

令和元年6月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10601

研究課題名(和文) 膵癌前癌病変周囲の間質細胞由来exosomeに着目したバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of biomarkers target on exosomes which derived from stromal cells in premalignant microenvironment.

研究代表者

宮坂 義浩 (MIYASAKA, Yoshihiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40507795

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)：膵癌ハイリスク患者の疑似的マウスモデルを作成し、膵癌周辺微小環境内に孤立性に存在する非癌性の膵腺房細胞に発癌関連遺伝子群の発現上昇が見られることを明らかにした。また、膵癌患者の膵液から抽出したexosome内に含まれるexosome由来マイクロRNA(ex-miR)が、安定性において全膵液内のマイクロRNAより優れ、診断能においても数種類のex-miRが血清CA19-9や膵液細胞診より優れており、膵癌診断のバイオマーカーとして有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の唯一の根治的治療は外科切除であるが、ほとんどの症例が切除不能の状態と診断される。よって、膵臓癌の治療成績改善のためには、画期的な早期診断法によって切除可能な段階で診断することが重要である。本研究において膵癌ハイリスク患者を模したマウスモデルを用いて微小環境内の細胞から早期診断のバイオマーカーとなりうる遺伝子候補を検索し、ヒト膵液由来のexosomeに含まれるマイクロRNAが優れた膵癌診断のバイオマーカーとなりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Most PDAC patients are diagnosed with advanced stage. Identification of biomarkers for early and definitive PDAC diagnosis is crucial. ADM known as morphological change of acinar cells, occurs during pancreatitis and pancreatic cancer progression etc. It has been suggested that ADM may lead to precancerous lesion that precedes pancreatic cancer. We revealed characterization of the ADM phenotype associated with different pathological conditions by RNA sequencing of tissues which captured by laser capture microdissection.

To investigate whether exosomal microRNAs (ex-miRs) could be used as biomarkers for PDAC, we isolated exosomes from pancreatic juice from patients with PDAC and chronic pancreatitis (CP). Relative expression levels of exosomal miR-21 and miR-155, which were reported to overexpress in PDAC tissue and pancreatic juice, were significantly higher in PDAC patients compared with CP patients. Ex-miRs, including ex-miR-21 and ex-miR-155, may represent novel biomarkers of PDAC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：PDAC ADM exosome micro RNA biomarker

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 26 年度の膵臓癌の癌死亡率は本邦において第 4 位であり、年次推移でも増加傾向にある。5 年生存率は約 5% であり、これは膵癌がその解剖学的特徴から早期診断が困難であることや、膵癌細胞が早期から浸潤・転移を起こす悪性度の高い癌種であることがその原因と考えられている。現在でも唯一の根治的治療は外科切除であるが、ほとんどの症例が切除不能の状態と診断される。よって、膵臓癌の治療成績改善のためには、画期的な早期診断法によって切除可能な段階で診断し、根治手術の対象となる患者を増加させることが重要と考えられ、これらに対する社会的要請度・貢献度・緊急度は非常に高い。

近年、開発された遺伝子改変による膵自然発癌モデル(KC マウス, KPC マウス)は前癌病変発癌 浸潤 転移という疾患の経過を再現し、得られる病理組織像もヒトに酷似したものであるため、現在もっとも注目されているマウスモデルである (Hingorani S.R. et al. 2005. Cancer Cell)。これらのマウスモデルを使用して、膵癌発症の危険因子に関する研究として、慢性膵炎を誘導させた解析 (Guerra C. et al. Cancer Cell) や、食餌性に肥満を誘導した研究 (Phillip B. 2013. Gastroenterology)、ニコチンを投与した研究 (Hermann P.C. et al. 2014. Gastroenterology) があり、いずれも前癌病変や発癌の増加を報告している。すなわち、これらのマウスモデルはヒトの膵癌発症ハイリスク群を疑似的に再現し、前癌病変の出現から発癌の過程を解析するのに優れた研究ツールであると考えられるが、過去の報告は前癌病変や浸潤癌そのものに着目した研究が中心で癌微小環境に着目したものはこれまでに報告がない。

