

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10637

研究課題名(和文) 大腸癌肝転移高危険群選別を目的とした門脈系エクソソーム中RNA・タンパク質解析

研究課題名(英文) RNA / protein analysis in portal blood exosomes to detect a high risk group of colorectal cancer liver metastases

研究代表者

貞苺 良彦 (SADAKARI, Yoshihiko)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80784503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、大腸癌の手術切除標本から門脈系血液を採取し、その血液内のexosomeを抽出、解析することで、大腸癌肝転移ハイリスク群の新たな高感度バイオマーカーを明らかにすることを目的として開始された。

まず、患者由来サンプルとしてすでに集積していた膵液を用いて抽出したexosomeが研究耐用可能であることを確認し、exosome中のmiRNAレベルを測定する手法を確立した。

この確立した手法により、大腸癌手術検体の門脈系血液からのexosome抽出や、exosome由来のmiRNA抽出を検討したが解析に十分な量を確保することが困難であった。今後虚血時間などを考慮したサンプル採取方法の検討を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、タンパク質、RNA、DNAなどが封入され血液中の分解から守られている細胞外微細小胞 exosomeが癌の転移に関与していることが報告されている。

手術検体由来のexosomeから大腸癌肝転移バイオマーカーを得られることができれば、患者への追加侵襲なく、肝転移ハイリスク群を術直後に正確に選別することができ、適切なフォローアップや効果的かつ早期の薬剤使用が可能となるため予後改善が期待できる。

今回、大腸癌手術検体の門脈血からは研究に耐用可能なexosomeが得られなかったが、膵液由来のexosomeについては診断に有用なマーカーとしてmiRNAを同定することができた。

研究成果の概要(英文)：This study was started with the aim of clarifying a new high-sensitivity biomarker for the high-risk group of colorectal cancer liver metastases by collecting portal vein blood from a surgically resected specimen of colorectal cancer and extracting / analyzing exosome in the blood.

First, we confirmed that exosomes extracted from pancreatic juice were tolerable for research, and revealed that miRNA in exosomes are useful markers for diagnosing pancreatic cancer. However, it was difficult to extract a sufficient amount of exosome or miRNA derived from exosome from portal blood of colorectal cancer surgical specimens with the pancreatic method. In the future, it will be necessary to consider a sampling method that takes the ischemic time into consideration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 exosome 肝転移 微小環境

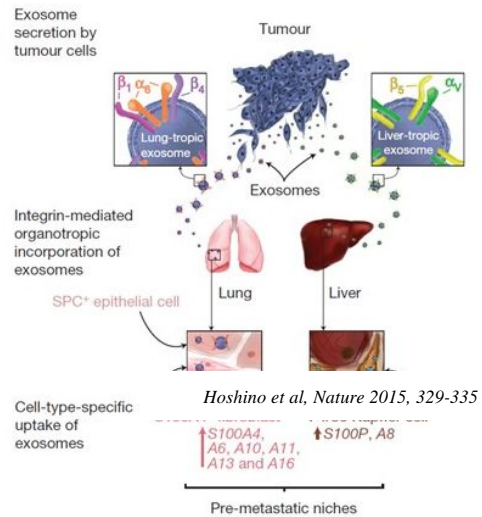
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌肝転移症例(StageIVに含まれる)は、各種画像診断による発見頻度の増加、手術手技の向上や化学療法の進歩にもかかわらず、必ずしも満足のいく成績ではない。大腸癌治療ガイドライン 2014年版の報告では病期別の5年生存率は stage : 91% ,stage : 85% ,stage a: 78% ,stage b: 60% ,stage : 18%となっている。大腸癌の肝転移は大腸癌再発様式の大部分を占め、再発の診断には腫瘍マーカー(CEA、CA19-9)、画像検索(造影CT、超音波検査)が有用である。しかし術直後、もしくは術前に肝転移ハイリスク群を拾い上げることは現時点では不可能であり、再発診断時には病状進行により追加切除や推奨される抗癌剤治療を行えないことも多い。

近年、細胞外微小小胞である exosome (extracellular vesicles) が癌転移に関係があることが報告されている(Costa-Silva B et al, Nat Cell Biol, 2015, 816-826)。Exosome は癌細胞を含むすべての細胞から分泌される直径 30 ~ 100nm ほどの脂質二重膜により形成される小胞で、内部にタンパク質、RNA、DNA などが格納されており、血液中の RNase、DNase から守られている。それぞれが転移・浸潤をはじめ様々な働きを考えると考えられており、exosome 内のインテグリン鎖 β 鎖の組み合わせにより転移先の臓器特異性が決定され、特に肝転移に対してはインテグリン $\alpha v \beta 5$ が転移に関与していることが報告されている(Hoshino et al, Nature 2015, 329-335)。

