

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790674

研究課題名(和文)膵癌微小環境中の炎症持続因子の同定と治療応用

研究課題名(英文)Targeting continuous inflammation in pancreatic cancer microenvironment

研究代表者

濱田 晋 (HAMADA, Shin)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20451560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膵癌進展に貢献する微小環境中の炎症持続因子の同定と治療応用のため、IPMNに比べ浸潤性膵癌で発現が増加しているmicroRNAの機能解析を行った。そのうち、miR-365はゲムシタピン処理後の細胞生存性を増加させた。miR-365導入による遺伝子発現プロファイルの変化を解析したところ、炎症性シグナルのメディエーターであるNF- κ B経路の標的遺伝子の発現増加が確認され、活性化型NF- κ Bの発現レベルが増加することが判明した。また、miR-365はアポトーシス関連分子であるSHC1およびBAXを直接標的としており、これらの分子の発現抑制がゲムシタピン耐性の誘導に寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We assessed the effect of forced expression of miR-365, which was highly expressed in invasive pancreatic cancer compared with IPMN. miR-365 increased the cell viability of pancreatic cancer cells after the gemcitabine treatment, suggesting the induction of resistance. A comprehensive analysis of gene expression profiles in miR-365 introduced cells identified up-regulation of several NF- κ B target genes. Activation of NF- κ B pathway was confirmed by the increased expression of phosphorylated NF- κ B. On the other hand, miR-365 directly targeted apoptosis-related molecules such as SHC1 and BAX that led to the gemcitabine resistance.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：microRNA アポトーシス 炎症性シグナル

1. 研究開始当初の背景

膵癌は早期に周辺臓器への直接浸潤や遠隔転移を形成するために根治手術が困難であり、切除可能例は全体の20%以下にとどまるうえ、手術例の生存率も不良である。膵癌の早期発見は画像診断技術の向上にもかかわらずいまだに困難であり、効率的なスクリーニング方法が模索されている。新規発症の糖尿病や慢性膵炎は膵癌の代表的なリスクファクターであることが知られており、特に慢性的な膵の炎症が長期間持続する遺伝性膵炎においては膵癌のリスクが増大することが明らかとなっている。このような知見に基づき炎症の存在が膵発癌を促進する作用を有することが推測されてきたが、近年までその証明は困難であった。

膵発癌への炎症の寄与が膵癌モデルマウスを用いて証明されたのは2007年のことである。Guerra Cらは膵腺房細胞特異的に活性化型変異*K-Ras* (G12V)を発現するモデルマウスを用い、セルレイン投与による慢性膵炎を付加することで発癌が促進されることを報告した。更にこれらの過程には癌遺伝子の活性化によって誘導される細胞老化が炎症の存在によって抑制されることが重要であることが判明している。しかしながら膵癌の進展過程において、炎症を持続させる因子については未解明な点が多い。

浸潤性膵癌は豊富な間質を有し、膵癌の進展には炎症の惹起による間質細胞の活性化が重要であると考えられる。近年、non-coding RNAであるmicroRNAは多数の標的遺伝子を網羅的に制御していることが報告されており、細胞機能を制御する鍵となることが示されているため、膵癌の浸潤性増殖に関わるmicroRNAを同定することは重要であると考えられる。IPMNは浸潤性膵癌とは組織学的に異なる発育形態を呈し、膵癌にみられるようなdesmoplasiaを形成することはまれである。そこで我々は過年度の研究において膵癌の浸潤性増殖に関わるmicroRNAを同定するために膵癌およびIPMA、IPMC手術例の凍結切片を用いてLASER-captured microdissectionを行い、発現プロファイルと比較した。その結果、浸潤性膵癌で有意な発現変動を認めるmicroRNAとして、乳癌細胞の浸潤性に関与することが報告されているmiR-145の発現低下や、膵癌細胞の浸潤性を増強することが報告されているmiR-21の発現増加が確認された。この検討ではこれら以外にも膵癌での機能が判明していない複数のmicroRNA発現レベルの変化が確認されている。

