

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18432

研究課題名(和文) 膵癌間質に注目した抗癌剤感受性試験法確立に関する研究

研究課題名(英文) Digital PCR quantification of fibrosis-related miRNAs as serum biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma

研究代表者

鈴木 玲 (Suzuki, Rei)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80590546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000 円

研究成果の概要(和文)：膵癌は多くの抗がん薬に抵抗性であり、その耐性機序として膵癌内に形成される、細胞外基質・炎症細胞・膵星細胞からなる、豊富な線維化が挙げられる。線維化形成機序を明らかにする事は膵癌の診断、抗がん薬感受性予測への応用が期待できる。本研究では、細胞実験により同定された3つの膵癌線維化関連microRNA (mir-328, mir-382, mir-let-7d)を対象とした。膵癌患者と正常対照の血清中miRNAを高感度PCR (digital PCR) で定量した際に何れも良悪性の鑑別に有用である事が明らかとなった。また、塩酸ゲムシタビンの効果予測に利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we utilized digital PCR to measure serum miRNA expression in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients. We firstly confirmed miRNAs which significantly altered expression in human pancreatic stellate cells (hPSC) co-cultured with PDAC cell lines compared with normal hPSC. We found that mir-328, mir-382 and mir-let-7d significantly altered its expression along with enhanced fibrosis-related gene expressions. Serum miRNA from PDAC patients and healthy controls was extracted and absolute quantitation of the miRNAs was performed with digital PCR. In comparison of expression level of 3 serum circulating miRNAs between 22 PDAC patients and 20 healthy controls, these 3 miRNAs could discriminate cancer from controls and yielded area under curve (AUC) of 0.76 for mir-328, 0.69 for mir-382 and 0.85 for mir-let-7d, respectively. We concluded that digital PCR quantification of fibrosis-related miRNAs can be useful serum biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 microRNA digital PCR 抗がん薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の研究で、膵癌は抗癌剤への様々な耐性メカニズムを持つことが明らかとなり、その一つとして豊富な細胞外基質(ECM: extracellular matrix)、膵星細胞(PSCs: pancreatic stellate cells)・線維芽細胞、炎症細胞浸潤から形成される腫瘍内の desmoplastic reaction が知られている。なかでも PSCs は 1)collagen や hyaluronan 等の ECM の分泌、2)膵癌細胞の増殖能と遊走能の向上、3)paracrine あるいは autocrine に作用する growth factors や cytokines の放出、等の多様な役割を持っており、PSCs が多く存在する癌は上記のメカニズムから抗癌剤に対して耐性があると推測される(図 1)。実際、PSCs のマーカーである SMA (alpha-smooth muscle antigen) が腫瘍内間質に多く発現されている膵癌患者の術後予後は不良であり、また抗癌剤への感受性が低いことが知られている。したがって、SMA による活動性 PSCs の多寡、PSCs の増殖・活動性を制御に関与する分子(sonic hedge hog 等)の発現量、あるいは ECM 産出に関与する酵素(collagen synthase, hyaluronan synthase 等)の腫瘍内での発現量を評価することで、抗癌剤の感受性を予想できる可能性がある。

(2)

上記背景をうけ、非侵襲的診断手技(超音波内視鏡ガイド下生検など)による間質反応の定量化と抗がん薬感受性予測法の確立を目的とした。しかし、超音波内視鏡ガイド下生検検体から抽出された total RNA の質・量が不安定であり、汎用性の観点から研究の継続は困難と判断した。そのため、検体採取法が確立され、手技の容易な血液検体を研究対象へと変更した。

2. 研究の目的

膵癌関連間質反応の関連する血液マーカーを同定し、膵癌の診断及び抗がん薬の感受性予測への応用への可能性を検討する事を目的とした。血液マーカーとしては microRNA (miRNA)を対象とした。

3. 研究の方法

(1) 候補 miRNA の同定

ヒト膵癌細胞株(Panc-1 と BxPC-3)とヒト膵星細胞 hPSC21-S/T を 72 時間共培養し、星細胞の活性化マーカーである alpha-smooth muscle actin (-SMA)、platelet derived growth factor receptor (PDGFR), type I collagen (COL1A1) の発現の変化を検討した。また、同共培養系において星細胞で発現が変化する miRNA を pathway-focused miScript miRNA PCR Array (Qiagen)により測定した。