膵癌の病理学的特徴として desmoplasia と呼ばれる過剰な間質増生がある。その中でも膵星細胞は desmoplasia の形成に中心的な役割を果たし、膵星細胞によって線維化が過剰に亢進した環境は治療抵抗性に関与し、薬剤送達率に寄与することが報告されている。(Olive et al. 2009. Science.) (Provenzano et al. 2011. Cell.)。この膵星細胞は正常の膵組織中には非活性化型の状態として存在し、炎症や発癌によって活性化型へと変化し、種々の液性因子や細胞外基質の産生を増加させる。ヒトおよび膵癌自然発症マウスモデルの組織像を観察すると、前癌病変の周囲には膵星細胞の増生があり、前癌病変の発症に際しても何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。また、我々の研究からも膵星細胞は多様性をもった細胞集団であることが分かっており、前癌病変の周囲には特定の機能を持った星細胞集団が存在している可能性がある。よって、前癌病変周囲に特異的に存在する膵星細胞に着目し、そこから分泌される因子が同定できれば、膵癌を前癌病変の段階で診断し得る早期診断のバイオマーカーとなる可能性がある。

エクソゾームは 50~150nm の膜につつまれた小胞で、エキソサイトーシスによって細胞外に分泌される。その内部には種々のタンパク、マイクロ RNA を含んでいる。正常な細胞からも分泌され、細胞間の情報伝達を担うことで生体の恒常性の維持に関わっていると考えられている。癌細胞が分泌するエクソゾームやマイクロ RNA に関しては多数の報告があり、膵癌でも癌細胞が放出する Glypican 1 が有望なバイオマーカーであることが報告された (Melo S.A. et al. 2015. Nature)。その一方で、癌微小環境内の間質細胞の分泌するエクソゾームに着目した報告はなく、その意義は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、様々なタンパク質や核酸を含む直径 100nm 程度の小胞で細胞間の情報伝達を担うエクソゾームに着目し、膵前癌病変周囲の間質細胞に由来するエクソゾームを同定・解析して新たな早期診断バイオマーカーを開発することである。

3. 研究の方法

膵癌発症ハイリスク患者の疑似的マウスモデルの作成

膵自然発癌モデル(KC マウス, KPC マウス)を用いて膵癌発症ハイリスク患者を疑似的に再現するため、慢性膵炎モデル、肥満モデルを作成した。慢性膵炎モデルはセルレインの腹腔内投与、肥満モデルは High Fat Diet の投与により作成し、末梢血や組織の採取と膵星細胞の outgrowth 法による初代培養を行った。

膵癌発症ハイリスクモデルの癌微小環境組織回収、RNA シーケンス解析

KC マウスの同所移植モデル、膵炎誘導モデル、KPC マウスの凍結切片から Laser-capture microdissection によって膵癌浸潤部近傍、炎症性、孤立性の腺房細胞をそれぞれ採取し、採取した組織から全 RNA を抽出して Mouse PanCancer Pathways Panel (XT-CSO-MPATH1-12) を用いた遺伝子発現解析を行った。また、unctional annotation clustering 解析、Gene set enrichment 解析 (GSEA) などによる機能予測解析を行った。

膵癌、慢性膵炎からのエクソゾーム抽出

2011 年から 2014 年にかけて当施設で施行した内視鏡的逆行性胆管膵管造影 (ERCP) 検査の際に採取した 35 例の膵液を、臨床病理学的特徴から 27 例の膵癌患者、8 例の慢性膵炎患者に分類した。膵癌は細胞診または病理組織診にて診断確定し、慢性膵炎については病理組織診または、12 か月以上の画像追跡観察などによる臨床診断基準に基づいて診断を確定した。採取した膵液から超遠心法にてエクソゾームを抽出した; 300 x g 10 分間遠心、回収した上清を 16,500

×g 20 分間遠心して細胞不純物除去。その上清を 0.2 μm フィルターで濾過後に 140,000 ×g 70 分間遠心してリン酸緩衝食塩水(PBS)に回収。

膵液、エクソゾームからのマイクロ RNA 抽出、マイクロアレイ解析
500 μl の膵液から抽出したエクソゾーム、あるいは 500 μl の膵液全量から miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてマイクロ RNA を抽出。質については NanoDrop ND-1000 Agilent と Bioanalyzer 2100 を用いて評価した。抽出したマイクロ RNA についてマイクロアレイで網羅的解析を行い、膵癌由来と慢性膵炎由来の ex-miR を比較することで、膵癌早期診断のバイオマーカーとしての候補を検索した。