今回の検討では、これらのmicroRNAのうち膵癌組織中の炎症プロセスに関与するものを特定し、その標的遺伝子と機能解析を行うこととした。特定された因子について、膵癌組織内の持続的な炎症を標的とした新規治療開発へ応用することを目標として基礎的な検討を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、IPMNと浸潤性膵癌の腫瘍腺管におけるmicroRNA発現プロファイルの比較により得られた結果に基づき、膵癌促進的に作用する炎症性シグナルに関与する新たな分子機構を特定するために以下の検討を行った。

(1) ヒト膵癌細胞株へmicroRNA precursorを強制発現し、細胞生存率の検討により膵癌進展に有利に作用するmicroRNAの絞り込みを行った。

(2) 膵癌細胞の生存率向上に貢献したmicroRNAについて、導入細胞における遺伝子発現プロファイルの網羅的解析を行った。

(3) microRNA導入により影響を受ける細胞内の炎症性シグナルについて検討を行った。

(4) 膵癌細胞の生存率を向上させることが確認されたmicroRNAの標的遺伝子同定と機能の特定を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト膵癌細胞株AsPC-1およびPanc-1は10% FBS添加Dulbecco's modified Eagle's mediumで、5% CO₂ incubator中で37°Cにて培養した。

(2) 膵癌細胞株におけるmicroRNA強制発現過年度の研究結果より浸潤性膵癌での高発現が認められたmicroRNA、miR-365の強制発現をPre-miRTM miRNA Precursor (Life Technologies Japan)を用いて行った。Precursorの導入はLipofectamine2000 (Life Technologies Japan)を使用したリポフェクションにて行った。コントロール処理としてはPre-miRTM miRNA Precursor Molecules Negative Control (Life Technologies Japan)を使用した。

(3) ゲムシタピン処理後の膵癌細胞生存率の評価

miR-365強制発現を行った膵癌細胞株について各種濃度のゲムシタピンを投与した。投与72時間後の細胞生存率をMTTアッセイにて評価した。

(4) microRNA導入後の遺伝子発現プロファイルの網羅的解析

miR-365強制発現細胞における遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイにて網羅的に解析した。マイクロアレイはAgilent社のWhole Human Genome oligo DNA microarray (4X44K) v2.0を使用した。有意な発現変動を認めた遺伝子の抽出にはZ-scoreを算出し、Z-score \geq 2.0かつ発現変動比1.5以上を発現増加、Z-score \leq -2.0かつ発現変動比0.66以下を発現低下と定義した。

(5) miR-365強制発現による炎症性シグナルへの影響評価

miR-365強制発現細胞において、炎症性シグナルのメディエーターであるNF κ B経路の活性化をリン酸化型NF κ BおよびI κ B α のウェスタンブロットにて評価した。

(6) miR-365 標的遺伝子の推定
miR-365 標的遺伝子の推定は Targetscan database (<http://www.targetscan.org/>) を用いて行った。

(7) miR-365 と標的 mRNA の直接相互作用の確認

miR-365 標的遺伝子の mRNA 3' UTR に存在する miR-365 と相互作用し得る配列について、pmirGLO vector (Promega) にサブクローニングして翻訳抑制効果を確認した。同配列の変異導入により抑制効果が解除されるかについても検討した。

(8) 膵癌細胞株における BAX、SHC1 ノックダウンが細胞生存率に及ぼす影響の検討
miR-365 の直接標的であることが判明した BAX、SHC1 について ON-TARGET plus SMARTpool siRNA (Dharmacon) を使用し、Lipofectamine2000 を用いた transfection (最終濃度 100nM) にてノックダウンを行った。BAX、SHC1 ノックダウン細胞にゲムシタビン処理を行い、投与 72 時間後の細胞生存率を MTT アッセイにて評価した。

4. 研究成果

(1) 膵癌細胞における miR-365 の機能
IPMN に比べ浸潤性膵癌で発現が上昇している microRNA のうち、癌細胞での機能が明らかとなっていない miR-365 についてヒト膵癌細胞株 Panc-1、AsPC-1 で強制発現実験を行った。miR-365 を導入した Panc-1、AsPC-1 ではゲムシタビン処理後 72 時間後の細胞生存率が増加しており、ゲムシタビン耐性が誘導されたものと考えられた (図 1)。

