

MicroRNA-196b is an independent prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer

Carcinogenesis. 2017 Apr 1; 38(4): 425-431. doi: 10.1093/carcin/bgx013.

Kanno S, Nosho K, Ishigami K, Yamamoto I, Koide H, Kurihara H, Mitsuhashi K, Shitani M, Motoya M, Sasaki S, Tanuma T, Maguchi H, Hasegawa T, Kimura Y, Takemasa I, Shinomura Y, Nakase H.

要旨 microRNA-196b は膵癌において異常高発現しており，多変量解析で不良な予後に相関した．その阻害剤は膵癌細胞株において抗腫瘍効果を示すことから，microRNA-196b は診断バイオマーカーおよび治療標的となることが示唆された．

1. 膵癌と microRNA

膵癌は悪性度の高い腫瘍であり，世界的にはその診断から 6 か月以内に 50%以上の方が亡くなり，現状ではその発症率と死亡率がほぼ等しい．そのため更なる発癌原因の解明や早期診断の方法，新たな治療法の開発が望まれている．

microRNA (miRNA) は 21-25 塩基対で構成される small non-coding RNA に分類され，遺伝子転写・翻訳における調節機能を有し，がん遺伝子，がん抑制遺伝子両者の作用があり，様々な癌腫において有用なバイオマーカーとなることが報告されている．膵癌においては miR-21, miR-31, miR-155, miR-198, miR-210, miR-222 の過剰発現が不良な予後に関連していることが報告されている¹⁾．このような背景のもと，我々は膵癌における新たなバイオマーカーとなり得る microRNA を探索するため本研究を計画した．本研究では miRNA アレイ解析を行い，膵癌悪性度に関連する miRNA 分子を検出し，248 例の膵管癌ステージ II 症例の標本データベースを用いて診断的バイオマーカーおよび治療標的として有用であるかどうかを調べた．

2. 膵癌の miRNA アレイ解析

膵癌における特徴的な miRNA 発現を調べるため TaqMan® Array Human MicroRNA A + B カードセット v3.0 (Applied Biosystems) を用い miRNA アレイ解析を行った．データベースよりランダムに選択した 14 例の膵癌組織と正常膵管上皮群 (N = 5) とを比較した．その結果 760 種類の miRNA のうち，miR-196b が膵癌群で最も高発現していた (正常群の 9.78 倍, P = 0.0014)．

3. 膵癌細胞および癌間質における miR-196b 発現

レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いて，膵癌患者 10 例のホルマリン固定標本から，膵癌細胞および対応する癌間質の RNA を抽出し miR-196b 発現レベルを分析した．その結果，いずれの場合も膵癌細胞の miR-196b 発現レベルは癌間質より有意に高かった (P = 0.027)．一方，癌細胞とそれに対応する膵癌組織全体の miR-196b 発現レベルには有意差を認めなかった (P = 0.08) (図 A)．

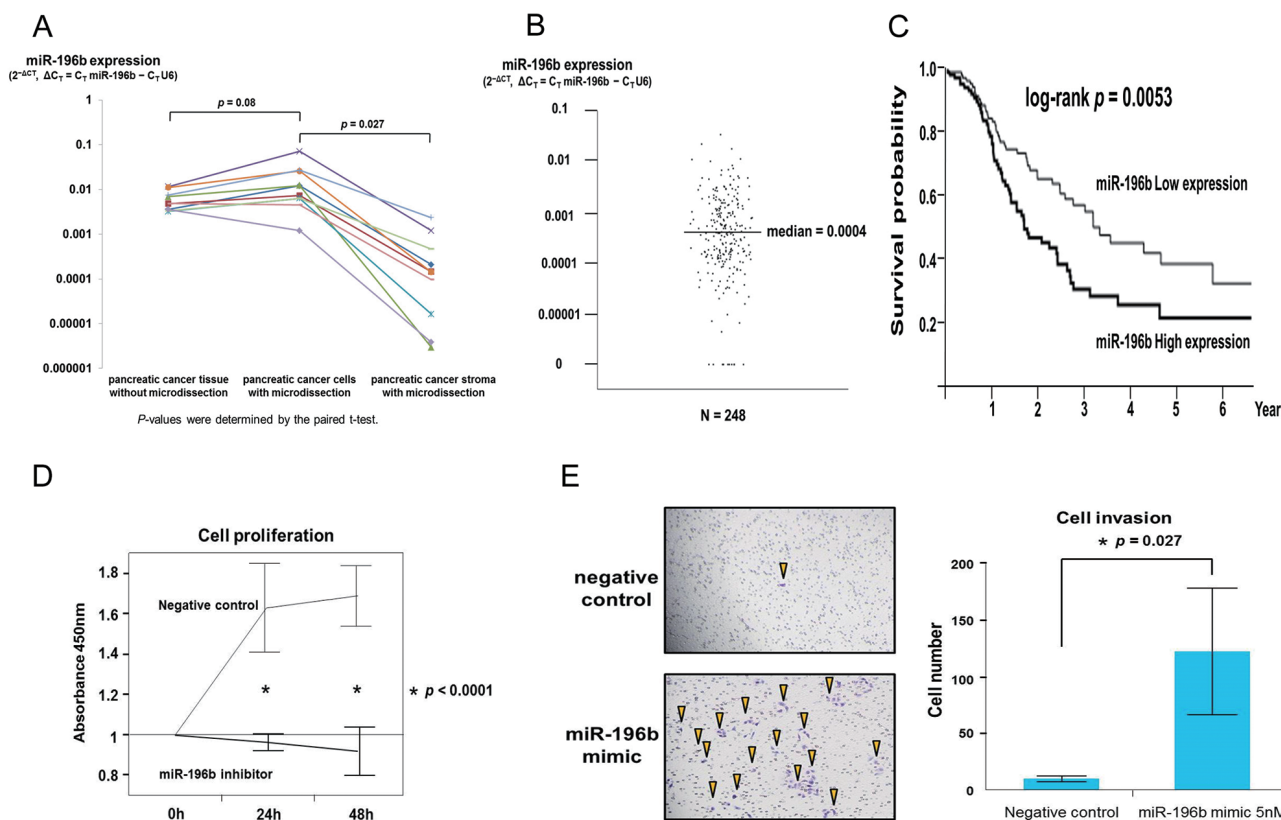
4. 膵癌 248 例における miR-196b 発現の分布および臨床病理学のおよび分子異常との関連

