

平成30年5月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10186

研究課題名(和文)胆道発癌過程におけるセネセンス関連microRNA発現の解析

研究課題名(英文) Analysis of microRNAs associated with senescence during the progression of bile duct cancer.

研究代表者

高畑 俊一 (TAKAHATA, Shunichi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50437779

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)：胆道癌の発癌過程におけるセネセンスの存在を明らかにし、関連するmicroRNA(miR)の発現を正常上皮・前癌病変・癌組織で解析することを目的とする。また胆汁中のmiRを解析することで早期診断法および新規治療法の開発も併せて模索する。胆道癌高危険因子である膵胆管合流異常に注目し、術前ERC下に胆汁を採取し、胆汁中のmiR抽出を試みたが、容易にdegradeするため安定した解析が困難であった。そこで、胆汁中のエクソソームに着目して超遠心法にて抽出を行ったところ、胆汁中にもエクソソームの存在を証明できた。また、平成29年にはエクソソーム中にmiRが内包され、安定して定量できることを示した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to confirm the relation between senescence and carcinogenesis of bile duct cancer. MicroRNAs (miRs) associated with senescence are measured in normal bile duct lesion, precursor lesion, and carcinoma lesion, and then, the miRs are also measured in bile juice samples. We will investigate whether the miRs can be used as biomarkers for early diagnosis of bile duct cancer.

We tried to measure the expression levels of miRs using bile juice obtained from the patients with pancreaticobiliary maljunction, which is high risk for bile duct cancer, by endoscopic retrograde cholangiography. However, the measurement of miRs was difficult because of their unstabilities in bile juice. Several studies demonstrated that miR in exosomes were stable even in body fluids. And thus, exosomes in bile juice were extracted by ultracentrifugation. The presence of exosomes in bile juice was confirmed. The miRs in bile juice could be measured with reproducibility.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胆道癌 セネセンス 膵胆管合流異常 マイクロRNA エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

近年、セネセンス(細胞老化)と発癌との関連が注目されている。前癌病変には高率にセネセンスがみられ、腫瘍の悪性を抑制していることが報告されている。¹⁾しかし、消化器癌の中でも予後不良な癌種の一つである胆道癌の発生過程におけるセネセンスの関与についてはまだ明らかになっていない。

そこで本研究では、胆道癌の発生過程におけるセネセンスの存在を明らかにし、特にセネセンスに関連するmicroRNAの発現を解析することを目的とする。MicroRNAとは、18-23塩基からなるノンコーディングRNAであり、特定のmRNAを制御することで機能する。体内では約4000種類以上のmicroRNAの存在が確認されており、その安定性から解析が比較的容易とされ、診断や治療への応用を期待されている。²⁾正常胆道上皮・胆道癌前癌病変・胆道癌組織でそれぞれmicroRNAを解析し、また胆汁中のmicroRNAも解析することにより、胆道管の発癌過程における分子生物学的視点からの解明と、併せて早期診断法および新規治療法の開発を検討する。

本研究により胆道癌の早期発見が可能となり、予後を改善できれば社会的貢献度は絶大であると考えられる。

2. 研究の目的

胆道癌の発癌過程におけるセネセンスの関与を明らかにし、さらにセネセンスに関連するmicroRNAを解析する。また、胆汁中のmicroRNAを解析することで、胆道癌のスクリーニングに有用かを検討する。

3. 研究の方法

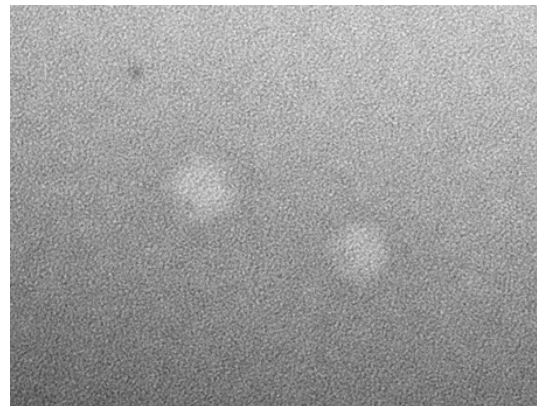
切除した胆道癌のホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)を用いて、セネセンスマーカーとして認知されているSA- β -GAL, p16, p15, Dec1, DcR2の免疫染色を行い、セネセンスの関与を確認する。