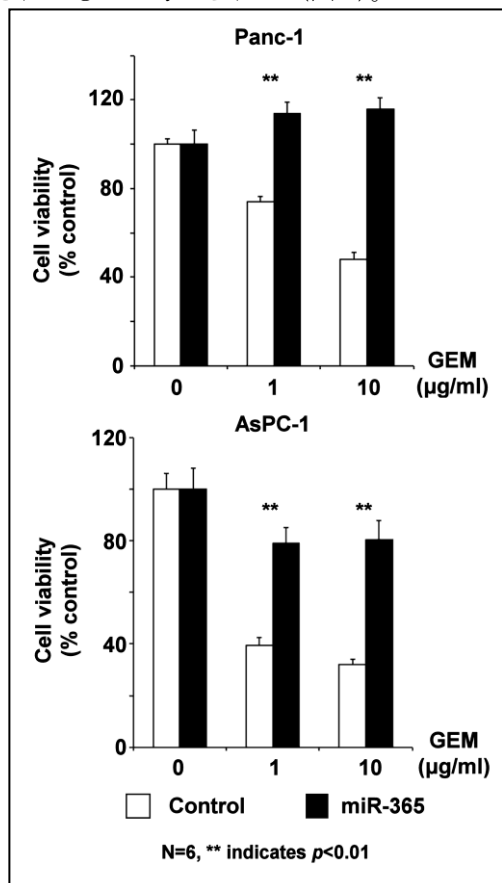


図 1

(2) miR-365 導入による遺伝子発現プロファイルの変化

miR-365 を導入した Panc-1、AsPC-1 における遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイにて網羅的に解析した (図 2)。

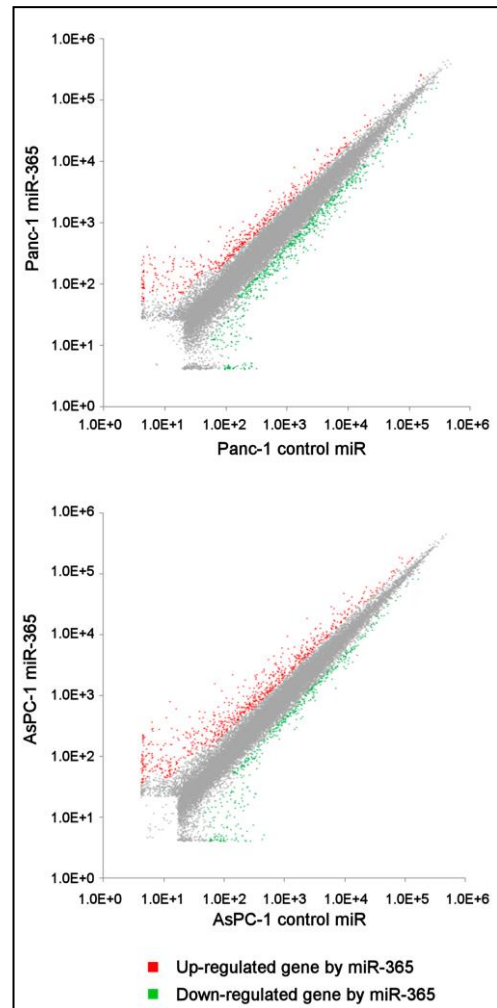


図 2

Panc-1、AsPC-1 で共通して有意な発現増加を認めた遺伝子としては *HSP90AA1*、*IRF7*、*SNAIL1* などの NF κ B 標的遺伝子が多数含まれていた。また、有意な発現低下を認めた遺伝子としては *SHC1* や *BAX* といった、ミトコンドリアに存在する蛋白をコードするアポトーシス関連遺伝子が含まれていた。この解析から、miR-365 は細胞生存に有利に作用する microRNA であることが推測された。

(3) miR-365 強制発現による NF κ B 経路活性化の確認

miR-365 導入により複数の NF κ B 標的遺伝子の発現が上昇していたため、NF κ B 経路の活性化をウェスタンブロットで確認した。図 3 に示すごとく、NF κ B の抑制因子である I κ B α 発現は miR-365 導入により減少し、活性化型であるリン酸化型 NF κ B の発現が増加していることを確認した。これまでの結果から、miR-365 は膵癌細胞内において炎症性シグナルを活性化し、細胞生存に関わる複数の遺伝子発現を網羅的に制御していることが示唆された。

