

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462111

研究課題名(和文) 膵癌の癌細胞-癌間質におけるmicroRNA相互作用の解明と薬剤耐性克服法の構築

研究課題名(英文) Investigation of microRNA interaction between pancreatic cancer cells and the stromal cells aiming to overcome the resistance to chemotherapeutic drugs.

研究代表者

江口 英利 (Eguchi, Hidetoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90542118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゲムシタピン耐性膵癌細胞株を樹立し、耐性に関わるmiRNAとしてmiR-320cを選出した。miR-320cの標的遺伝子のうちSMARCC1に着目し、膵癌切除標本を用いてその発現を検討したところ、陽性例において予後が良好であった。

次に低酸素下で培養した膵癌細胞株から回収したexosomeをhuman dermal fibroblast (HDF)に添加し、通常酸素下で培養した細胞株から回収したものを添加する場合よりも、 $\alpha$ -SMAの発現が上昇することを証明し、さらに $\alpha$ -SMAの発現が上昇したHDFを別の膵癌細胞に添加することにより、膵癌細胞の増殖率や浸潤能が上昇することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells, and miR-320c was selected as a responsible miRNA for the drug-resistance by microarray analysis between the resistant cells and its parental cells. Among the target genes for miR-320c, SMARCC1 was investigated by immunohistochemistry, and was shown to have a positive correlation to a better survival. Exosomes derived from pancreatic cancer cells cultured in a hypoxic condition was added to human dermal fibroblasts (HDFs), and the expression level of  $\alpha$ -SMA in HDFs was more obviously increased than the exosomes derived from cells cultured in normal condition. Moreover, the addition of HDFs with increased  $\alpha$ -SMA to another pancreatic cancer cells has shown to increase the growth rate and invasiveness.

研究分野：消化器外科学

キーワード：microRNA 癌間質 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

通常型膵臓癌（以下、膵癌）は、5年生存率が約5%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ても約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がたいことから、近年では根治切除例でも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、その有効性が明確になってきている (Evans DB, *et al.*; J Clin Oncol 2008, 3496-502.)。その一方で、たとえば手術しえても抗癌剤治療や放射線治療に耐性を示す症例は予後が極めて悪いことも明らかになっており (Chatterjee D, *et al.*; Cancer 2012, 3182-90.)。耐性機構の解明および耐性克服法の確立は急務である。

多剤併用療法が行われる現在、多剤耐性の制御機構の解明は重要な事項であるが、これまでは癌細胞の遺伝子発現および蛋白発現からその機構を解明しようとする研究がなされてきた。しかし実臨床では、薬剤の耐性機構は癌細胞の置かれている環境に大きく依存している。特に他癌に比べて間質（癌間質）が極めて豊富な膵癌では、癌間質が抗癌剤耐性に関わるとの重要な報告がなされている (Olive KP, *et al.*; Science 2009, 1457-61.)。さらに興味深いことには、膵癌に放射線治療を行った場合、癌間質が癌細胞の浸潤能に影響を及ぼすとの報告もなされている (Ohuchida K, *et al.*; Cancer Res 2004, 3215-22.)。これらの報告からも明らかな通り、膵癌においては癌細胞単独の研究では不十分で、癌間質研究抜きでは臨床に応用できる知見は得がたいと考えられる。

薬剤耐性を制御する機構として miRNA の関与が重要であることが近年明らかになっている (Wang Z, *et al.*; Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011, 27-33.)。我々はこれまでに、肝臓癌における薬剤耐性機構に癌細胞の miRNA の発現が重要であることを報告してきた (Tomokuni A, Eguchi H, *et al.*; Biochem Biophys Res Commun 2011, 675-80.; Tomimaru Y, Eguchi H, *et al.*; Br J Cancer 2010, 1617-26.)。miRNA の制御は核酸医薬の中でも実現可能性の高い分野であり、既に感染症領域では臨床第相試験が行われている。

miRNA 医薬を用いて薬剤耐性を克服できればその恩恵は極めて大きい。膵癌においても miRNA 医薬を用いた耐性克服法の確立が急務であるが、上述の如く癌間質をも含めた網羅的な miRNA 研究なくしては有効な miRNA 創薬は不可能である。癌細胞のみならず癌間質細胞は特徴的な miRNA 発現パターンを示すことを最近我々のグループは大腸癌で報告し (Nishida N, *et al.*; Clin Cancer Res 2012, 3054-70.) さらに癌細胞