正常胆道上皮、胆道癌前癌病変、胆道癌の症例において、FFPEからmicroRNAの発現を確認し、バイオマーカーとして使用可能な候補をマイクロアレイ解析を行うことでリストアップする。現時点の候補としては、microRNA(miR)-15b, miR-20a, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-26a, miR-28, miR-29, miR-30, miR-34, miR-106b, miR-128, miR-141, miR-146a,b, miR-155, miR-182a, miR-183, miR-505, miR-519, miR-885-5pである。これらのmicroRNAは胆汁からも抽出し、胆汁中microRNAが胆道癌の早期診断に有用であるかを検討する。

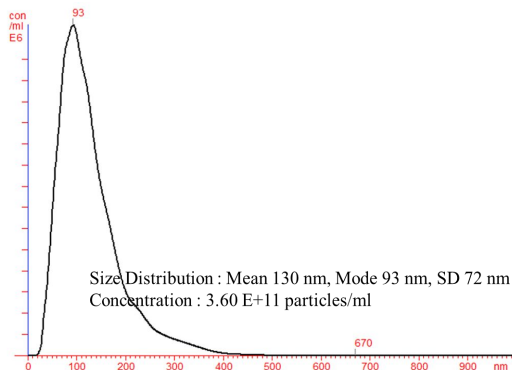
4. 研究成果

まず、胆汁中のmicroRNA抽出を試みた。特に胆道癌発癌高危険因子である膵胆管合流異常に注目して、術前のERC下に採取し

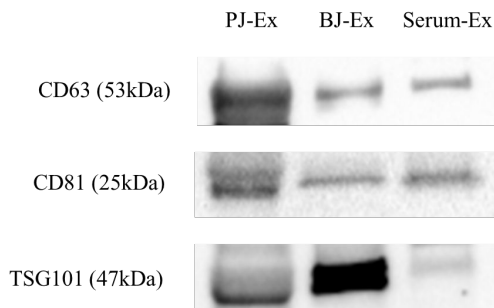
た胆汁を使用した。具体的には、ERCPの際、胆管にカニューレションした後、造影を行う前に胆汁を採取した。すぐに解析できない場合は、使用まで-80で保存した。採取した胆汁からRNAを抽出し、microRNAの定量を行った。以前よりわれわれは唾液を用いてmicroRNA解析を行ってきており、³⁾同様の方法を用いて解析を行ったが、胆汁では同様の手技ではRNAの抽出は困難であった。そこで胆汁中のエクソソーム解析を行うこととした。エクソソームとは脂質二重膜で覆われた小胞であり、核酸やタンパクが内包されている。それゆえ、内包される核酸は安定しているといわれている。⁴⁾胆汁中エクソソーム中のmicroRNAであれば安定して解析できる可能性を考えた。エクソソームは超遠心法により抽出した。具体的には、胆汁を16500gで遠心分離して夾雑物を除去した後、200nmのフィルターで濾過した。その後、120000gで超遠心を行った後、沈渣をエクソソームとして回収することとした。沈渣はPBSを用いて溶解した。エクソソームの証明としては電子顕微鏡で小胞の確認、ナノ粒子トラッキング解析(Nanosight)、エクソソームマーカー解析(CD63, etc)が必要とされている。まず、電子顕微鏡を用いて、回収物内に100nmほどの小胞があるかをNegative stain法で確認した。次に、溶液内の小胞の大きさが均等に100nm前後となっているかを確認すべく、Nano sightを用いてナノ粒子トラッキング解析を行った。粒子のブラウン運動を観察することで、粒子の濃度と直径が観察できる解析であり、100nmほどの粒子を中心に回収できていたことが示された。最後に、回収した小胞がエクソソームであることを確認すべく、エクソソームのマーカータンパクと言われるCD63、CD81、TSG101の発現をウエスタンブロットで確認した。胆汁を用いた解析で安定してを再現性をもって示すことができた。



