

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670607

研究課題名(和文)オートファジーによる癌治療抵抗性機構としてのmicroRNAの役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of microRNA as a cancer treatment-resistant mechanism by autophagy

研究代表者

仲田 興平 (NAKATA, Kohei)

九州大学・大学病院・特別教員

研究者番号：30419569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：静止期に留まっている癌幹細胞には既存の化学療法の効果がなく、固形癌でも存在が示唆される癌幹細胞の維持機構解明が期待される。最近血液幹細胞の維持にオートファジーの関与が報告され、また我々はマイクロRNAと膵癌悪性度の関係を報告してきた。これらから、オートファジーによる癌幹細胞静止期維持機構とマイクロRNAの関与を研究した。

オートファジーと膵癌細胞の幹細胞性の評価法を確立した。またマイクロRNA-373が、上皮間葉転換の抑制を通して、癌細胞の浸潤を抑制することを報告した。さらにマイクロRNA-5100の過剰発現で、膵癌細胞のコロニー形成能や浸潤能、遊走能が低下することを報告した。

研究成果の概要(英文)：As the existing chemotherapy has little effect on cancer stem cells, which have remained in the stationary phase, mechanism elucidation of the cancer stem cells is expected. It was recently reported that autophagy is involved in the maintenance of blood stem cells, and we have been reporting the relationship between the micro-RNA and pancreatic cancer malignancy. From these, we study the involvement of cancer stem cells maintenance mechanism by autophagy and micro-RNA. We established the evaluation method of autophagy and the stemness of pancreatic cancer cells. Further, we reported that micro RNA-373 suppressed the invasion of cancer cells, through the inhibition of the epithelial-mesenchymal transition. We also reported that overexpression of micro RNA-5100 reduced colony-forming, invasion, and migration ability of pancreatic cancer cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オートファジー マイクロRNA 膵臓癌

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌などの難治性固形腫瘍は、早期から浸潤や転移を生じ、発見時には既に治癒切除が困難である事が多い。さらに、その多くが放射線照射、化学療法抵抗性の特徴を有している。近年、乳癌、膵臓癌、脳腫瘍などの固形癌において血液腫瘍同様に、癌幹細胞の存在の可能性が示唆され、注目を集めている。癌幹細胞は正常幹細胞同様に細胞周期を静止期(G0)に維持する事により癌組織を維持している。現在使用されている抗癌剤の多くは、細胞分裂中のDNAに入り込み、DNA合成阻害により癌細胞の増殖を抑えているため、静止期に留まっている癌幹細胞に対して既存の化学療法は効果が無く、癌細胞の再発を防ぐには癌幹細胞の静止期維持機構を解明し、癌幹細胞の治療抵抗性を改善する方法の開発が急務である。

オートファジーは細胞内の代謝に不可欠なシステムであるが、発癌から転移、浸潤、化学療法抵抗性まで癌の様々な局面に重要な役割を果たしていることが明らかになった(Zou, Autophagy, 2012)。昨年、血液幹細胞の維持にオートファジーの関与が初めて報告され、幹細胞の静止期維持機構に関与している可能性が示唆されたが、固形癌幹細胞静止期維持機構とオートファジーに関する報告は皆無である。我々は膵癌を中心とした消化器癌の病理学的特性、生物学的悪性度に関する研究を行いマイクロRNAと膵癌悪性度の関係を報告してきた(Nakata, Surgery, 2012)。

## 2. 研究の目的

オートファジーによる癌幹細胞静止期維持機構の解明およびmiRNAの関与の解明を行う。さらに人工ウイルスを利用した新規の薬剤送達システムを用いた細胞特異的治療法の検討を行う。

