

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860501

研究課題名(和文) 血中・尿中膵癌由来ペプチドの網羅的解析による新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of novel biomarker for pancreas cancer

研究代表者

稲垣 悠二 (Inagaki, Yuji)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：40727872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は膵癌患者の尿中エクソソームよりmicroRNAを抽出し、新規膵癌マーカーの開発を試みた。膵癌患者9例、コントロール7例のマイクロアレイによる検討でmiR-3940-5pを新規マーカー候補として選定し、miR-8069を内部コントロールとした。膵癌40例、コントロール25例の検討ではmiR-3940-5p/miR-8069比は膵癌1.92、コントロール0.50と膵癌症例で著明に上昇していた($p < 0.001$)。また、培養細胞での検討ではmiR-3940-5p/miR-8069比上昇は膵癌特異的であり、膵癌の有用な新規マーカーであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we extracted exosome from the urine of pancreas cancer patients and then microRNA to identify a novel biomarker for pancreas cancer. Initially, we compared the microRNA expression between nine pancreas cancer patients and control subjects using microarray, and selected miR-3940-5p as a novel biomarker and miR-8069 as an internal control. By analyzing 40 pancreas cancer patients and 25 control subjects, we found miR-3940-5p/miR-8069 ratio was significantly increased in pancreas cancer patients compared to controls (1.92 vs. 0.50, $p < 0.001$). Furthermore, experimental results using cultured cancer cell lines showed the increment in miR-3940-5p/miR-8069 ratio was specific for pancreas cancer. From these results, we conclude miR-3940-5p/miR-8069 ratio is potentially can be a new biomarker for pancreas cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵がん バイオマーカー マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

膵癌は最も予後不良な癌の一つであり、その患者数は年々増加傾向にある。最近の統計によると膵癌は本邦における部位別による癌の死亡数の、女性では4位、男性では5位を占め、男女総数では全体の5位を占めるまでになっている。膵癌を予後不良としている要因は様々なものがあるが、第一に確実に癌を治癒できる確立した治療法が未だないことが挙げられる。他にも早期発見が困難であることも大きな要因である。早期発見が困難な理由としては、解剖学的に後腹膜にあり、初期には症状が出現しにくいこと、CTやエコーなど日常に使用される画像診断法では早期の癌が発見されにくいことがある。さらには胃癌や肝癌など危険群が明らかとなっている癌に比して膵癌の危険群は明らかでないことも要因である。糖尿病やアルコール、膵炎は膵癌危険群として考えられてきたが、近年ではこのような要因を持たない特に女性の膵癌が増加している。また、有効なバイオマーカーがないことも膵癌の発見を困難としている。CA19-9は膵癌のマーカーとして広く利用されているが、その陽性率は30%程度とされており、比較的増大してから上昇する症例がほとんどであり、早期発見に有用とは考えがたい。このような現状であり、膵癌の予後改善には治療法の確立のほかに早期発見を可能とするバイオマーカーの開発が待たれる。

2. 研究の目的

microRNAは21-25塩基(nt)長の1本鎖RNA分子であり真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与する。ヒトゲノムには1000以上のmicroRNAがコードされていると考えられている。microRNAはその標的mRNAに対して不完全な相同性をもって結合し、一般に標的遺伝子の3'UTRを認識して、標的mRNAを不安定化するとともに翻訳抑制を行うことでタンパク質産生を抑制するとさ

れている。microRNAが介する転写抑制は、発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシスまたは代謝といった広範な生物学的プロセスに重要な役割を担うことが知られており、したがってある種のmicroRNAは発癌に関与することが報告されており、さまざまな癌でmicroRNAがバイオマーカーになることが示唆されている。一方、エクソソームは様々な細胞から放出される小粒子であり、内部に元の細胞由来の種々の蛋白や、DNAだけでなく、microRNAも含んでいる。これらの分子を利用してエクソソームは細胞間で情報伝達の役割を担っていることが考えられている。エクソソームは各細胞固有の膜組成、含有内容組成を有しているため多くの疾患に特異的に発現するものがあることが予想される。また、分子量が小さく、尿中にも排泄されることが知られている。本研究においては、患者から侵襲なく採取可能である尿検体から回収されたエクソソームに含まれるmicroRNAに注目し、膵癌の新規バイオマーカーの開発を試みることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

2015年10月から2017年2月までに当科に膵腫瘍精査目的に入院した検査・治療前の膵疾患患者を対象とした。重複癌患者や癌既往のあるものは除外した。また当科に外来通院加療中の癌既往歴のない患者を年齢をマッチングさせてコントロールとした。

(2) 尿検体採取

Fine needle aspiration (FNA)や内視鏡的逆行性膵胆管造影(ERCP)などの侵襲的検査施行前の尿検体を10ml以上採取し、12時間以内に3000xgで遠心分離を15分間行い、上清を5.5~6mlずつ分注し、-30℃で凍結保存した。