これまでに門脈系血液の exosome の解析を行った報告はなく、門脈血中の大腸癌由来の exosome を抽出し、含有されるたんぱく質や RNA の解析から大腸癌肝転移ハイリスク群を選別できるバイオマーカーを同定することができれば、肝転移ハイリスク群を術直後に正確に選別することができ、適切なフォローアップや効果的かつ早期の治療介入が可能となり、最終的には予後改善につながると考えられた。



2. 研究の目的

本研究は、大腸癌の手術切除標本から門脈系血液を採取し、その血液内の exosome を抽出、解析することで、大腸癌肝転移ハイリスク群の新たな高感度バイオマーカーを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

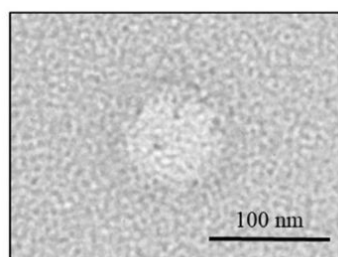
当研究室ではこれまで膵臓癌症例における膵液採取を積極的に行ってきたため、まずは膵液を用いた exosome 抽出や miRNA の解析手法を確立する。

大腸癌に関しては、盲腸～横行結腸に発生する癌の場合は回結腸静脈～中結腸静脈が、下行結腸～直腸に発生する癌の場合は下腸間膜静脈が、それぞれ支配静脈であり、術中に同静脈を結紮・切離し、標本摘出後に同静脈から採血を行う。膵液で確立した手技を利用し門脈血液から exosome を抽出し ELISA によるタンパク解析を、さらに exosome 中の RNA についてアレイ解析を行う。

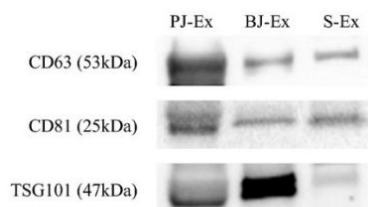
4. 研究成果

1. exosome の抽出、解析手法の確立

膵癌患者より内視鏡的に採取した膵液を遠心分離、セルストレイナー、超遠心分離を組み合わせることで exosome を抽出した。抽出物は、透過型電子顕微鏡(TEM)を使用し可視化し、ナノ粒子追跡分析(NTA)によってサイズ分布と濃度を分析した。



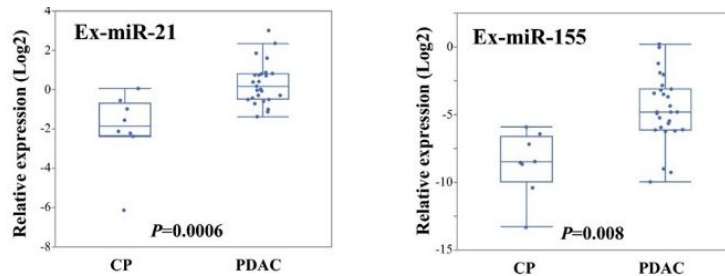
透過電子顕微鏡を用いた exosome の画像化



膵液から得られた小胞には CD63、CD81、および TSG101 が存在する
※PJ-; 膵液由来、BJ-; 胆汁由来、S-; 血清由来

2. exosome からの micro RNA(miR)抽出、解析手法の確立

miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用い、1.で抽出した exosome から miR を抽出した。膵癌細胞では慢性膵炎細胞と比較し miR-21, miR-155 が過剰発現しているとの過去の報告(Bloomston M, et al, JAMA, 2007, 1901-8)から、それらに着目した。qRT-PCR を行い発現レベルを評価したところ、膵液から抽出した exosome における miR-21, miR-155 の相対的な発現レベルは、慢性膵炎患者と比較し膵癌患者において有意に高かった。