## 3. 研究の方法

- (1) 抗癌剤抵抗性膵癌細胞株を作成する。
- (2) CD133によるフローサイトメトリーを用いて、膵癌の癌幹細胞の同定法を確立する。
- (3) 蛍光免疫染色やウェスタンブロット、フローサイトメトリーを用いて膵癌細胞のオートファジーの評価を行う実験系を確立する。
- (4) オートファジー抑制剤である3メチルアデニンやクロロキンをを用いて、オートファジーが抑制されたことを確かめ、実験系が正しいことを確認する。さらにオートファジー必須遺伝子であるAtg5やAtg7の抑制をRNA干渉によって行い、実験系が正確であることを確定させる。
- (5) 膵癌の浸潤に関与するマイクロRNAの検索、およびその生物学的意義を解明する。

(6) 作成した膵癌高転移株を用いた、膵癌肝転移に関与するマイクロRNAの検索、およびその生物学的意義を解明する。

(7) オートファジー抑制後抗癌剤併用による治療効果改善を検討する。

## 4. 研究成果

(1) 膵癌細胞株のSUIT-2及びCapan-1を親株として、抗癌剤のジェムザール及び5-FUの添加を持続し、徐々に抗癌剤の濃度を上昇されることで、抗癌剤添加でも増殖する耐性株の作成に成功した。ジェムザール耐性のSUIT-2及びCapan-1に関しては、ジェムザールに対するIC50を測定し、共に親株と比較してIC50の有意な上昇を認めた。

(2) CD133によるフローサイトメトリーを用いて、膵癌の癌幹細胞の同定法を確立した。膵癌を含む複数の癌種で、癌幹細胞を除去する効果があると報告されているサリノマイシンを用いた。サリノマイシンを膵癌細胞株に添加し、CD133によるフローサイトメトリーで検討したところ、CD133陽性細胞はサリノマイシンで減少した。この結果からサリノマイシンは膵癌細胞株の癌幹細胞を除去する効果が示された。またこの実験によって、膵癌細胞株の癌幹細胞の割合を評価する方法を確立した。

(3) 膵癌細胞株のSUIT-2, Panc1, Capan-1を用いて、オートファジーを検討した。Microtubule-associated protein light chain 3(LC3)抗体を用いた蛍光免疫染色で、細胞質内に点状のLC3 punctureを認め、膵癌細胞株でのオートファジー亢進が示唆された。またウェスタンブロットを用いて、ホスファチジルエタノールアミン付加された膜結合型のLC3-IIの蛋白質レベルが膵癌細胞株で高いことを示し、オートファジーが亢進ことを支持した。またオートファジーによって発生する小器官であるオートファゴソームを特異的に染色するcytoID autophagy detection kitを用いた蛍光免疫染色でも、膵癌細胞株でオートファジーの亢進が認められ、このキットを用いたフローサイトメトリーでも同様の結果であった。

(4) オートファジー抑制剤である3メチルアデニンを膵癌細胞株に添加した。PI3K阻害によってオートファジーを抑制する3メチルアデニンを膵癌細胞株に添加すると、蛍光免疫染色でLC3やcytoIDの細胞質内陽性点が減少した。またウェスタンブロットでLC3-IIの蛋白質レベルが低下した。これらの結果から、3メチルアデニンは膵癌細胞株のオートファジーを抑制することが示唆された。さらにオートファゴソームとリソソームの融合を阻害するクロロキンを膵癌細胞株に添加したところ、LC3やcytoIDの細胞質内陽性点が増加した。またウェスタンブロットでLC3-IIの蛋白質レベルが増加し、オートファジーで特異的に分解されるp62蛋白質の蓄積

を認めた。これらの結果から、クロロキンは膵癌細胞株のオートファジーを抑制し、結果的にオートファゴソームの蓄積を招いたことが示唆された。さらに膵癌細胞株を用いて、オートファジー必須遺伝子である Atg5 や Atg7 の抑制を RNA 干渉によって行い、上記実験からオートファゴソームの減少が示され、オートファジーが抑制されたことが示唆された。