(2) 候補 miRNA と線維化関連遺伝子発現の相関についての確認

(1) で同定された miRNA と線維化の関連を明らかにすべく、星細胞において miRNA mimic/inhibitor を用いた transient transfection を施行した。miRNA の発現を人為的に増強あるいは減弱させた際の星細胞における -SMA、PDGFR、COL1A1 の発現の変化を real-time PCR で確認した。

(3) Digital PCR による血清中 miRNA 測定

膵癌患者 22 例、正常対照 20 例の血液を採取し、血清を分離した。血清(200μl)中の miRNA を miRNeasy Serum/ Plasma Kit (Qiagen)を用いて抽出し、cDNA を合成した。合成した cDNA を用い、Quant-Studio 3D Digital PCR System (Thermo Fisher)を用いて標的 miRNA の絶対定量を行った。

(4) CT による膵癌線維化測定

造影 CT による膵間質量の定量化については既報があり(Koay EJ, et al. J Clin Invest 2014;124:1525-36)、膵癌患者血清中の miRNA 量と CT で得られた線維化推定値の相関について検討した。

なお、既報による線維化推定値の算出方法は下記による。撮影タイミングは動脈相 40 秒、門脈相 70 秒、平衡相 120 秒とした。

膵癌:

HUm1=動脈相病変 CT 値(HU)-単純 CT 病変 CT 値(HU)

HUm2=門脈相病変 CT 値(HU)-単純 CT 病変 CT 値(HU)

膵病変 area under curve(AUC) = $5 \times \text{HUm1} + 35 \times (\text{HUm1} + \text{HUm2})$

正常膵:

HUp1=動脈相正常膵 CT 値(HU)-単純 CT 正常膵 CT 値(HU)

HUp2=門脈相正常膵 CT 値(HU)-単純 CT 正常膵 CT 値(HU)

正常膵 AUC = $5 \times \text{HUp1} + 35 \times (\text{HUp1} + \text{HUp2})$

Normalized AUC (線維化推定値)=膵病変 AUC / 正常膵 AUC

4. 研究成果

(1) ヒト膵癌細胞株と膵星細胞の共培養により線維化関連遺伝子及び複数の miRNA の発現が変化する

共培養系中の膵星細胞より total RNA を抽出し、3 つの線維化関連遺伝子の発現について検討したところ、癌細胞と共培養しない系に比べ、有意に 3 つの遺伝子の発現が増加していた(図 1)。また、線維化に関連する可能性のある 84 の miRNA を対象とした miRNA PCR array では、図表のように複数の miRNA の発現が変化していた。その内、

Panc-1+hPSC21-S/T 共培養及びBxPC-3+hPSC21-S/T 共培養で共通して発現が変化していた mir-328-3p、mir-382-5p、mir-let-7d-5p を研究対象とした。3 つの miRNA の発現の変化は Taqman probe を用いた real-PCR で検証した。

図 1

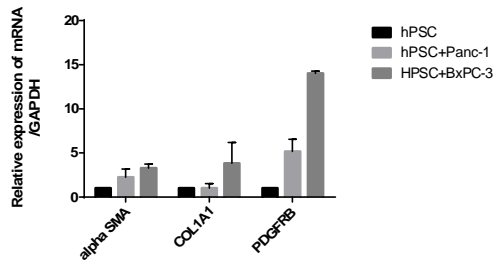


図 2

| hPSC+Panc-1 | | | |
|----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| Genes Over-Expressed | | Genes Under-Expressed | |
| Mature ID | Fold Regulation | Mature ID | Fold Regulation |
| hsa-miR-211-5p | 2.7646 | hsa-let-7d-5p | -3.0525 |
| hsa-miR-328-3p | 20.8029 | hsa-miR-101-3p | -3.2165 |
| hsa-miR-382-5p | 2.606 | hsa-miR-146b-5p | -3.0884 |
| hsa-miR-449a | 2.6139 | hsa-miR-15b-5p | -3.0927 |
| hsa-miR-661 | 2.6825 | hsa-miR-204-5p | -3.0786 |