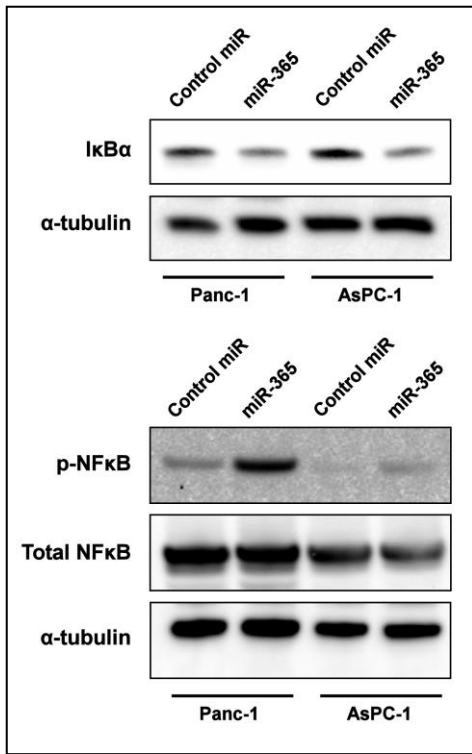


図 3

(4) miR-365 標的遺伝子の推定・SHC1/BAX 発現抑制の確認

TargetsCan database を用いて miR-365 標的遺伝子の推定を行ったところ、マイクロアレイにて有意な発現低下を認めていた SHC1、BAX の mRNA が miR-365 と相互作用しうる 3' UTR 配列を有することが判明した(図 4)。

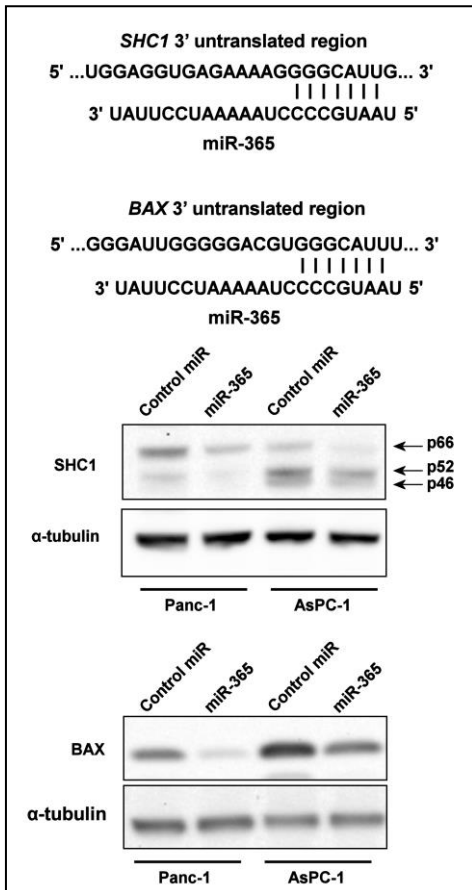


図 4

miR-365 を導入した Panc-1、AsPC-1 ではウェスタンブロットにて SHC1 および BAX の発現が減少していることが確認された(図 4)。

(5) SHC1 および BAX mRNA と miR-365 の直接相互作用の確認

SHC1 および BAX の mRNA に存在する 3' UTR 配列をルシフェラーゼレポーターにサブクローニングし、miR-365 との相互作用を確認した。図 5 に示すように、SHC1 あるいは BAX の 3' UTR 配列を含むレポーターベクターの活性は miR-365 により抑制されたが、miR-365 結合配列の変異によりその効果は消失した。この検討から、SHC1 および BAX mRNA の 3' UTR 配列は miR-365 と直接相互作用することが明らかとなった。