ステージ II 膵癌検体 248 例で miR-196b 発現を定量した (発現量 = $2^{-\Delta CT}$: $\Delta CT = (C_T \text{ miR-196b} - C_T \text{ U6})$)．248 例の膵癌における miR-196b 発現の分布は以下の通りであった: 平均 0.0014; 中央値 0.00040; 標準偏差 (SD) 0.0033; 範囲 0.0-0.035 (図 B)．

次いで検体の miR-196b 発現を低発現群 (< 中央値) および高発現群 (中央値 \geq) に二分し，臨床病理学的因子，分子異常との関連を検討した．miR-196b 高発現は miR-21 (P = 0.0025) および miR-31 (P = 0.0001) 発現と有意に相関していた．性別，年齢，腫瘍の局在，T 因子，N 因子，KRAS 変異，MLH1 メチル化，CIMP (CpG アイランドメチル化形質: CpG island methylator phenotype) には関連を認めなかった．

5. miR-196b 高発現と生命予後

ステージ II の膵癌患者において miR-196b 発現の生命予後への影響を評価した．生存分析の対象となる患者 248 人の追跡調査中における死亡数は 100 人であり，Overall Survival (OS) の中央値は 31.1 ヶ月であった． Kaplan-Meier 解析では miR-196b の高発現群で生存期間が有意に短かった (OS 中央値



- A) マイクロダイセクション法を用いて膵癌患者 10 例のホルマリン固定標本から RNA を抽出し、膵癌細胞および対応する癌間質、膵癌組織における miR-196b 発現レベルを比較した。
- B) 248 例の膵癌組織における miR-196b 発現の分布を示す。(内因性コントロール: U6)
- C) MiR-196b 発現レベル (高発現群 vs 低発現群) による膵臓癌のカプラン・マイヤー生存曲線を示す。
- D) 細胞増殖アッセイ: 膵癌細胞株 PK-45P に miR-196b 阻害薬をトランスフェクションを行い、陰性コントロールと比較した。
- E) 基底膜浸潤能アッセイ: 膵癌細胞株 PK-45P に miR-196b mimic をトランスフェクションし、浸潤能の変化を陰性コントロールと比較した。

(月): 21.2 対 40.2; ログランク $P = 0.0053$; 図 C)。単変量 Cox 回帰分析では miR-196b 低発現群と比較して高発現群で死亡率が有意に高かった (ハザード比 (HR): 1.74; 95% 信頼区間 (CI): 1.18-2.60; $P = 0.0057$)。T 因子および N 因子で調整した多変量 Cox 回帰分析では低発現群よりも miR-196b 高発現群で OS が有意に短かった (HR: 1.72; 95% CI: 1.15-2.59; $P = 0.0074$)。腫瘍の局在, KRAS 変異, CIMP, および miR-21 および miR-31 発現レベルを含めた OS の多変量解析では miR-196b 高発は独立した予後不良因子となることが示された (HR: 1.66; 95% CI: 1.09-2.54; $P = 0.019$)。

6. 膵癌細胞株における miR-196b 発現の機能解析

本研究では理化学研究所 BRC が提供するヒト膵臓癌細胞株 PK-45P (RCB0241) を使用した。miR-196b mimic 5nmol/L, miR-196b 阻害剤 50nmol/L, 陰性コントロールを Lipofectamine 2000 (Invitrogen by Life Technologies) を用いて PK-45P 細胞にトランスフェクションした。細胞増殖アッセイとしてトランスフェクションした PK-45P 細胞を 96 ウェルプレー

トに 5×10^3 個/ウェルで播種し, 0, 24, および 48 時間後に Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて MTT アッセイを行った。その結果 miR-196b 阻害剤のトランスフェクションを行った群では細胞増殖が有意に減少した (図 D)。

CytoSelect 24-Well 細胞浸潤能アッセイキット (Cell Biolabs) を用いて、基底膜への細胞浸潤能の変化の検討を行った。miR-196b mimic のトランスフェクションを行った群では基底膜への浸潤細胞数が有意に増加した (図 E)。

7. 参考文献

- Mitsuhashi, K., et al. (2015) Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. *Oncotarget*, 6, 7209-7220.

菅野 伸一

略歴

2008 年 札幌医科大学医学部卒業

2010 年 札幌医科大学消化器・免疫・リウマチ内科学講座入局

2014 年 札幌医科大学大学院入学