| hPSC+BxPC-3 | | | |
|----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| Genes Over-Expressed | | Genes Under-Expressed | |
| Mature ID | Fold Regulation | Mature ID | Fold Regulation |
| hsa-miR-328-3p | 2.6017 | hsa-let-7d-5p | -3.0549 |
| hsa-miR-382-5p | 2.5988 | hsa-miR-1-3p | -3.0784 |
| | | hsa-miR-101-3p | -3.2794 |
| | | hsa-miR-107 | -3.0819 |
| | | hsa-miR-126-3p | -3.1379 |

(2) miRNA mimic/inhibitor により膵星細胞において線維化関連遺伝子の発現が増強する

(1) で選択された 3 つの miRNA と線維化関連遺伝子の相関を明らかにすべく、mir-328 と mir-382 に対する miRNA mimic (mirVana miRNA mimic, Thermo Fisher) と mir-let-7d に対する miRNA inhibitor (mirVana miRNA inhibitor, Thermo Fisher) を添加した (最終濃度 10nM、20nM)。同濃度で miRNA の発現は増強あるいは減弱し、それに伴い 3 つの線維化関連遺伝子の発現の変化が再現された (図 3)。

(3) 血清中膵癌線維化関連 miRNA は診断及び化学療法の感受性予測因子になり得る

血清中により抽出した miRNA を digital PCR で定量した。共培養系で発現が増強された 2 つの miRNA は何れも正常対照に比べ膵癌患者血清中の高値であった。また、共培養系では発現が減弱した mir-let-7d に関しては、膵癌患者血清中で低値であった。良悪性鑑別能

は下記の通りであった (表 1)。さらに、塩酸ゲムシタピンを用いた化学療法が施行された 17 例の検討では、血清中 mir-382 が高値の患者は低値の患者に比べ予後は有意に不良であった。これらの事から線維化関連 miRNA は良悪性診断と同様に化学療法の感受性予測マーカーとして利用できる可能性が示唆された。

図 3

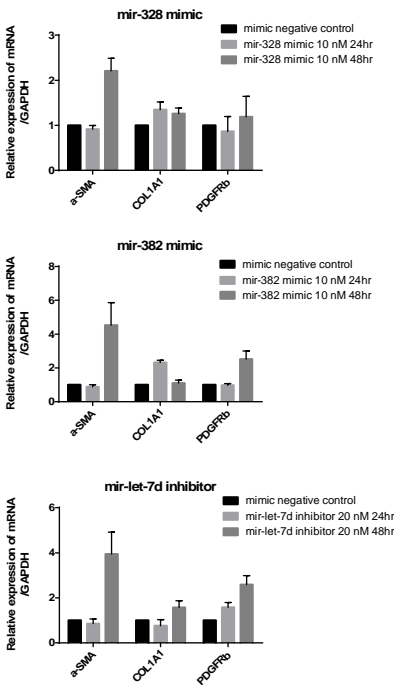


表 1

| Marker | 感度 | 特異度 | AUC |
|------------|------|------|------|
| mir-328 | 63.6 | 85.0 | 0.76 |
| mir-382 | 45.4 | 80.0 | 0.69 |
| mir-let-7d | 59.1 | 95.0 | 0.85 |
| CA19-9 | 77.2 | 76.4 | 0.73 |

(4) CT で予想された膵癌線維化と血中 miRNA の値は相関する

既定の CT プロトコールで CT を撮影した膵癌 16 例において、線維化推定値である normalized AUC と血中の miRNA の発現との相関について検討した。mir-382 は normalized AUC と正の相関 ($r = 0.52$, $P = 0.04$) を示し、mir-let-7d は負の相関 ($r = -0.51$, $P = 0.04$) を示した。これらの事から間接的にはではあるが、血中 miRNA は膵癌線維化を予測するマーカーとして利用が可能性である。

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 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1203_ja.html

6．研究組織

(1)研究代表者

鈴木 玲 (REI SUZUKI)

福島県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：80590546