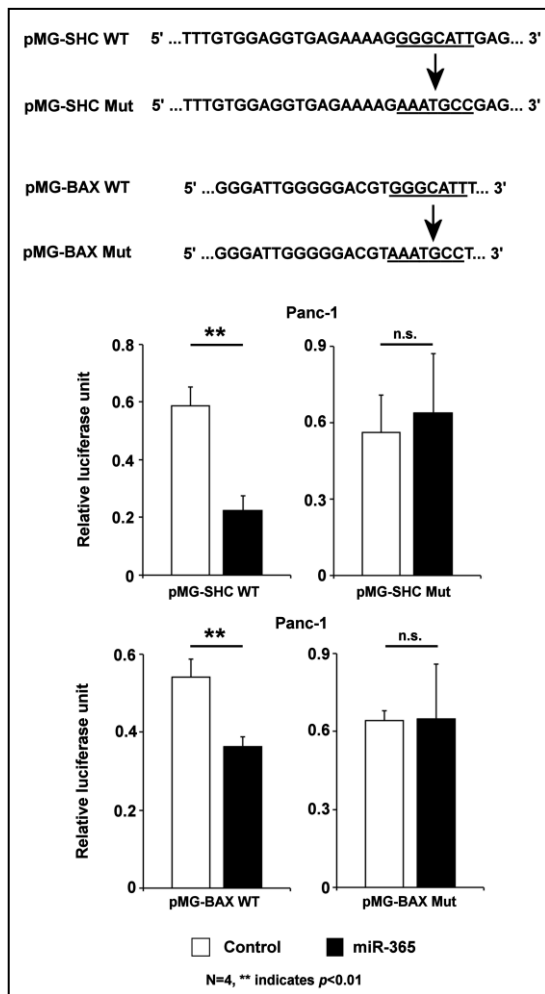


図 5

(6) SHC1・BAX ノックダウンが細胞生存率に及ぼす影響の検討

miR-365 の標的遺伝子である SHC1 および BAX の発現レベルがゲムシタピン処理後の細胞生存性に寄与しているかを検討するため、siRNA によるノックダウン実験を行った。Panc-1、AsPC-1 への SHC1 に対する siRNA 導入により、SHC1 のすべての isoform の発現レベルは著明に抑制された(図 6)。SHC1 ノックダウンを行った Panc-1、AsPC-1 ではゲムシタピン処理後の細胞生存率が增加しており、ゲムシタピン耐性が誘導されたものと考えられた。

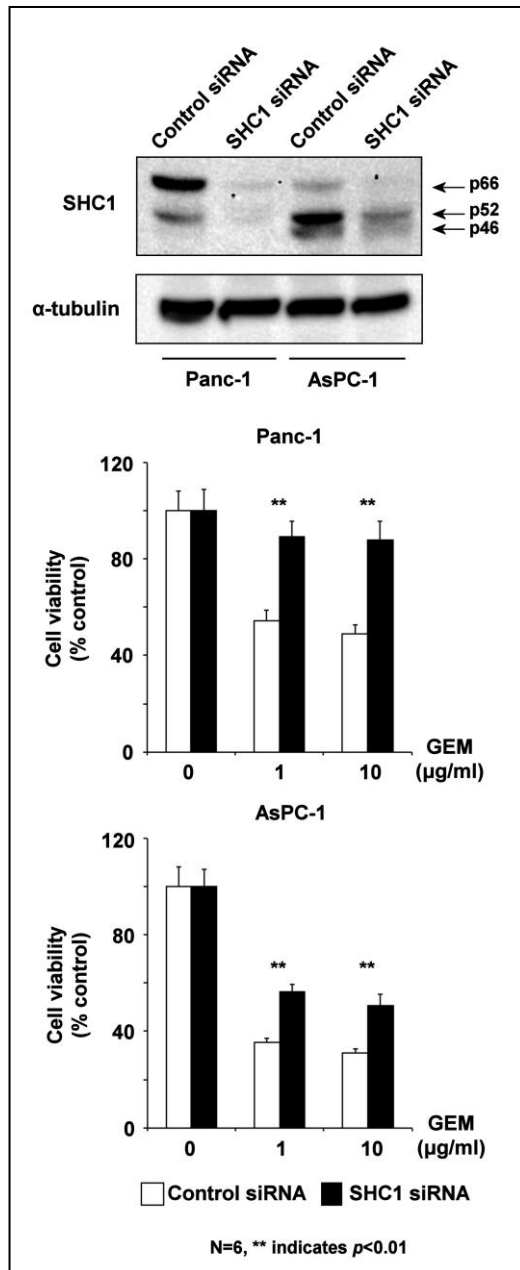


図 6

同様の実験を BAX についても行った。siRNA 導入により、Panc-1、AsPC-1 での BAX 発現は著明に抑制された。BAX ノックダウンを行った Panc-1、AsPC-1 ではやはりゲムシタビン処理後の細胞生存率が増加しており、耐性が誘導されていた (図 7)。SHC1 および BAX はミトコンドリアに存在し、それぞれ cytochrome c の放出や reactive oxygen species の産生によりアポトーシスを誘導する因子である。今回の研究により、浸潤性膵癌で高発現がみられる microRNA、miR-365 はミトコンドリアに存在するアポトーシス関連蛋白を標的とし、膵癌細胞の化学療法抵抗性に寄与する因子であることが明らかとなった。以上の知見は膵癌細胞内での炎症性シグナル活性化や細胞生存のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、今後新たな治療戦略を開発するうえで一助となることが期待される。

