

令和元年5月30日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16565

研究課題名(和文) 膵癌早期発見を目指した十二指腸液中バイオマーカーの解析

研究課題名(英文) Analysis of S100 family proteins and exosomal microRNA in duodenal juice as a diagnostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma

研究代表者

森 泰寿 (MORI, yasuhisa)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50632642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ELISA kitを用いて膵疾患群およびコントロール群の十二指腸液中のS100A2、S100A4、S100A6、S100A11濃度測定を行った。また、十二指腸液中のエクソソームを抽出し、エクソソーム中のmiR-21、miR-155を測定した。膵癌早期発見のマーカーとしてS100蛋白質ファミリーは、その有用性が明らかとはならなかったが、十二指腸液中のエクソソーム抽出に成功し、エクソソーム中のmiR-155が膵癌早期発見のマーカーとなりうることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は他癌と比較して極めて予後不良である。この理由として膵癌は早期には症状に乏しく、発見時には進行癌であることが多いことが挙げられる。このため早期発見と効果的なスクリーニング法の開発が求められるが、微小膵癌の段階で診断されるのは極めて稀である。低侵襲に採取可能な十二指腸液中の膵癌早期発見のマーカーを検出することができれば、膵癌を早期に発見することが可能となり、予後改善の足掛かりとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：S100A2, S100A4, S100A6, and S100A11 concentrations in duodenal juice were measured using a ELISA kit. But the concentrations S100 family protein were not useful for detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. We tried to extract exosomes from duodenal juice by ultracentrifugation. We successfully isolated exosomes from duodenal juice. Also we found exosomal RNA (miR-155) might be a biomarker of pancreatic ductal adenocarcinoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 十二指腸液 エクソソーム

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

1. 研究開始当初の背景

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、膵癌は他癌と比較して必ずしも満足いく成績ではない。日本膵臓学会の報告では、切除例で膵癌病期別の3年生存率はstageで43%、stageで51%、stageで43%、stage aで19%、stage bで6%となっている。非切除例も含んだ膵癌全体の3年生存率は11%、5年生存率は過去報告で6%程度と非常に予後不良であり、依然消化器癌の中では最も予後不良である。

この理由として膵癌は早期には症状に乏しく、発見時には進行癌であることが多いことが挙げられる。このため早期発見と効果的なスクリーニング法の開発が求められるが、微小膵癌の段階で診断されるのは極めて稀である。膵癌を疑う場合は血中の膵酵素(アミラーゼ、リパーゼ、エラスターゼ、トリプシン)や腫瘍マーカー(CEA、CA19-9、Dupan-2等)を測定するが、早期診断に有用とのエビデンスは確立されていない。膵癌診断の画像検査はCTやMRI、超音波内視鏡検査(EUS)、内視鏡的膵胆管造影検査(ERCP)が挙げられるが、胃癌や大腸癌など内視鏡で直接観察し容易に病変組織を採取できる他の消化器癌と比較すると、解剖学的にアプローチが困難な部位に発生する膵癌の検出能や鑑別能は圧倒的に劣っている。

画像検査で膵癌が疑われ、確定診断を行う場合にはERCPでは経十二指腸乳頭的に検体を採取し、EUSでは穿刺吸引細胞診(EUS-FNA)を行う。しかし、ERCPでの経十二指腸乳頭的検体採取は膵管カニューレションを必要とするため膵炎のリスクを伴い、EUS-FNAは穿刺後の癌細胞の播種リスクが伴う。これらのリスクを回避し、より低侵襲に行うための検体採取法として十二指腸液採取を提案した。十二指腸液は膵管上皮細胞を含んでいると考えられ、膵液よりもはるかに低侵襲に採取可能である。

一方、S100タンパク質は細胞種特異的に発現し、2個のEF-handを持つカルシウム結合性タンパク質であり、現在までに20種類のサブファミリーが確認されている。これらS100タンパク質ファミリーの機能は、複雑で多岐に渡っていると考えられており、未解明の部分が多く残されている。

そこで本研究では十二指腸液中のS100タンパク質ファミリーに着目し、これまでに膵癌や慢性膵炎、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)などの疾患の膵液において発現上昇の報告のあるS100A2、S100A4、S100A6、S100A11を測定・解析し、膵癌早期診断を目指すことを目的とした。これが可能となれば、将来的に小規模なクリニックでも上部消化管内視鏡検査施行時に十二指腸液を採取し、膵癌スクリーニング検査が行える可能性がある。本研究により膵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

十二指腸液中のS100タンパク質ファミリーを測定し、膵癌スクリーニングに有意義かどうかを検討する。

3. 研究の方法

先行研究で採取されていた検体を利用し、ELISA kitを用いて十二指腸液中のS100A2、S100A4、S100A6、S100A7、S100A11濃度を測定した。対象症例は膵癌群10例、膵IPMN群10例、慢性膵炎群7例、コントロール群4例(生体腎移植ドナーから採取したもの)とした。

4. 研究成果

S100A2は膵癌群、膵IPMN群、慢性膵炎群、コントロール群ともにELISA kitの検出下限以下であった。十二指腸液は採取時にタンパク質分解酵素阻害薬を添加しているものの、S100A2はほぼ分解されている可能性が高いと考えられた。