(3) エクソソーム単離

Exo Quick TC (System Biosciences 社)を用いて説明文書の通りにエクソソームを単離した。

凍結保存した尿検体を解凍し、3000G で遠心分離を 15 分間を行い、不純物を除去。上清 5ml を使用し、ExoQuickTc 1ml と混和し、最低 12 時間以上 4℃ で沈降させた。さらに 1500G で遠心分離を 30 分間行い、pellet を作成した。

(4) microRNA 抽出

前述の沈殿物より miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon 社) を用いて microRNA を抽出した。pellet に Lysis buffer 350 µl を加えて混和させ、99.5% Ethanol 200 µl を加え混和。その後カラムを使用して上記溶解物を 14000G で遠心分離を 1 分間行い、さらに 3 回 Wash を行い、最後に 14000G で 2 分間遠心分離し、沈殿物を完全乾燥させた。Elution Buffer 50 µl をカラムに注入し、遠心分離 200G で 2 分間で平衡後に前述の沈殿物の elution 液をカラムに添加し、14000G 1 分間で抽出した。高濃度にするためさらに抽出物をカラムに添加し、再度前述のとおり遠心分離を繰り返した。抽出物は使用まで -80℃ で保存した。

(5) Quality check

全検体は Nanodrop を使用し、230/260nm で濃度・純度を測定した。また一部検体については Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社)を用いて小分子 RNA が良好な quality で抽出が行われていることを確認した。

(6) microRNA 網羅的発現解析

膵癌患者 9 例および年齢・性別をマッチさせたコントロール 7 例を用いてマイクロアレイ (Agilent Technologies 社) により microRNA 発現の網羅的発現解析を行った。膵癌患者で

コントロールに比して発現が増強しているもの、低下しているものを解析し、その結果から新規バイオマーカーとなる可能性のある microRNA を選定した。

(7) PCR による検証

選定された microRNA の発現量を膵癌群 40 例 (男:女 23 : 17 例)およびコントロール群 25 例 (男:女 14 : 11 例)において再度検証を行った。

miRCURY Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon 社) を使用して microRNA を cDNA 化した後、Applied Biosystems 7300 Realtime PCR system (Life technologies 社)でリアルタイム PCR により発現量を解析した。microRNA の発現量は低く、リアルタイム PCR では検出できない例もあり、他にも Quant Studio (Life technologies 社) により デジタル PCR を用いて microRNA の発現量解析を行った。いずれもプライマーは miRCURY LNA PCR Primer Set (Exiqon 社) を使用し、蛍光色素はリアルタイム PCR では miRCURY LNA ExiLENT SYBR Green master mix (Exiqon 社)、デジタル PCR では SYBR Green I dye を使用した。

(8) 培養癌細胞での microRNA 発現検討

培養癌細胞の培養上清を用いて同様に microRNA の発現を検討した。癌細胞は、colo32 (大腸癌細胞)、HepG2 (肝芽腫細胞)、KP4 (膵癌細胞)、MIA PaCa (膵癌細胞)、Panc1 (膵癌細胞)を使用した。各癌細胞を 10% 仔牛血清を添加した培養液 (DMEM) で培養し、その後培養液を無血清の DMEM に変更した。無血清培地で 24 時間培養後に培養液をサンプリングし、前述と同様の手順でエクソソームを抽出、その後 microRNA を抽出した。cDNA に転換後、培養液中の microRNA の発現量をデジタル PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) 尿からの microRNA 抽出

まず基礎検討として抽出キットにて miRNA を抽出できるかの検討を行った。抽出キットによる収量の差異をみるために miRCURY Exosome Isolation kit と ExoQuick TC にて新鮮尿から採取したエクソソームから、それぞれ miRCURY RNA Isolation kit にて microRNA の抽出をおこなった。Agilent 2100 バイオアナライザ、分光光度計により小分子 RNA の抽出が行われていることを確認し、ExoQuick TC を使用したほうが効率的に採取することが可能であった。冷凍保存をした尿から microRNA を抽出できるかを確認した。冷凍保存した期間が影響するかについても検討した。その結果、新鮮尿、凍結した尿いずれも解析に使用可能であることを確認した。その後スタートボリュームの検討を行い、開始量として尿 5ml が最適であると判断した。

(2) 新規バイオマーカーとなる microRNA の選定

マイクロアレイによる膵癌 9 例、コントロール 7 例の検討により両群間で発現に差の見られた microRNA としては、miR-8069 (fold change 1.037、膵癌群で発現低下)、miR-4516 (fold change 2.662、膵癌群で発現増加)、miR-3940-5p (fold change 3.047 膵癌群で発現増加)、miR-4463 (fold change 10.5 膵癌群で発現増加) が得られたが、その後の検討で miR-4463 はコントロール群でも陽性症例が多かったことから検討から除外し、miR-3940-5p を最終的に新規膵癌マーカー候補とした。また、内部コントロールとして発現の減少していた miR-8069 を選出した。

