

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592030

研究課題名(和文)胆嚢癌の発癌に関わるmiRNA発現解析、浸潤・転移能機能解析及び新規治療法の開発

研究課題名(英文)MicroRNA expression in gallbladder cancer; effect on malignant behavior and target for the treatment

研究代表者

高畑 俊一(TAKAHATA, Shunichi)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50437779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：胆嚢癌切除標本と正常胆嚢との間でmiRNA発現の比較解析を行い、miRNA-155に注目して研究を行った。26例の胆嚢癌切除標本の発現解析を行ったところ、正常群より有意にmiRNA-155の発現が高かった。臨床病理学的因子との相関を見ると、miRNA-155高発現群の予後は発現群より有意に不良で、特にUICC stage 0-1ではmiRNA-155高発現が独立した予後規定因子であった。また胆嚢癌細胞株を用いて、miRNA-155発現を抑制すると、細胞株の浸潤能と遊走能が有意に低下した。よってmiRNA-155高発現は胆嚢癌悪性度と関連し、新たな予後予測因子、治療標的のなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to explore the expression profile of miRs and to evaluate the clinical significance of miRs expression in GBC. MiRs profile of surgically resected GBCs(n=26) and the GB with PBM(n=13) were assessed by microarray. Normal GBs(n=17) were also used as control. Up-regulated miR was subjected to quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The relationship between expression level of miR and clinicopathological features was analyzed. Microarray showed up-regulation of 25 miRs in GBCs. Among them, miR-155 was significantly overexpressed in GBCs than in GB with PBM(p=0.007) or normal GB(P=0.04). High expression level of miR-155 in GBCs was significantly associated with the presence of lymph node metastases(p=0.01) and poor prognosis (p=0.02). PBM did not affect regulation of miR-155. Thus, high miR-155 expression might correlate with aggressive behavior of GBCs and miR-155 would become a prognostic marker as well as a therapeutic target of GBCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胆嚢癌 miRNA 膵胆管合流異常 発癌 癌悪性度

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は罹患数が近年増加してきており、現在本邦でのがんによる死亡数の第6位を占め、罹患死亡率は90%以上と極めて予後不良である。特に胆道癌の多くを占める胆嚢癌は進行癌で発見される頻度が高い上に、生物学的悪性度が極めて高く、その対応が急務である。胆嚢癌の危険因子として膵胆管合流異常があり、逆流した膵液中ホスホリパーゼ 2A が胆汁内ホスファチジルコリンを上昇させ胆道粘膜の発癌を誘導すると考えられている。したがって膵胆管合流異常に合併した胆嚢癌の遺伝子解析を行えば、胆嚢癌の発癌過程を解明するとともに、その診断、治療にも応用することができる可能性がある。

microRNA(miRNA)は20数個の塩基からなる、蛋白質へ翻訳されないRNAとして発見され、現在まで600種以上が報告されている。miRNAはその配列と相補的な関係にあるメッセンジャーRNA(mRNA)に結合して、その蛋白発現を抑制することで機能を発揮する。癌においてはmiRNAの過剰発現あるいは発現抑制により、アポトーシス、増殖、浸潤、分化、代謝などの細胞機能が調節されていると考えられている。miRNAによる癌細胞の機能調節に関する報告は消化管癌や乳癌、前立腺癌、膵癌などで行われているが、胆嚢癌におけるmiRNAの役割に関する報告は国内外を通じて無い。さらに早期胆嚢癌発見に関してはmiRNAのみならずmRNAや蛋白質マーカーの同定や臨床診断への応用も報告されていない。

膵胆管合流異常は日本を含む東アジアでの頻度が高く、合流異常に関連した胆嚢癌の臨床・遺伝子解析はこれまで本邦を中心に行われてきた。胆汁内のmiRNA解析が胆嚢癌の診断に有用であれば、胆嚢癌の早期発見が期待でき、さらには進行胆嚢癌での胆汁内miRNA解析が切除範囲決定や放射線・化学療法などの治療法選択の重要な情報源となる可能性もある。