(5) 浸潤や転移に関与する上皮間葉転換において重要な制御因子である E カドヘリンを誘導すると報告されたマイクロ RNA-373 に注目した。膵癌細胞株のマイクロ RNA-373 の発現レベルは低かった。また、ホルマリン固定やマイクロダイセクションした膵癌検体のマイクロ RNA-373 の発現は、正常膵と比較して有意に低下していた。さらに、マイクロ RNA-373 を導入すると、TGF $\beta$  で誘導される上皮間葉転換が抑制され、癌細胞の浸潤を抑制した (図 1)。

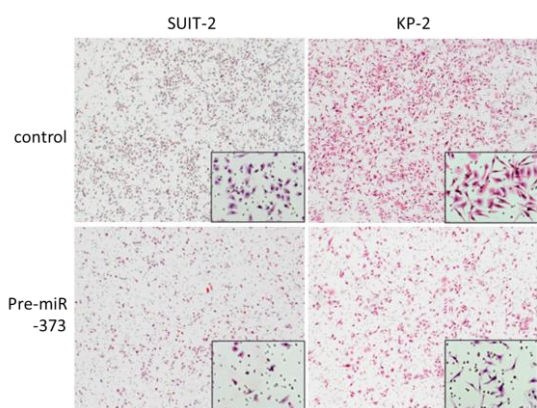


図 1 : 膵癌細胞株の SUIT-2 および KP-2 にマイクロ RNA-373 を導入すると、癌細胞の浸潤能は低下した。

マウスの腹腔内に膵癌細胞株を注射し、播種形成能を検討したところ、マイクロ RNA-373 の導入によって腹膜播種形成は著明に抑制された (図 2)。

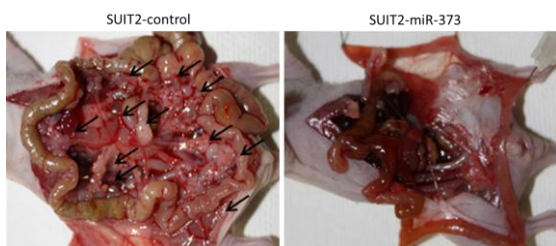


図 2 : 膵癌細胞株の SUIT-2 をマウスの腹腔内に注射し、播種形成能を検討した。マイクロ RNA-373 の導入によって腹膜播種形成は著明に抑制された。

(6) 膵癌細胞株とその高肝転移株を用いたマイクロアレイによって、高転移株でマイクロ RNA-5100 の発現が低いことを同定した。膵癌細胞株にマイクロ RNA-5100 を過剰発現させると、膵癌細胞のコロニー形成能や浸潤能、遊走能が低下することを見出した (図 3)。

またマイクロ RNA-5100 の配列を基にポドカリクシンという膜蛋白質に注目し、膵癌細胞における発現と予後の関連を発見した。

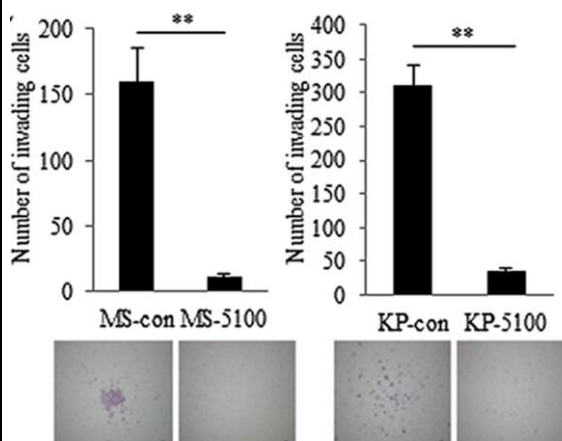


図 3 : SUIT-2 高肝転移株 (左) および膵癌細胞株 KP-2 (右) にマイクロ RNA-5100 を過剰発現させると、膵癌細胞の浸潤能は著明に低下した。