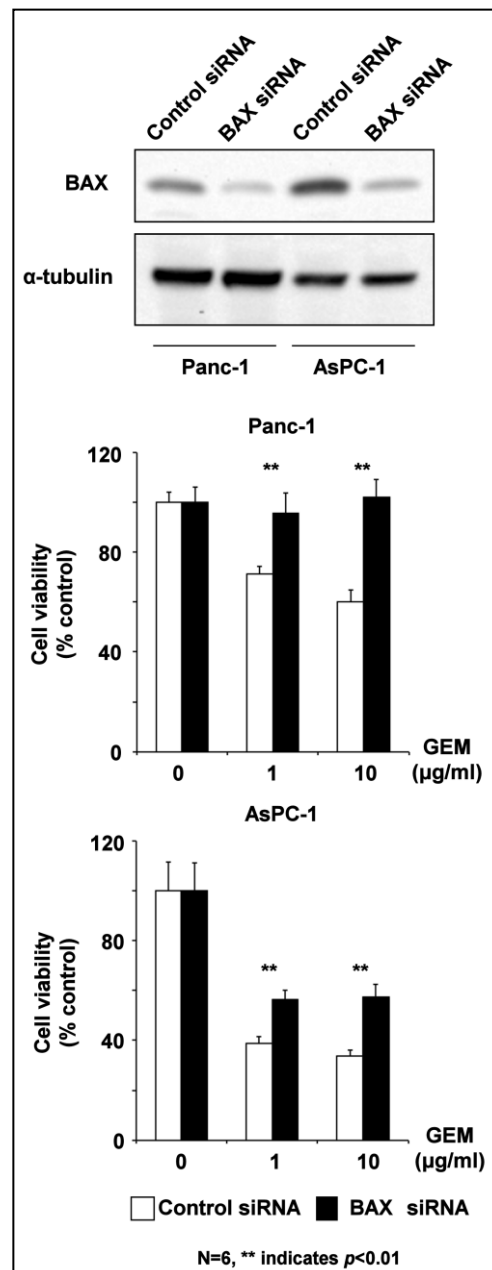


図 7

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 2 件)

1. Hamada S, Masamune A, Miura S, Satoh K, Shimosegawa T.

MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX.

Cell Signal. 2014;26(2):179-185.

doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.003.

査読有

2. Hamada S, Satoh K, Miura S, Hirota M, Kanno A, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Unno J, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T.

miR-197 induces epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by targeting p120 catenin.
J Cell Physiol. 2013;228(6):1255-1263.
doi: 10.1002/jcp.24280.
査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 濱田晋 佐藤賢一 正宗淳 菅野敦 菊田和宏 糸潔 廣田衛久 下瀬川徹
MiR-365 によるゲムシタピン耐性誘導機構の検討
JDDW 2013 東京 2013 年 10 月 9 日

2. Hamada S, Satoh K, Masamune A, Kanno A, Kikuta K, Kume K, Unno J, Hirota M and Shimosegawa T.
MiR-365 indirectly regulates drug resistance-related molecule Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator expression in pancreatic ductal adenocarcinoma cells.
DDW2013 Orlando USA 2013 年 5 月 19 日

3. Hamada S, Satoh K, Masamune A, and Shimosegawa T.
Identification of inflammatory signal-stimulating microRNA in pancreatic duct cell carcinoma.
JSGE-ITC 2013 鹿児島 2013 年 3 月 23 日

4. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Unno J and Shimosegawa T.
Identification of invasion-related microRNAs in pancreatic cancer by comprehensive analysis.
UEGW 2012 Amsterdam Netherlands 2012 年 10 月 23 日

〔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〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 晋 (Shin Hamada)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20451560

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者