／癌間質における miRNA 発現は細胞外や血中にまで「分泌」されることも明らかにした (Tomimaru Y, Eguchi H, *et al.*; J Hepatol 2012, 167-75.)。さらに重要なことは、分泌された miRNA はある種の伝達物質として自分自身以外の細胞に取り込まれ、取り込まれた細胞の挙動に影響を及ぼすことが明らかになってきている (Kosaka N, *et al.*; J Biol Chem 2012, 1397-405.)。以上の知見を踏まえると、癌部および癌間質の miRNA の発現パターンと抗癌治療耐性の関連性および相互作用を明らかにすることによって、耐性機構を改善する miRNA 創薬への道が開かれると考えられるが、実臨床に即した結果を得るためには豊富な臨床検体を用いて候補 miRNA を探索することが重要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)臨床検体を用いた癌部／癌間質および血中 miRNA の網羅的発現解析による「細胞内 miRNA」および「分泌型 miRNA」の発現プロファイルの解明と化学放射線療法耐性との相関の解明、(2)癌細胞／間質細胞の共培養系における miRNA のクロストークに関する *in vitro* での研究と治療耐性の関与の解明、(3)担癌マウスを用いた抗癌治療と miRNA 阻害剤併用による治療抵抗性の克服法の確立、を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)臨床検体を用いた癌部／癌間質および血中 miRNA の網羅的発現解析による「細胞内 miRNA」および「分泌型 miRNA」の発現プロファイルの解明と化学放射線療法耐性との相関の解明

大阪大学消化器外科での膵癌切除標本を用いて、癌部と癌間質を分離して解析するために Laser Capture Microdissection (LCM) の技術を用い、miRNA の発現を検討する。また我々は、既に樹立している Gemcitabine に対する耐性膵癌株 (BxPC3、MiaPaCa2、PSN1 細胞由来) と親株を用い、東レ社製の高感度チップ 3D-Gene® を使用して miRNA の網羅的発現解析を行い報告しているため、臨床検体から採取した miRNA も同一の 3D-Gene® を使用して検討する。

### (2)癌細胞／間質細胞の共培養系における miRNA のクロストークに関する *in vitro* での研究と治療耐性の関与の解明

細胞内の miRNA は exosome と呼ばれる小胞体に包まれたりある種の蛋白に結合したりする機構によって、細胞から分泌されても安定して存在しえたとされている。生体内の癌組織を模倣する実験系として、癌細胞と間質細胞 (fibroblast、浸潤単核球、血管内皮細胞など) を共培養する系を作成し、(1)で選択された候補 miRNA の添加、阻害を行い、薬

剤耐性との関連性を確認する。この際には、共培養する癌細胞を癌幹細胞化することにより、周囲の非癌幹細胞や間質細胞が受ける影響も評価する。

### (3)担癌マウスを用いた抗癌治療とmiRNA阻害剤併用による治療抵抗性の克服法の確立

本研究の最終目的は、薬剤耐性予測法の構築および耐性克服法の構築である。耐性克服のためには、癌部、癌間質部にクロストークしながら耐性を規定しているmiRNAを同定し、そのmiRNAをターゲットとした核酸医薬を抗癌剤と併用することにより薬剤の感受性を向上させることが肝要である。このために、ヌードマウスの皮下にヒトから採取した新鮮膵癌組織（癌部および癌間質を含む）を生着させ、これに対して抗癌剤とmiRNA阻害剤を併用することにより、その薬剤感受性増感剤としての機能を評価する。

## 4. 研究成果

2系統の膵癌細胞株（MiaPaCa2、PSN1）においてゲムシタピン耐性クローンを樹立し、それぞれの親株とともにゲムシタピン耐性に関わるmiRNAをマイクロアレイ解析により探索したところ、この2系統で共通して最大のfold changeを示したのはmiR-320cであった。そこでmiR-320cの強制発現/発現抑制系を作成し、薬剤感受性試験にてmiR-320cがゲムシタピン耐性を誘導していることを示した。次に、miR-320cの標的遺伝子のうち、SWI/SNF複合体の構成分子のひとつであるSMARCC1に着目し、miR-320cがSMARCC1遺伝子の3' UTR領域に直接結合し、その発現を制御していることを明らかにした。

次に、膵癌切除標本を用いてSMARCC1の発現を検討したところ、ゲムシタピン投与下における再発後生存期間は、SMARCC1陽性例において延長されることが明らかになった。以上よりmiR-320cがSMARCC1を介して膵癌のゲムシタピン耐性を制御していることが証明され、この経路が治療効果を予測する有用な因子および治療標的となり得る可能性が示唆された。

次に膵癌細胞を培養した際に培養液中の放出されるexosome中にはmiRNAが豊富に含まれ、これが周囲の細胞に取り込まれることによって細胞間コミュニケーションをしているという事実より、*in vitro*の実験系で、膵癌細胞より分泌されたexosomeを別の膵癌細胞や線維芽細胞に添加することによる細胞の性質の変化について検討した。特に膵癌細胞は低酸素状態で培養することによって一部はapoptosisに陥るが、残った癌細胞はより悪性度を増し、薬剤耐性も獲得するとの知見に基づき、低酸素培養および通常酸素培養で回収したexosomeを使った実験系を施行した。

癌間質細胞の主たる構成細胞として線維

芽細胞に着目し、human dermal fibroblast (HDF)を用いて、活性化の度合いを-SMAの発現の程度で評価するとする実験系を使用した。低酸素下で培養した膵癌から回収したexosomeをHDFに添加した場合、通常酸素下で培養した膵癌細胞からのexosomeを添加する場合よりも-SMAの発現が上昇( $p < 0.05$ )することが明らかとなった。さらに-SMAの発現が上昇したHDFを別の膵癌細胞に添加することにより、膵癌細胞の増殖率が上昇する( $p < 0.05$ )ことも明らかとなった。さらに、invasion assayを行い、共培養した膵癌細胞の浸潤能の変化を計測したところ、低酸素下で培養した膵癌から回収したexosomeを添加したHDFを膵癌細胞と混合培養することにより、膵癌の浸潤能は更に上昇することを明らかにできた。