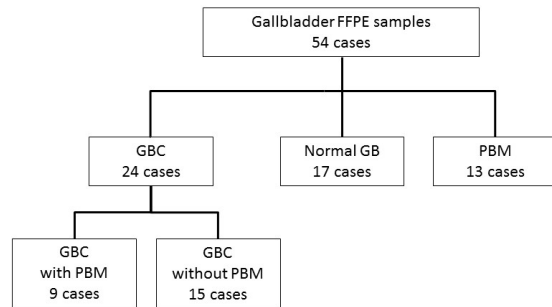
2. 研究の目的

胆嚢癌の発癌過程や悪性度獲得過程を、膵胆管合流異常に注目してmicroRNAという新規のmoleculeを切り口として解明していく。特に発癌過程や悪性度に重要な働きをするmicroRNAについては詳細な分子生物学的解析を行い、臨床応用へ向けた実用化を目指す。具体的には胆汁を用いた解析が有望であり、胆汁内microRNAの解析により胆嚢癌の早期診断および治療法決定を行うシステム構築を目標とする。

3. 研究の方法

スクリーニングとして胆嚢癌切除標本からRNAを抽出してマイクロアレイ法で網羅的にmiRNAの発現解析を行い、異常発

現の見られたmiRNAの機能および臨床的意義を解明する。機能解析は細胞株およびマウスを用いた実験を行う。また豊富な臨床症例の臨床・病理学的特長とmiRNAの発現量との関係も調べる。さらに胆汁内のmiRNA解析により胆嚢癌の診断、悪性度評価が実臨床で行えるようなシステム構築を目指す。本研究の対象患者は下記のように54例の胆嚢切除例である。

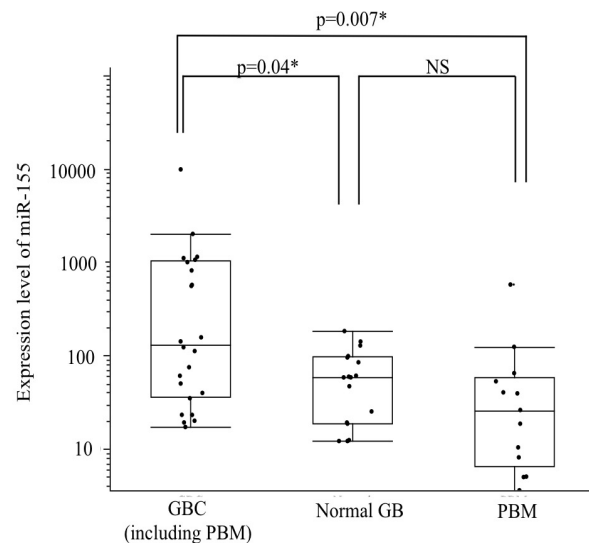


4. 研究成果

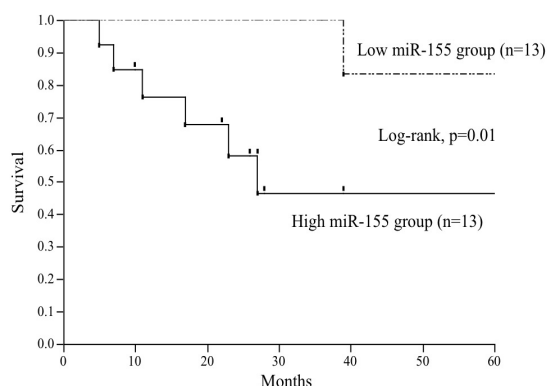
胆嚢癌切除標本と正常胆嚢との間でmiRNA発現の比較解析をマイクロアレイ法で行い、胆嚢癌で異常高発現を認めたmiRNAなかで、miRNA-155に注目して研究を行った(下図)。

|  | Up-regulated<br>(>2.0-fold change)            | Down-regulated<br>(<2.0-fold change) |
|--|---|--------------------------------------|
| GBCs                                     | 25 miRs<br>(19 miRs with a > 3.0-fold change) | 63 miRs                              |
| Non-cancerous<br>gallbladder with<br>PBM | 22 miRs                                       | 92 miRs                              |

26例の胆嚢癌切除標本のmiRNA-155発現解析を行ったところ、正常群より有意にmiRNA-155の発現が高かった(下図)。



次に臨床病理学的因子との相関を見ると、miRNA-155 高発現群の予後は発現群より有意に不良で、特に UICC stage 0-I では miRNA-155 高発現が独立した予後規定因子であった(下図、下表)。



| Variables               | Hazard Ratio | 95%CI     | p-value |
|-------------------------|--------------|-----------|---------|
| High miR-155 expression | 20           | 1.33-708  | 0.02    |
| T category (Tis-T2)     | 2.6          | 0.31-22.8 | 0.36    |
| Lymphatic invasions     | 1.4          | 0.24-9.32 | 0.65    |
| Vascular invasions      | 6.7          | 0.51-187  | 0.15    |