電子顕微鏡により、Negative stain法を使用して約100nmほどの小胞を確認した。



ナノ粒子トラッキング解析(Nanosight)により、サンプル中に 93nm の粒子を中心に回収できていることを確認した。



ウエスタンブロットによりエクソソームマーカータンパクの発現を確認した。
(PJ-Ex; pancreatic juice-exosome, BJ; bile juice)

また、胆汁中エクソソーム内の microRNA は安定して定量可能であった。全胆汁中の microRNA とエクソソーム内の microRNA を室温で保存し、degrade の程度を比較したところ、全胆汁中では時間の経過とともに容易に degrade したが、エクソソーム内の microRNA は非常に安定していることが示された。よって、胆汁中エクソソーム内の microRNA を使用することはバイオマーカーとしても解析が比較的容易である可能性が示唆された。今後の方針として、マイクロアレイ解析を行うことで、バイオマーカーとして候補となりうる microRNA や、セネセンスに関わる microRNA を検索する。セネセンスマーカーの免疫染色の結果と対比させ、セネセンス関連の microRNA の候補があった場合は、当院で保存している胆汁を使用して PCR 法による validation を行う予定である。

<引用文献>

Ohtani N, Hara E. Roles and mechanisms of cellular senescence

inregulation of tissue homeostasis. Cancer Sci. 2013;104:525-30.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 2009;136:215-33.

Sadakari Y, Ohtsuka T, Ohuchida K, et al. MicroRNA expression analyses in preoperative pancreatic juice samples of pancreatic ductal adenocarcinoma. JOP 2010;11:587-92.

Silverman JM, Reiner NE. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. Cell Microbiol 2011;13:1-9.

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 1 件)

Fujimoto T, Ohtsuka T, Nakashima Y, Gotoh Y, Date K, Mori Y, Sadakari Y, Takahata S, Oda Y, Nakamura M. Elevated bile amylase level without pancreaticobiliary maljunction is a risk factor for gallbladder carcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2017 Feb;24(2):103-108. doi: 10.1002/jhbp.421. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

藤本 崇聡, 大塚 隆生, 中村 聡, 後藤 佳登, 中島 陽平, 伊達 健治朗, 森 泰寿, 仲田 興平, 宮坂 義浩, 持留 直希, 小田 義直, 中村 雅史. 膵・胆管合流異常症術後の長期成績からみた治療戦略. 第 117 回日本外科学会定期学術集会. 2017 年 4 月 27 日. 神奈川県横浜市.

森 泰寿, 大塚 隆生, 藤本 崇聡, 貞苺 良彦, 仲田 興平, 宮坂 義浩, 中村 雅史. ENGBD による胆汁細胞診と胆汁中アミラーゼ値測定による胆嚢癌術前診断の可能性. 第 53 回日本胆道学会学術集会. 2017 年 9 月 29 日. 山形県山形市.

藤本 崇聡, 大塚 隆生, 中村 聡, 後藤 佳登, 中島 陽平, 伊達 健治朗, 木村 英世, 松永 壮人, 森 泰寿, 貞苺 良彦, 仲田 興平, 宮坂 義浩, 中村 雅史. 胆嚢癌における潜在的膵液胆管逆流現象の意義. 第 52 回日本胆道学会学術集会. 2016 年 9 月 29 日. 神奈川県横浜市.

〔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

高畑 俊一 (TAKAHATA, Shunichi)
九州大学医学研究院・共同研究員
研究者番号：50437779

(2) 研究分担者

大塚 隆生 (OHTSUKA, Takao)
九州大学医学研究院・准教授
研究者番号：20372766

森 泰寿 (MORI, Yasuhisa)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：50632642

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()