## 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)

1. Hasegawa S, Eguchi H, Nagano H, Konno M, Tomimaru Y, Wada H, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Nishida N, Koseki J, Nishimura T, Gotoh N, Ohno S, Yabuta N, Nojima H, Mori M, Doki Y, Ishii H. MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2014; 111: 1572-1580.
2. Iwagami Y, Eguchi H, Nagano H, Akita H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Tomokuni A, Tomimaru Y, Mori M, Doki Y. MiR-320c regulates gemcitabine-resistance in pancreatic cancer via SMARCC1. *Br J Cancer*. 2013; 109: 502-511.
3. Takiuchi D, Eguchi H, Nagano H, Iwagami Y, Tomimaru Y, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Mori M, Doki Y. Involvement of microRNA-181b in the gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells. *Pancreatology*. 2013; 13: 517-523.

[学会発表](計7件)

1. 膵癌臨床検体(凍結標本およびホルマリン標本)を用いた癌部・癌間質部のmiRNAプロファイリングの作成. 長谷川慎一郎, 永野浩昭, 今野雅充, 川本弘二, 西田尚弘, 小関順, 濱直樹, 和田浩志, 江口英利, 土岐祐一郎, 森正樹, 石井秀始. 第73回日本癌学会総会, 2014年09月, 横浜市.
2. 膵癌細胞株のGemcitabine耐性機構にお

ける microRNA-181b の関与 . 江口英利, 永野浩昭, 瀧内大輔, 富丸慶人, 和田浩志, 濱直樹, 小林省吾, 川本弘二, 森正樹, 土岐祐一郎 . 第 52 回日本癌治療学会総会, 2014 年 8 月, 横浜市 .

3. 低酸素下における膵癌細胞由来エクソソームが癌細胞の悪性度に与える影響 . 梶原淳, 富丸慶人, 江口英利, 岸本朋也, 濱直樹, 和田浩志, 川本弘二, 小林省吾, 永野浩昭, 森正樹, 土岐祐一郎 . 第 114 回日本外科学会学術集会, 2014 年 4 月, 京都市 .
4. 治療抵抗性膵癌幹細胞に関わる microRNA の同定 . 長谷川慎一郎, 江口英利, 石井秀始, 富丸慶人, 濱直樹, 川本弘二, 和田浩志, 小林省吾, 梅下浩司, 永野浩昭, 土岐祐一郎, 森正樹 . 第 114 回日本外科学会学術集会, 2014 年 4 月, 京都市 .
5. 治療抵抗性膵癌幹細胞における薬剤耐性と関連する microRNA の検索 . 長谷川慎一郎, 江口英利, 石井秀始, 秋田裕史, 濱直樹, 川本弘二, 和田浩志, 小林省吾, 梅下浩司, 森正樹, 土岐祐一郎, 永野浩昭 . 第 25 回日本肝胆膵外科学会総会, 2013 年 6 月, 宇都宮市 .
6. 治療抵抗性膵癌幹細胞における薬剤耐性と関連する microRNA の検索 . 長谷川慎一郎, 江口英利, 石井秀始, 秋田裕史, 濱直樹, 川本弘二, 和田浩志, 小林省吾, 梅下浩司, 永野浩昭, 森正樹, 土岐祐一郎 . 第 113 回日本外科学会学術集会, 2013 年 4 月, 福岡市 .
7. 膵癌のゲムシタピン耐性に関わる microRNA の同定と臨床応用の可能性 . 江口英利, 永野浩昭, 秋田裕史, 瀧内大輔, 和田浩志, 濱直樹, 川本弘二, 小林省吾, 森正樹, 土岐祐一郎 . 第 113 回日本外科学会学術集会, 2013 年 4 月, 福岡市 .

〔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  
江口英利 (EGUCHI, Hidetoshi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 90542118

(2)研究分担者  
和田浩志 (WADA, Hiroshi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 00572554

濱直樹 (HAMA, Naoki)  
独立行政法人国立病院機構大阪医療センター (臨床研究センター)・研究員  
研究者番号 : 00645723

永野浩昭 (NAGANO, Hiroaki)  
山口大学・医学系研究科・教授  
研究者番号 : 10294050

川本弘一 (KAWAMOTO, Kouichi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 30432470

小林省吾 (KOBAYASHI, Syougo)  
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター・その他  
研究者番号 : 30452436

長谷川慎一郎 (HASEGAWA, Shinichirou)  
大阪大学・医学部付属病院・その他  
研究者番号 : 60621026

秋田裕史 (AKITA, Hirofumi)  
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪成人病センター・その他  
研究者番号 : 70528463

(3)連携研究者 ( )

研究者番号 :