4. 研究成果

膵癌ハイリスク患者の疑似的モデル作成

膵癌自然発生遺伝子改変モデルマウス(KPC マウス)を用いて膵癌ハイリスク患者の疑似的モデルとして、High fat diet の投与による食餌性の肥満モデルマウスとセルレインの腹腔内投与による膵炎モデルマウスを作成した。肥満モデルマウスでは膵発癌とともに、膵周囲脂肪組織の増加、腫瘍サイズの増大と遠隔転移の増加を認めた(図 1)。また、肥満マウスモデルで増加した脂肪組織が膵癌の進行に与える影響を解析するため、invitro において、脂肪細胞由来の培養上清を癌細胞に添加して影響を評価したところ、脂肪細胞より放出された脂肪酸が癌細胞の浸潤・遊走能を亢進し、さらにゲムシタピン抵抗性を増加させることが分かった。膵炎モデルマウスでは、膵前癌病変周囲に存在する膵星細胞の樹立を多数行った。

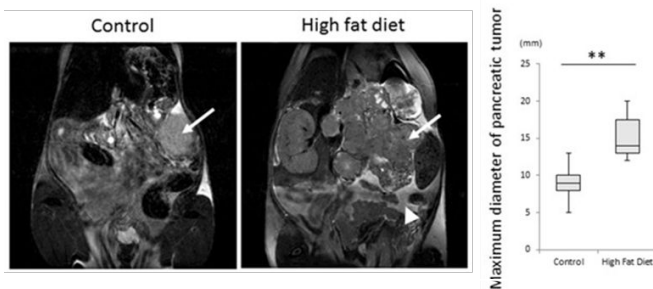


図 1. 肥満マウスモデルの腫瘍形成能評価

膵癌周辺で腺房導管異形成 (acinar to ductal metaplasia : ADM) を来した腺房細胞の RNA シーケンス解析

膵癌周辺や慢性膵炎で生じる膵腺房細胞の形態的变化として ADM が知られており、前癌病変である膵上皮内腫瘍性病変 (pancreatic intraepithelial neoplasia: PanIN) を形成する素地となることが示唆されている。膵癌や慢性膵炎の組織内において腺房細胞が癌微小環境に着目した診断バイオマーカー検索の一環として KPC マウスの膵癌浸潤部近傍に存在する ADM (CA-ADM) をレーザーキャプチャーマイクロダイセクションによって取り出し、RNA シーケンサーで発現解析を行った。さらに膵癌組織内に孤立性に存在する ADM (SA-ADM)、慢性膵炎の周辺に存在する ADM (CP-ADM) についても同様に解析を行い、正常腺房細胞との比較を行った。CA-ADM では成長因子、サイトカイン、分泌性因子に関連した遺伝子 (*Bmp8a*, *Fgf8*, *Fgf22*, *112* など) の発現上昇が見られ、CP-ADM では炎症関連の遺伝子 (*Mecom*, *1115*, *Nfe212*, *Irak2* など) 発現上昇が見られた。SP-ADM では他の 2 つと比較して特異的な遺伝子発現変化は見られなかったが、Gene score enrichment analysis (GSEA) を行うと、CA-ADM で癌関連遺伝子群、CP-ADM で炎症関連遺伝子群、SP-ADM では発癌関連遺伝子群の発現上昇が見られた(図 2)。

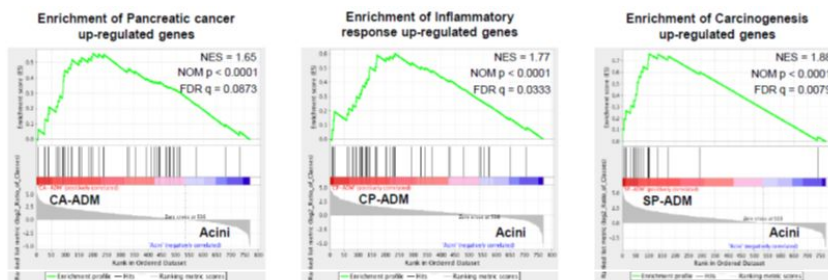


図 2. 腺房細胞 GSEA 解析 左: 膵癌近傍, 中: 慢性膵炎, 右: 孤立性腺房

切除可能膵癌患者、慢性膵炎患者の膵液中エクソゾームの抽出

ERCP 検査の際に、膵液を採取しえたヒト膵癌切除術前 27 例と膵癌のハイリスク因子である慢性膵炎 8 例の膵液から、超遠心法を用いてエクソゾームの抽出を行った。抽出したエクソゾームは電子顕微鏡で直