(7) 抗癌剤耐性株は癌幹細胞の特徴をもつことが知られており、この特徴を持つ細胞を阻害する報告のあるサリノマイシンを用いて検討した。サリノマイシンと抗癌剤を併用した群は、抗癌剤単独治療群と比較して有意に増殖抑制を認めた。またサリノマイシンが膵癌細胞株のオートファジーを亢進させることを見出した。これらの結果に基づいて、樹立した抗癌剤耐性株を用いたサリノマイシンと抗癌剤の併用による増殖抑制効果への影響の検討を継続中である。

研究期間中に上記結果を見出した。膵癌幹細胞に対するオートファジの役割に関する研究は現在継続中であり、今後論文化する予定である。

## 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 7 件)

- ① Sada M, Ohuchida K, Horioka K, Okumura T, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility., *Cancer Lett.*, 査読有, 372, 2016, 210-218  
DOI:10.1016/j.canlet.2016.01.016
- ② Chijiwa Y, Moriyama T, Ohuchida K, Nabae T, Ohtsuka T, Miyasaka Y, Fujita H, Maeyama R, Manabe T, Abe A, Mizuuchi

Y, Oda Y, Mizumoto K, Nakamura M, Overexpression of microRNA-5100 decreases the aggressive phenotype of pancreatic cancer cells by targeting PODXL, Int. J Oncol., 査読有, 48(4), 2016, 1688-1700  
DOI:10.3892/ijo.2016.3389

③ 仲田興平、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史、膵癌における miRNA 発現と上皮間葉転換、胆と膵, 36(10), 2015, 1117-1122

④ Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Shimizu S, Tanaka M, Technical feasibility of laparoscopic total gastrectomy with splenectomy for gastric cancer: clinical short-term and long-term outcomes., Surg. Endosc., 査読有, 29(7), 2015, 1817-22  
DOI: 10.1007/s00464-014-3870-6

⑤ Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Nakamura K, Tanaka M, Outcomes of Cervical End-to-Side Triangulating Esophagogastric Anastomosis with Minimally Invasive Esophagectomy., World J Surg., 査読有, 39(5), 2015, 1099-1104  
DOI: 10.1007/s00268-014-2925-0

⑥ Ideno N, Ohtsuka T, Matsunaga T, Kimura H, Watanabe Y, Tamura K, Aso T, Aishima S, Miyasaka Y, Ohuchida K, Ueda J, Takahata S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M, Clinical Significance of GNAS Mutation in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas With Concomitant Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Pancreas., 査読有, 44(2), 2015, 311-320  
DOI:10.1097/MPA.0000000000000258

⑦ Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Aishima S, Oda Y, Nagai E, Tanaka M, Micro RNA-373 is Down-regulated in Pancreatic Cancer and Inhibits Cancer Cell Invasion., Ann Surg Oncol., 査読有, 21(suppl4), 2014, S564-S574  
DOI:10.1245/s10434-014-3676-8

[学会発表] (計 2 件)

① Horioka K, Ohuchida K, Sada M, Zheng B, Ohtsuka T, Ueki T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Suppression of CD51 in Pancreatic Stellate Cells Inhibits Tumor Growth by Reducing Stroma and Altering Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer., American Pancreatic Association 46th Annual Meeting., 2015. 11. 4., San

Diego(America)

② 遠藤翔、仲田興平、大内田研宙、阿部俊也、肥川和寛、堀岡宏平、水内祐介、小田義直、水元一博、田中雅夫、オートファジーが膵癌の癌間質相互作用に与える影響の検討、第 46 回日本膵臓学会大会、2015. 6. 19, 名古屋

[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：  
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

仲田 興平 (NAKATA, Kohei)  
九州大学・大学病院・特別教員  
研究者番号：30419569

### (2) 研究分担者

前山 良 (MAEYAMA, Ryo)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：10611668

永井 英司 (NAGAI, Eishi)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：30264021

江上 拓哉 (EGAMI, Takuya)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：40507787

宮坂 義浩 (MIYASAKA, Yoshihiro)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号：40507795

(3)連携研究者

なし