(3) 多症例での検討

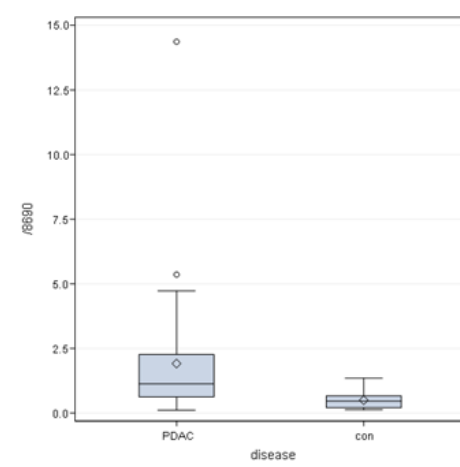
miR-3940-5p の発現量が少なく、リアルタイム PCR での各症例での発現量検討では正確な解析が困難と判断し、より少量の発現を検出

できるデジタル PCR の結果により解析を行った。検証に使用した症例で膵癌群 (40 例) とコントロール群 (25 例) の背景 (平均年齢、性別) に有意差は認めなかった。miR-3940-5p の発現量を miR-8069 で補正し、miR-3940-5p/miR-8069 の発現比を両群で比較した。膵癌患者群では発現比は 1.92 であったのに対し、コントロール群では 0.50 であり、膵癌群で有意に発現比が高いことが示された ($p < 0.0001$) (図 1)。発現量と平均年齢、腫瘍径に有意な相関はなく、性別、局所進展度 T 分類 (UICC)、切除可能性分類の因子別でも有意差を認めず、miR-3940-5p/miR-8069 発現比上昇は独立した因子と考えられた。また、症例数は少ないものの、慢性膵炎患者では miR-3940-5p/miR-8069 比の上昇は認められず、コントロール群とほぼ同等であった。

(4) 培養癌細胞での検討

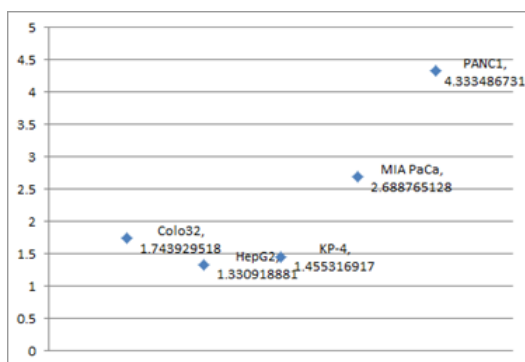
各培養細胞の培養上清から抽出したエクソソーム中の miR-3940-5p/miR-8069 比も同様に検討した。膵癌細胞である、MIA PaCa、Panc1 の培養上清中の miR-3940-5p/miR-8069 比は colo32 (大腸癌細胞)、HepG2 (肝芽腫細胞) より上昇しており (図 2)、miR-3940-5p/miR-8069 比上昇は膵癌特異的であることが示唆された。

図 1



PDAC、膵癌患者群。Cont、コントロール

図 2



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)

Inagaki Y, Shiraki K, Sugimoto K, Yada T, Tameda M, Ogura S, Yamamoto N, Takei Y, Ito M. Epigenetic regulation of proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma cells by CBP/p300 histone acetyltransferase activity. Int J Oncol. 2016 Feb;48(2):533-40. doi: 10.3892/ijo.2015.3288. (査読有り)

Uraki S, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Inagaki Y, Ogura S, Kasai C, Nojiri K, Yoneda M, Yamamoto N, Takei Y, Nobori T, Ito M. Human β -defensin-3 inhibits migration of colon cancer cells via downregulation of metastasis-associated 1 family, member 2 expression. Int J Oncol. 2014 Sep;45(3):1059-64. doi: 10.3892/ijo.2014.2507. (査読有り)

Tameda M, Sugimoto K, Shiraki K, Inagaki Y, Ogura S, Kasai C, Yoneda M, Okamoto R, Yamamoto N, Takei Y, Ito M, Nobori T. Resveratrol sensitizes HepG2 cells to TRAIL-induced apoptosis. Anticancer Drugs. 2014 Oct;25(9):1028-34. doi: 10.1097/CAD.000000000000128. (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

稲垣 悠二・杉本 和史・白木 克哉・為田 雅彦・小倉 英・山本 憲彦・竹井 謙之. 抗 LKM-1 抗体陽性であった成人自己免疫性肝炎の 3 例. 第 51 回日本肝臓学会総会、平成 27 年 5 月 22 日、ホテル日航熊本(熊本

県・熊本市)

稲垣 悠二・杉本 和史・白木 克哉・為田 雅彦・浦城 聡子・小倉 英・山本 憲彦・竹井 謙之. 当院における急性発症型自己免疫性肝炎の診断・治療の現状. 第 18 回日本肝臓学会大会 平成 26 年 10 月 24 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

稲垣 悠二・杉本 和史・白木 克哉・為田 雅彦・小倉 英・山本 憲彦・竹井 謙之. 正常肝臓の加齢に伴う遺伝子発現変化とインターフェロンシグナルの変化. 第 50 回日本肝臓学会総会、平成 26 年 5 月 30 日、ホテルニューオータニ(東京都・千代田区)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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
稲垣 悠二 (INAGAKI, Yuji)
三重大学・医学系研究科 リサーチアソシエイト
研究者番号：40727872

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者

()