径 80nm 程度の小胞であることを観察し、Western blotting 法でエクソゾームマーカーである

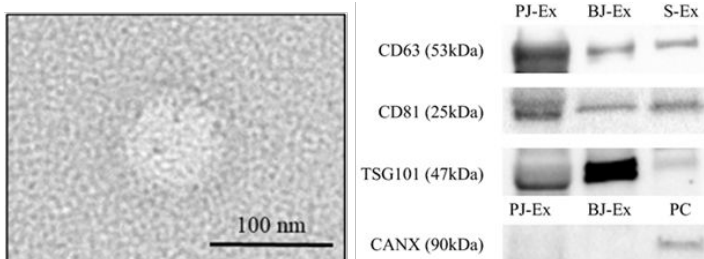


図 3. 抽出したエクソゾームの電子顕微鏡画像とタンパク発現

CD63、CD81、TSG101 の発現を確認した(図 3)。またナノ粒子トラッキング解析法(NTA)で小胞の濃度を測定すると、 1.06×10^{11} と十分な量が採取されていることを確認した。

エクソゾームから抽出したマイクロ RNA の解析、早期診断ツールとしての評価

抽出したエクソゾームから RNA を抽出し、マイクロ RNA(miR)について発現解析を行った。miR-21、miR-155 は以前の報告において膵癌組織、あるいは膵癌症例の膵液内で発現が亢進しているとされており(Bloomston M et al. 2007. JAMA.) (Sadakari Y et al. 2010. JOP.)、今回抽出した膵癌症例の膵液エクソゾーム内にも発現が見られた。膵液内の miRNA と膵液から抽出したエクソゾーム内の miRNA(ex-miRNA)の安定性について比較すると、室温では 48 時間にわたって miR-21、ex-miR-21 とともに安定的に発現していたが、37 で保存した場合、ex-miR21 は依然安定して発現していたのに対し、miR-21 は時間とともに発現が低下しており、miRNA の安定性において ex-miR の優位性が示唆された。発現レベルについて評価を行うと、ex-miR-21、ex-miR-155 は慢性膵炎症例と比較して膵癌症例から抽出したエクソゾーム内において発現が亢進していることが確認された。膵液内の miR についても同様に発現解析を行ったが、いずれの miR についても膵癌と慢性膵炎症例で有意な発現レベルの差は見られなかった。

また、膵癌診断能を血清 CA19-9 及び膵液細胞診と比較した。エクソゾームにおける miR21、miR155 の発現解析では、慢性膵炎症例と比較し膵癌症例で有意に発現が高かった。また、ex-miR-21、ex-miR-155 の Area under the curve (AUC) を評価したところ血清 CA19-9 と比較して有意に膵癌診断能が高い結果が得られた。さらに、膵癌正診率においても、それぞれ膵液細胞診と比較して高い正診率が得られた(図 4)。

ヒト膵癌術前症例から採取した ex-miRs のマイクロアレイ解析
新たな膵癌のバイオマーカーを発見するために、ヒト膵癌術前症例から採取した ex-miRs のマイクロアレイ解析を行い、バイオマーカー候補として ex-miR320a、320b、361、145、29c の