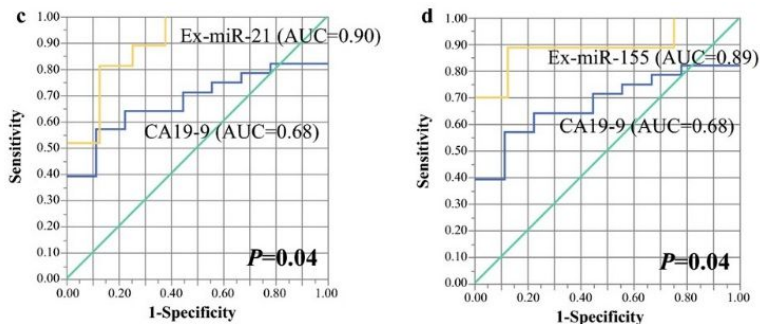


膵液から抽出したexosomeにおけるmiR-21, miR-155の相対的な発現レベルは、CP；慢性膵炎患者と比較してPDAC；膵癌患者において有意に高かった

3. exosome 由来 miR のバイオマーカーとしての評価

膵液 exosome 由来 miR-21, 155 の AUC 値は、血清 CA19-9 値より有意に高いことが示された。

さらに、膵液細胞診と組み合わせたところ複合テストの感度は 93%/93%、特異度は 88%/88% で、極めて高感度なマーカーとして機能し得た。



膵液exosome由来miR-21, 155のAUC値は、血清CA19-9より有意に高かった

4. 大腸癌手術標本における exosome 抽出

膵液を用いた解析で確立した手法により、大腸癌手術検体より得られた門脈系血液サンプルから exosome の抽出を計画した。しかし、各種条件を変更し抽出を繰り返し、ナノ粒子トラッキング解析、及び電子顕微鏡での小胞確認を行ったが、十分量の exosome 抽出は困難であった。加えて microRNA の抽出もこころみたが、exosome 由来の miRNA は極めて低濃度で、バイオマーカーとしての定量的な検討は難しかった。

手術切除標本からの門脈系血液の採取は、術中に動脈や静脈を結紮切離し、実際に組織を体外に摘出してその切除組織から血液を採取するため、虚血時間が生じてしまうこと、症例により虚血時間がさまざまであることが、安定した exosome や miRNA 抽出を困難にしている原因と考えられ、今後虚血時間などを考慮したサインプル採取方法の工夫を重ねながら、引き続き exosome の抽出、解析に取り組む方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koba R, Fujita H, Nishibori M, Saeki K, Nagayoshi K, Sadakari Y, Nagai S, Sekizawa O, Nitta K, Manabe T, Ueki T, Ishida T, Oda Y, Nakamura M.	4. 巻 146
2. 論文標題 Quantitative evaluation of the intratumoral distribution of platinum in oxaliplatin treated rectal cancer: In situ visualization of platinum via synchrotron radiation X ray fluorescence spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2498 ~ 2509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura So, Sadakari Yoshihiko, Ohtsuka Takao, Okayama Takafumi, Nakashima Yohei, Gotoh Yoshitaka, Saeki Kiyoshi, Mori Yasuhisa, Nakata Kohei, Miyasaka Yoshihiro, Onishi Hideya, Oda Yoshinao, Goggins Michael, Nakamura Masafumi	4. 巻 26
2. 論文標題 Pancreatic Juice Exosomal MicroRNAs as Biomarkers for Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 2104 ~ 2111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07269-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木庭遼、藤田逸人、西堀麻衣子、永吉絹子、貞苅良彦、永井俊太郎、関澤央輝、新田清文、大内田研宙、大塚隆生、植木隆、石田竜弘、中村雅史
2. 発表標題 Oxaliplatin投与後の大腸癌組織における蛍光X線分析 - 組織内の白金分布と治療効果との関連性の検討 -
3. 学会等名 日本分析化学会 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村聡、貞苅良彦、友杉隆宏、木村隆一郎、岡山卓史、森泰寿、仲田興平、宮坂義浩、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 十二指腸液中exosomeを利用した膵癌診断バイオマーカーの検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木庭遼、藤田逸人、西堀麻衣子、永吉絹子、貞苅良彦、永井俊太郎、関澤央輝、新田清文、大内田研宙、大塚隆生、植木隆、石田竜弘、中村雅史
2. 発表標題 腫瘍間質における直腸癌L-OHP抵抗性の誘導：放射光蛍光X線を用いた白金分布分析
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 聡、貞苅良彦、岡山卓史、中島陽平、後藤佳登、森泰寿、仲田興平、宮坂義浩、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 膵液中exosomeを利用した膵癌診断バイオマーカーの検討
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	藤田 逸人 (FUJITA Hayato) (40611281)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究 分担者	永吉 絹子 (NAGAYOSHI Kinuko) (90761015)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	