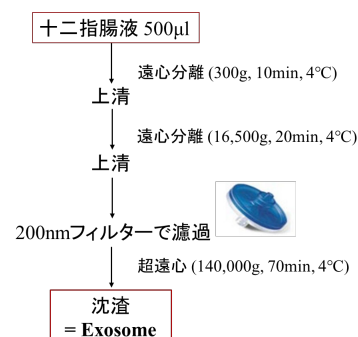
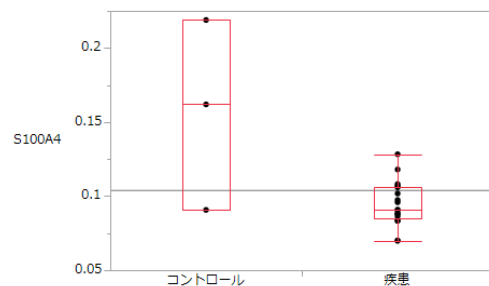
S100A4は有意差は認めなかったものの、コントロール群のみ濃度が高い傾向にあり、膵疾患スクリーニングという観点では有用なマーカーとなる可能性があると考えられた。

S100A6はそれぞれの疾患群およびコントロール群間で有意差は認めなかった。

S100A11はそれぞれの疾患群およびコントロール群間で有意差は認めなかった。

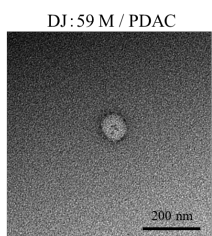
今回の検討では十二指腸液中S100タンパク質family測定の膵癌早期発見における有用性を明らかにすることはできなかった。

そこで、膵癌早期発見のマーカーとして、十二指腸液中のエクソソームおよびエクソソームに内包されていると想定されるmicroRNAに着目することにした。

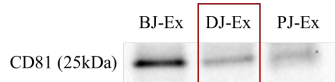


まず、十二指腸液中からエクソソーム抽出の可否を確認した。エクソソーム抽出法として超遠心法を用いた。十二指腸液 500 μ l を用いて 300 \times g 16500 \times g の遠心分離を行った後に 140000 \times g の超遠心を行ない、沈殿物を回収した。超遠心法での沈殿物を電子顕微鏡およびナノサイトで観察し、エクソソームに矛盾しない小胞が含まれていることを確認した。また、ウエスタンブロッティングにより CD81 の存在を確認した。以上より、十二指腸液中にはエクソソームが含まれており、回収可能であると判断した。そこで、術前に十二指腸液採取が可能だった膵癌群

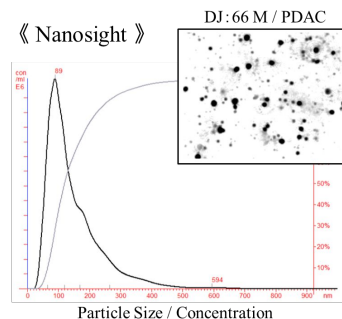
《 透過型電子顕微鏡 》



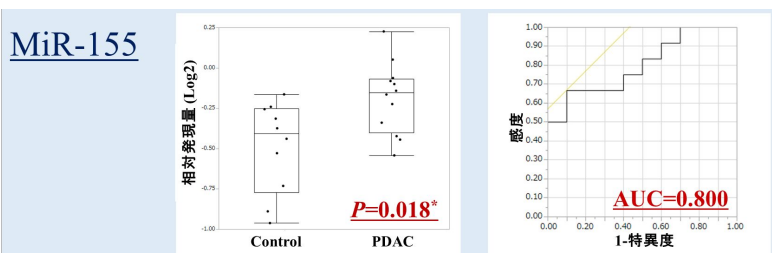
《 ウエスタンブロッティング法 》



《 Nanosight 》



Size Distribution : Mean 150 nm, Mode 89 nm, SD 97 nm
Concentration : 3.43 E+11 particles/ml



12 例の十二指腸液からエクソソームを抽出した。コントロール群として、腎移植ドナー症例で術前に十二指腸液採取が可能だった 10 例の十二指腸液からエクソソームを抽出した。今回は膵癌早期発見のマーカーとして、エクソソーム中の miR-21、miR-155 に着目することにした。抽出したエクソソーム中の miR-21、miR-155 を測定し、miR-16 を内部コントロールとして Ct 法を用いて発現量を比較検討した。その結果、miR-21 には有意差を認めなかったが、miR-155 はコントロール群と比較し、有意に膵癌群で高発現しており、膵癌早期発見のマーカーの候補として十二指腸液中エクソソーム中の miR-155 を同定することができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 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. 掲載予定 . 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Mori Y, Ohtsuka T, Nakata K, Miyasaka Y, Nakamura M. Knack and pitfalls of laparoscopic surgery for congenital biliary dilatation. 第 30 回日本肝胆膵外科学会・学術集会. 2018 年 6 月 7 日 . 神奈川県横浜市

中村 聡, 貞苺 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 . 膵液中 exosome を利用した膵癌診断バイオマーカーの検討 . 第 49 回日本膵臓学会大会 . 2018 年 6 月 29 日 . 和歌山県和歌山市

森 泰寿, 大塚 隆生, 仲田 興平, 宮坂 義浩, 中村 雅史 . 当科における先天性胆道拡張症の中期成績と至適術式の検討 . 第 31 回日本内視鏡外科学会総会 . 2018 年 12 月 8 日 . 福岡県福岡市

〔図書〕(計 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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

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。