL2 expression predicts distant metastasis and short survival in pancreatic cancer, *Surgery*, 154(3) 573-82, 2013

(4) Fujiwara K, Ohuchida K, Mizumoto K, Shindo K, Eguchi D, Kozono S, Ikenaga N, Ohtsuka T, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. CD271+ subpopulation of pancreatic stellate cells correlates with prognosis of pancreatic cancer and is regulated by interaction with cancer cells. *PLoS One*. 7(12):e52682.

〔学会発表〕(計 4 件)

(1)安蘇鉄平、腸型膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)における microRNA-196a の高発現、第 113 回日本外科学会定期学術集会(2013)

(2)藤原謙次、膵癌における CD271 陽性膵星細胞の意義、第 112 回日本外科学会定期学術集会(2012)

(3) 池永直樹、CD10 陽性膵星細胞は膵癌の進展を促進する、第 111 回日本外科学会定期学術集会(2011)

(4)小藺真吾、膵癌における膵星細胞およびその癌間質相互作用を標的とした新しい膵癌治療の可能性、第 22 回日本消化器癌発生学会総会(2011)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

佐藤 典弘 (SATO Norihiro)  
産業医科大学・医学(系)研究科(研究院)・  
助教  
研究者番号：20423527  
(2011年)

上田 純二 (UEDA Jynji)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：90529801  
(2011年)

難波江 俊永 (NABAE Toshinaga)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：10467889

(3)連携研究者

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