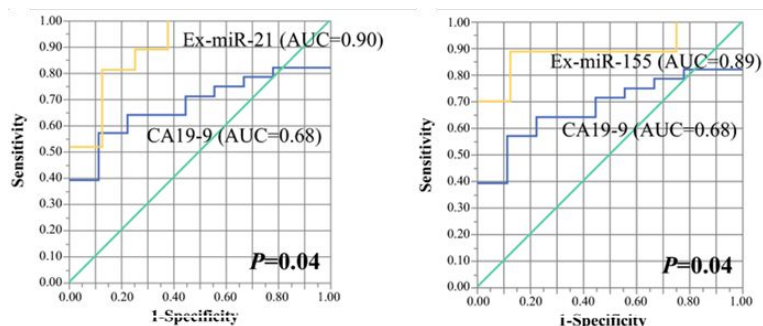


図 4. 膵液中 Ex-miRs と血清 CA19-9 の膵癌診断能比較

5 種類のマイクロ RNA を同定した。バリデーションを行ったところ、すべての ex-miRs は慢性膵炎群と比較して膵癌群で有意に高発現していた($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0009$)。AUC はそれぞれ 0.923、0.923、0.916、0.930、0.852 であり、血清 CA19-9 の AUC (0.680) と比較の比較において、ex-miR320a、320b、361、145 は血清 CA19-9 よりも有意に診断能が優れていたが($p < 0.01$)、ex-miR29c とは有意差を認めなかった($p = 0.15$)。また、ex-miRs の正診率はそれぞれ 90%、90%、85%、90%、76%であり、膵液細胞診の 71%よりも優れていることが確認できた。エクソゾームの由来細胞について、癌細胞そのものであるのか、癌関連線維芽細胞や癌関連腺房細胞であるのかなど、現時点では同定できておらず、今後の検討課題であるが、本研究において膵液中の ex-miRs が膵癌診断のバイオマーカーとして有用である可能性を示すことができ、膵癌ハイリスクマウスモデルにおける微小環境内の細胞で発現変化している遺伝子についてもバイオマーカーの候補を挙げる事ができた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Nakamura S, Sadakari Y, Ohtsuka T, Okayama T, Nakashima Y, Gotoh Y, Saeki K, Mori Y, Nakata K, Miyasaka Y, Onishi H, Oda Y, Goggins M, Nakamura M, Pancreatic Juice Exosomal MicroRNAs as Biomarkers for Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, *Ann Surg Oncol*, 26(7), 2104-2111, 2019, 査読有, DOI: 10.1245/s10434-019-07269-z.

Kibe S, Ohuchida K, Ando Y, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Shimamoto M, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Cancer-associated acinar-to-ductal metaplasia within the invasive front of pancreatic cancer contributes to local invasion. *Cancer Letters*, 444, 70-81, 2019, 査読有, DOI: 10.1016/j.canlet.2018.12.005

Koikawa K, Ohuchida K, Takesue S, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Endo S, Abe T, Okumura T, Horioka H, Sada M, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohuchida R, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M, Pancreatic stellate cells reorganize matrix components and lead pancreatic cancer invasion via the function of Endo180, *Cancer letters*, 1(412), 143-15, 2018, 査読有, DOI: 10.1016/j.canlet.2017.10

Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Sada M, Horioka K, Zheng B, Mizuuchi Y, Iwamoto C, Murata M, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka

T, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M. Autophagy Is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice. *Gastroenterology*, 152(6):1492-1506, 2017, 査読有, DOI:10.1053/j.gastro.2017.01.010

Okumura T, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Koikawa K, Iwamoto C, Miura D, Mizuuchi Y, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells, *Oncotarget*, 8(11):18280-18295, 2017, 査読有, DOI: 10.18632/oncotarget.15430

〔学会発表〕(計2件)

後藤佳登、森泰寿、大塚隆生、中村聡、中島陽平、伊達健治朗、藤本崇聡、貞効良彦、仲田興平、宮坂義浩、大内田研宙、永井英司、中村雅史、当科における膵上皮内癌の臨床病理学的検討と膵癌早期発見への展望、第117回日本外科学会定期学術集会、2017年

奥村隆志、大内田研宙、安藤陽平、岐部晋、武居晋、中山宏道、阿部俊也、遠藤翔、肥川和寛、巖子龍、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史、膵癌における膵周囲脂肪組織線維化と脂肪組織由来幹細胞の役割、第117回日本外科学会定期学術集会、2017年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：白羽根 健吾

ローマ字氏名：(SHIRAHANE, kengo)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：共同研究員

研究者番号(8桁)：10529803

研究分担者氏名：当間 宏樹

ローマ字氏名：(TOMA, hiroki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：共同研究員

研究者番号（8桁）：80437780

研究分担者氏名：大内田 研宙

ローマ字氏名：(OHUCHIDA, kenoki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：20452708
（2018年）

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。