また胆嚢癌細胞株を用いて、miRNA-155 発現を抑制すると、細胞株の浸潤能と遊走能が有意に低下した(下図)。

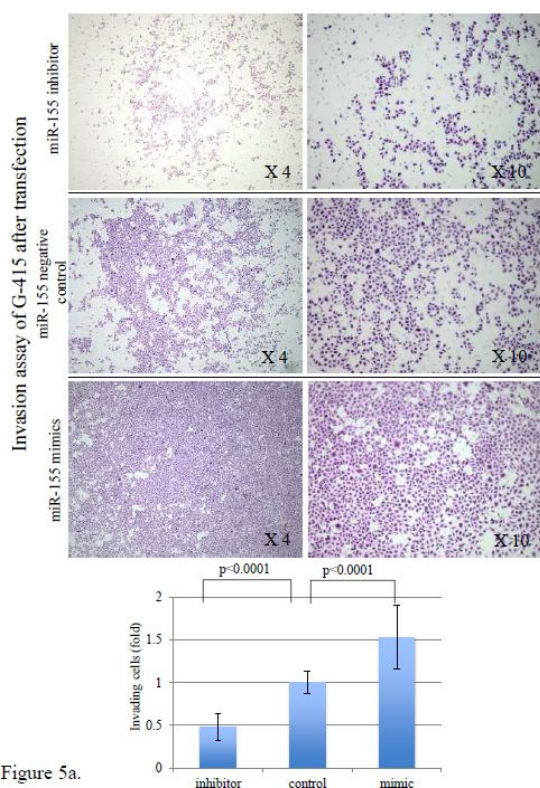


Figure 5a.

以上より、miRNA-155 高発現は胆嚢癌悪性度と関連し、新たな予後予測因子あるいは治療標的のな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3件)

- 高畑俊一、大塚隆生、宮坂義浩、山田大輔、水元一博、清水周次、田中雅夫. 先天性胆道拡張症に対する腹腔鏡下胆管切除再建術. 胆と膵 35(11); 1267-1270, 2014. 査読無
- 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, 2014. 査読有  
DOI: 10.1097/MPA.0000000000000042
- Kono H, Nakamura M, Ohtsuka T, Nagayoshi Y, Mori Y, Takahata S, Aishima S, Tanaka M. High expression of microRNA-155 is associated with the aggressive malignant behavior of gallbladder carcinoma. *Oncology Reports* 30(1); 17-24, 2013. 査読有  
DOI: 10.3892/or.2013.2443

[学会発表](計4件)

- 河野博、中村雅史、大塚隆生、藤野稔、田村公二、井手野昇、安藤鉄平、永吉洋介、上田純二、高畑俊一、小田義直、田中雅夫. 膵・胆管合流異常と胆嚢癌における microRNA 発現解析. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013 年 4 月 11 日~13 日、福岡.
- 高畑俊一、大塚隆生、上田純二、水元一博、清水周次、田中雅夫. 成人先天性胆道拡張症に対する腹腔鏡下手術の成績. 第 67 回日本消化器外科学会総会. 2012.7.18. 富山.
- 井手野昇、大塚隆生、河野博、安藤鉄平、永吉洋介、森泰寿、上田純二、高畑俊一、田中雅夫. 胆嚢癌疑い例の術前内視鏡的経鼻胆嚢ドレナージによる胆嚢内胆汁細胞診の検討. 第 83 回日本消化器内視鏡学会総会. 2012.5.13. 東京.
- 河野博、大塚隆生、井手野昇、安藤鉄平、永吉洋介、森泰寿、高畑俊一、中村雅史、田中雅夫. 胆嚢癌疑い例の術前診断における胆汁アミラーゼ値の意義. 第 83 回日本消化器内視鏡学会総会. 2012.5.13. 東京.

〔図書〕(計1件)

1. 大塚隆生、高畑俊一、田中雅夫. 先天性胆道拡張症の手術. 「腹腔鏡下消化器外科手術標準手技シリーズ 3 胆道・膵臓」北野正剛、山下雄一編集. P45-56、メジカルビュー社、東京、2015.

〔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：  
出願年月日：  
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

高畑 俊一 (TAKAHATA Shunichi)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：50437779

### (2) 研究分担者

大塚 隆生 (OHTSUKA Takao)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：20372766

上田 純二 (UEDA Junji)  
佐賀大学・医学部・准教授  
研究者番号：90529801  
(2012～2013年)

### (3) 連携研究者

なし